

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

**Identificação *in silico* de metaloproteínas associadas a cobre, ferro e zinco
codificadas pelo genoma de *Paracoccidioides spp.***

GOIÂNIA 2014

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

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

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ Dissertação ☐ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Nome completo do autor: Gabrieli Brum Tristão

Título do trabalho: Identificação *in silico* de metaloproteínas associadas a cobre, ferro e zinco codificadas pelo genoma de *Paracoccidioides* spp.

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO

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


Assinatura do (a) autor (a)

Data: 05/10/16

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

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

**Identificação *in silico* de metaloproteínas associadas a cobre, ferro e zinco
codificadas pelo genoma de *Paracoccidioides spp.***

Dissertação apresentada pelo mestrando
Gabriel Brum Tristão, como requisito para
obtenção do título de Mestre em Genética e
Biologia Molecular, sob orientação do Prof.
Dr. Alexandre Melo Bailão.

GOIÂNIA 2014

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

- Tristão, Gabriel Brum
- T838i Identificação *in silico* de metaloproteínas associadas a cobre, ferro e zinco codificadas pelos genomas de *Paracoccidioides* spp. [manuscrito] / Gabriel Brum Tristão - 2014.
xv, 94 f. : il., figs, tabs.
- Orientador; Prof. Dr. Alexandre Melo Bailão Co-orientadora:
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Laboratório de Biologia Molecular, 2014.
- Bibliografia.
- Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.
- Apêndices.
1. *Paracoccidioides* spp. 2. Genomas – Identificação. 3. Bioinformática 4. Proteínas – Fatores metálicos. I. Título.
- CDU 577.2:575.112



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR
Campus II (Samambaia), ICB IV, segundo piso, Goiânia, Goiás.
Tel/fax: 62 3521 1203
Email: posgeneticaufg@gmail.com

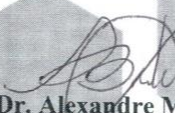
ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Nº 005

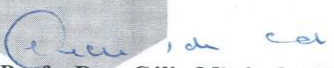
Ata da reunião da banca examinadora da defesa de dissertação em nível de mestrado. Em onze de março de dois mil e quatorze, às quatorze horas, no Miniauditório do ICB IV, Campus II, UFG, reuniram-se os componentes da banca examinadora: **Prof. Dr. Alexandre Melo Bailão – ICB/UFG, Profa. Dra. Célia Maria de Almeida Soares – ICB/UFG e Prof. Dr. Charley Cristian Staats – UFRGS** para, em sessão pública presidida pelo primeiro examinador citado, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: **“Identificação *in silico* de metaloproteínas associadas a cobre, ferro e zinco codificadas pelos genomas de *Paracoccidioides spp.*”**, em nível mestrado, área de concentração em **Genética e Biologia Molecular**, de autoria de **Gabriel Brum Tristão**, discente do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo presidente que fez a apresentação formal dos membros da banca. A palavra a seguir foi concedida ao autor da dissertação que, em cerca de 32 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu ao examinado, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº955/26 de fevereiro de 2010 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular e procedidas às correções recomendadas, a dissertação foi aprovada considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular, na área de concentração em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Federal de Goiás. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega na secretaria do programa da versão definitiva da dissertação, com as devidas correções. A banca examinadora recomenda a publicação de artigo (s) científico oriundo (s) dessa dissertação em



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR
Campus II (Samambaia), ICB IV, segundo piso, Goiânia, Goiás.
Tel/fax: 62 3521 1203
Email: posgeneticaufg@gmail.com

29 periódicos de circulação nacional e, ou, internacional, depois de procedidas as modificações
30 sugeridas. Cumpridas as formalidades de pauta, às 15 horas e 50 minutos
31 encerrou-se a sessão de defesa, e para constar eu, Lorena Reis Pinho, Assistente em
32 Administração - da Universidade Federal de Goiás, lavrei a presente ata, que após lida e
33 aprovada, será assinada pelos membros da banca examinadora em três vias de igual teor.

34
35
36
37
38 
39 **Prof. Dr. Alexandre Melo Bailão**
40 **ICB/UFG**

41
42
43 
44 **Profa. Dra. Célia Maria de Almeida Soares**
45 **ICB/UFG**

46
47
48
49
50 
51 **Prof. Dr. Charley Cristian Staats**
52 **UFRGS**

53
UFG

UNIVERSIDADE
FEDERAL DE GOIÁS

“A persistência é o menor caminho ao êxito”

Charles Chaplin

“A ciência nunca resolve um problema sem antes criar pelo menos outros dez”

George Bernard Shaw

1.0 SUMÁRIO

2.0 INTRODUÇÃO	11
2.1 <i>Paracoccidioides spp.</i> e a Paracoccidioidomicose	11
2.1.1 Taxonomia	13
2.2 Processo infeccioso de a homeostase de metais	15
2.2.1 Metais essenciais	19
2.2.1.1 Cobre (Cu) e sua homeostase	19
2.2.1.2 Ferro (Fe) e sua homeostase	25
2.2.1.3 Zinco (Zn) e sua homeostase	30
2.2.1.4 Manganês (Mn) e sua homeostase	35
2.3 Metalômica e Metaloproteômica	36
2.4 Predição de metaloproteínas	40
Artigo: Predicting copper-, iron- and zinc-proteome of the human pathogen <i>Paracoccidioides spp.</i>	48
3.0 OUTROS RESULTADOS OBTIDOS DURANTE O MESTRADO	69
3.1 Quantificação de íons metálicos durante a infecção	69

3.2 Análise metaloproteômica de extratos proteicos de <i>Paracoccidioides</i> spp.	74
4.0 CONCLUSÕES ATÉ O PRESENTE MOMENTO	79
5.0 MATERIAL E METODOS DOS RESULTADOS OBTIDOS DURANTE O MESTRADO	80
5.1 Manutenção de <i>Paracoccidioides</i> spp.	80
5.2 Manutenção de macrófagos J774	80
5.3 Infecção experimental	81
5.4 Recuperação da infecção	81
5.5 Obtenção de extratos proteicos de micélio e levedura	82
5.6 Tratamento com ácido nítrico	82
5.7 Análise dos metais por ICP-MS	83
5.8 Análise dos extratos proteicos por HPLC-ICP-MS	83
5.9 Análise estatística	83
6.0 BIBLIOGRAFIA	84

Capítulo 1: Revisão Bibliográfica

2.0 INTRODUÇÃO

2.1 *Paracoccidioides spp.* e a Paracoccidioidomicose (PCM)

A Paracoccidioidomicose (PCM) já foi previamente descrita como uma blastomicose Sul Americana, sendo uma doença infecciosa endêmica, frequente em áreas tropicais e subtropicais como a América Central e América do Sul (Brummer et al., 1993). Essa doença é causada pelo fungo termodimórfico *Paracoccidioides spp.* A PCM pode se apresentar nas formas crônica, sistêmica e progressiva, e geralmente afeta indivíduos do sexo masculino, de idade adulta, dedicados a atividades agrícolas (Coutinho et al., 2002). Os pulmões são os primeiros sítios de infecção, porém a disseminação do fungo para outros órgãos ocorre regularmente acarretando lesões secundárias principalmente em regiões mucosas, gânglios linfáticos, baço, fígado, pele, glândulas adrenais e outros órgãos e sistemas (Torres et al., 2010).

Desta forma a PCM representa um importante problema de saúde pública devido ao seu alto potencial incapacitante e a quantidade de mortes prematuras que provoca. Os países em que já foram relatados casos da doença estendem-se do México até a Argentina. O Brasil apresenta grande número de casos, seguido da Colômbia e Venezuela. Esta doença já foi descrita como a micose sistêmica com a taxa mais alta de mortalidade, no período avaliado entre 1980 e 1995, tendo uma taxa média mortes de 1,45/milhão de habitantes por ano, sendo que o estado de São Paulo apresentou maior frequência (29,86%), seguido por Paraná (14,52%), Minas Gerais (12,51%), Rio Grande do Sul (8,80%) e Rio de Janeiro (7,92%) (Coutinho et al., 2002).

Outro estudo realizado por Prado e colaboradores (2009) visou identificar a PCM como a causa da morte em pacientes com AIDS no Brasil entre os períodos de 1998 a 2006. Os resultados obtidos demonstraram que de 125.633 mortes por AIDS, 5.898 (4.7%) estavam associadas a micoses sistêmicas, sendo a criptococose a mais frequente (50.9% de todas as mortes por micoses) seguida por candidíase (30.2%), histoplasmose (10.1%), aspergilose (7.2%) e pôr fim a paracoccidioidomicose (1.4%). Este mesmo estudo entretanto, avaliando as taxas de mortalidade de pacientes não infectados pelo HIV, obteve resultados opostos, descrevendo a paracoccidioidomicose como a maior causa de morte em pacientes acometidos por micoses profundas, correspondendo a uma média de 51.1% de todas as mortes no período estudado.

O fungo *Paracoccidioides spp.* microscopicamente, em meio de cultura a 37 °C, bem como nos tecidos e exsudatos de indivíduos contaminados, aparece na forma de levedura, com células em forma de roda de leme, que variam em tamanho (4 a 40 µm), podendo apresentar brotamentos múltiplos originados por evaginações da célula- mãe (Torres et al., 2010). Em temperaturas entre 18 a 24 °C, o fungo se apresenta na sua forma miceliana, sendo caracterizada por micélios septados com conídeos terminais ou intercalares. Em meio de cultura sólido, as colônias são brancas e apresentam pequenos aglomerados de micélio, porém posteriormente se tornam com aspecto de algodão e se aderem fortemente ao ágar. Admite-se que o fungo na forma de micélio seja geofílico e saprobiótico, vivendo no solo, em lugares úmidos e ricos em proteínas, com pouca variação da temperatura ambiental (Lacaz et al., 1999).

Paracoccidioides spp. pode passar por uma transformação morfológica de micélio para levedura, em condições “*in vivo*” e também “*in vitro*”, sendo que essa transformação da forma saprobiótica de micélio crescendo a temperaturas ambientes, para a fase virulenta de levedura crescendo na temperatura constante de hospedeiros mamíferos seja a estratégia infecciosa inicial do fungo. A infecção se inicia com a inalação de conídios ou fragmentos de micélio do fungo, os quais se aderem ao epitélio pulmonar e se transformam na forma patogênica de levedura (Franco 1994). Ao alcançar as porções distais do parênquima pulmonar, os conídios/micélios se transformam em leveduras, que podem ficar confinadas, causando uma infecção crônica, ou disseminar-se para órgãos distantes no caso da doença disseminada progressiva (Tóbon et al., 2003).

Neste processo a capacidade de aderência, produção de enzimas proteolíticas, produção de melanina e a capacidade de adquirir nutrientes do hospedeiro (Matute et al., 2006), dentre estes os íons metálicos (Basu 2013), prepara o fungo para sua interação com o hospedeiro.

2.1.1 Taxonomia

Atualmente *Paracoccidioides brasiliensis* é classificado no reino Fungi, filo Ascomycota, subdivisão Euscomycotina, classe Plectomyceto, subclasse Euscomycetidae, ordem Onygenales, família Onygenaceae, gênero *Paracoccidioides*, espécie *Paracoccidioides brasiliensis* (San-Blas et al., 2002)

Recentemente o uso de técnicas moleculares mostraram que o fungo *P. brasiliensis* não é uma única espécie mas sim um complexo que contém quatro

espécies crípticas: S1 (presente no Brasil, Argentina, Paraguai, Peru e Venezuela), PS2 (presente principalmente no Brasil e Venezuela), PS3 (restrita a Colômbia) e Pb01 “like” (somente no Brasil) (Marques 2013) (Ver figura 1).

Pelo fato de não haver diferenças morfológicas entre as espécies crípticas, técnicas moleculares foram usadas para tentar distinguir estes grupos filogenéticos (Pigosso et al., 2013) e através de testes moleculares foi observado que isolados do grupo Pb01 são filogeneticamente distantes das outras do gênero *Paracoccidioides*, e foi recentemente sugerida a sua inserção

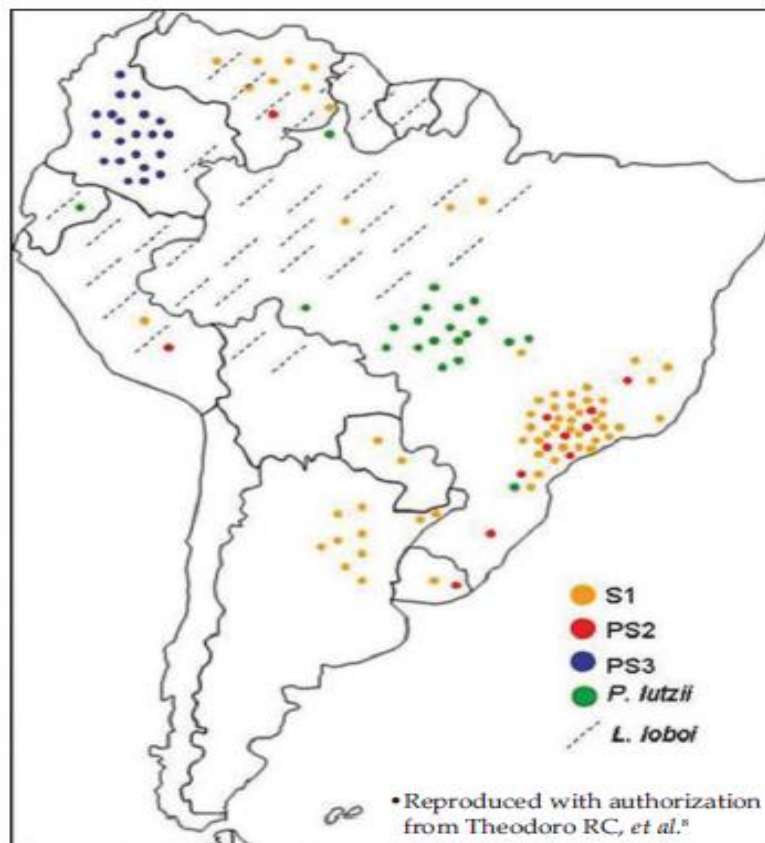


FIGURE 1: Geographic distribution of species of genus *Paracoccidioides* and species *Lacazia loboi*

Figura 1. Distribuição das espécies filogenéticas de *Paracoccidioides spp.* pela América Latina. Figura extraída de: Marques, SA. Paracoccidioidomycosis: epidemiological, clinical, diagnostic and treatment up-dating. **Continuing Medical Education.** 2013.

como uma nova espécie denominada de *Paracoccidioides lutzii* (Teixeira et. al., 2009). Apesar de não haver diferenças na doença causada por estes grupos filogenéticos existe uma diferença nos tamanhos de seus genomas e também entre o número de genes.

Pigosso e colaboradores (2013) detectaram que existe também uma diferença no perfil de expressão proteica entre isolados de diferentes espécies crípticas, sendo os isolados analisados pertencentes aos grupos Pb01, Pb2, Pb339 e PbEPM83. Algumas das proteínas exclusivamente expressadas entre os grupos fazem parte de processos metabólicos básicos. Por exemplo em Pb01 foi observado que as proteínas da via da glicose, álcool desidrogenases, proteínas do metabolismo de nitrogênio e aminoácidos, e aquelas envolvidas na desintoxicação celular foram mais expressas neste isolado em comparação com os isolados dos outros grupos. Dessa maneira ao se estudar este fungo deve se ter em mente que de certa forma existe uma variabilidade de características entre as espécies crípticas de *Paracoccidioides spp.*

2.2 Processo infeccioso e a homeostase de metais

Para uma colonização bem sucedida todo fungo patogênico deve inicialmente aderir a tecidos alvos do hospedeiro e ali obter nutrientes essenciais para seu desenvolvimento (Weinberg 2009). Sabe-se que patógenos em geral tem pelo menos um desafio em comum: nutrição durante o processo infeccioso. Não apresentando habilidade para consumir os nutrientes disponíveis nos sítios do respectivo hospedeiro, um fungo não se estabelecerá como um patógeno (Brock 2009). Sabe-se que a capacidade de captar nutrientes de fungos

patogênicos é fundamental para seu crescimento, e a redução na disponibilidade destes nutrientes, inclusive os íons metálicos, é um mecanismo de defesa do hospedeiro frente a fungos patogênicos (Winters et al., 2010). Elementos inorgânicos tal como os metais não podem ser criados nem destruídos, dessa maneira a sua homeostase dentro de sistemas biológicos deve ser estritamente regulada (Festa & Thiele 2011). A homeostase de metais no processo infeccioso dessa maneira se torna crucial, pois todos os organismos se deparam com a necessidade de obtenção bem como com a de regulação das concentrações de metais em fluidos biológicos e compartimentos celulares (Van Ho et. al., 2002), pois a concentração destes micronutrientes em taxas elevadas pode ser tóxico.

Os metais tem papéis importantes na função e integridade celular, tanto do patógeno quanto do hospedeiro (Winters et. al., 2010; Vignesh et al., 2013) sendo fundamentais para vários processos biológicos. O ferro (Fe), cobre (Cu), manganês (Mn) e o zinco (Zn) são micronutrientes ou metais essenciais, e devido a isso células de quase todos os organismos desenvolveram mecanismos, como transportadores moleculares, para adquirir estes metais do meio em que ocupam e para sua utilização (Van Ho et al., 2002). Ainda não se conhece a existência de transportadores de metais não essenciais, entretanto transportadores de metais essenciais podem ser utilizados por metais não essenciais como o cádmio (Cd), o chumbo (Pb) e o mercúrio (Hg) dentre alguns outros, fazendo com que a definição de metais essenciais seja mais abrangente (Martinez-Finley et. al., 2012).

Juntamente com o ferro, cobre e zinco, o sódio, potássio, magnésio, cálcio, manganês, cobalto, níquel, vanádio, molibdênio e tungstênio são também

chamados de metais essenciais, devido a sua importância para os seres vivos (Permyakov 2009). Os metais essenciais, frequentemente em pequenos níveis, tem ligação direta na sobrevivência dos micro-organismos e em seus nichos de infecção no hospedeiro. É estimado que por volta de 30% das proteínas necessitam de um cofator metálico, denominando-se metaloproteínas, para exercer seus respectivos papéis catalíticos, regulatórios e estruturais (Sun et. al., 2011), e que os metais adquiridos pelos organismos em sua maioria se associam a essas proteínas (Sevcenco et al., 2011).

A maioria dos patógenos desenvolve mecanismos específicos para absorção de micronutrientes em seus hospedeiros, mesmo quando há baixas disponibilidades de íons essenciais no tecido infectado. A quantidade de metais de importância biológica é essencial durante a evolução de uma doença infecciosa, o hospedeiro e o fungo irão gerar respostas diferentes, para poder controlar a homeostase desses metais (Silva et. al., 2011).

Diante disso fungos patogênicos desenvolveram estratégias sofisticadas para adquirir esses metais e as células de defesa do hospedeiro também se utilizam de diferentes mecanismos para combater a infecção. Uma destas estratégias microbidas dos hospedeiros mamíferos para evitar a infecção microbiana, chamada de “imunidade nutricional” (Appelberg 2006), é limitar a disponibilidade de nutrientes, inclusive metais, livres nos tecidos (Weinberg 2009). O termo imunidade nutricional originalmente se referia a restrição da disponibilidade de ferro pelo hospedeiro, porém recentemente este termo passou a ser utilizado também para mecanismos de retenção de outros metais

essenciais e também para mecanismos que utilizam o potencial tóxico do excesso destes metais contra micro-organismos invasores (Hood & Skaar 2013).

Sendo assim para melhor entender o mecanismo da doença é preciso conhecer as vias metabólicas metal dependentes do patógeno, conhecendo assim suas necessidades nutricionais. Isso permitiria a ampliação do conhecimento dos mecanismos de virulência/sobrevivência de fungos patogênicos bem como a determinação de novos alvos para drogas; análises estas que ajudariam no combate à infecções fúngicas. Avanços no conhecimento sobre imunidade nutricional e sobre a necessidade da homeostase de íons metálicos por patógenos já levaram a inúmeras aplicações clínicas e industriais (Hood & Skaar, 2013).

Há uma clara necessidade de determinar a homeostase de metais em *Paracoccidioides spp.* durante sua infecção, pois este fungo encontra diferentes ambientes com diferentes disponibilidades de micronutrientes essenciais. O fato de que a concentração disponível destes micronutrientes para os micro-organismos patogênicos é mantida abaixo da quantidade requerida para o desenvolvimento dos mesmos, através de mecanismos de defesa do hospedeiro, a habilidade em obter esses micronutrientes do hospedeiro, pelo fungo dessa maneira, contribui para a sua virulência.

2.2.1 Metais essenciais

2.2.1.1 Cobre (Cu) e sua homeostase

O cobre em sua forma elemental aparece naturalmente na crosta terrestre, no solo e em compostos minerais, sendo que pode transitar entre a forma Cu^+ e a forma Cu^{2+} possuindo desta maneira um alto potencial redox. Este metal pode ser encontrado em todas as plantas, fungos e animais, exercendo a função de doador e receptor de elétrons em muitas proteínas associadas ao cobre (Martinez-Finley et. al., 2012).

Este metal participa ativamente nas reações de redução e na constituição de enzimas responsáveis pelo transporte de elétrons, sendo que o processo cobre dependente mais conservado em formas de vida aeróbicas é a redução do oxigênio pela citocromo c oxidase levando a produção de ATP, (mitocôndria e cloroplasto) (Festa & Thiele 2012; Van Ho et. al., 2002). O cobre participa ativamente também na produção de melanina, em oxidases que remodelam tecidos e matrizes extracelulares, em superóxido dismutases que combatem o estresse oxidativo, em ferro oxidases que participam do transporte de ferro, no crescimento celular e em transportadores/metalo-chaperonas e metalotioeninas que regulam a homeostase deste metal intracelularmente (Kornitzer et al., 2009), além de funcionar também como um sinalizador molecular (Festa & Thiele 2012).

Evidências sugerem que o cobre livre no citoplasma é mantido na concentração de pelo menos um átomo por célula, ressaltando a grande habilidade e necessidade das células e organismos de manterem os níveis deste metal estritamente regulados através de mecanismos homeostáticos (Festa &

Thiele 2012). O cobre livre pode causar dano celular por produzir espécies reativas de oxigênio (ROS) através de reações de Fenton, por deslocar competitivamente outros metais de metaloproteínas, é capaz de destruir a estrutura de proteínas que contém grupos de ferro/enxofre comprometendo sua função além de causar danos diretos a lipídeos e ao DNA (Beaudoin & Labbe 2007).

De forma geral, os organismos procariotos não tem muita necessidade de cobre para os seus processos bioquímicos e fisiológicos. Quase todas as bactérias anaeróbicas são usuárias limitadas de cobre, talvez devido a disponibilidade limitada deste metal nessas condições. Porém enquanto esse metal não é muito utilizado por estes procariotos, em seus genomas existem muitos genes que codificam para exportadores e metalochaperonas de relocação de cobre, que protegem esses organismos contra o seu excesso e toxicidade. A homeostase de cobre em bactérias então se resume a funções básicas, como o reconhecimento dos níveis de cobre por sensores específicos e a sua exportação para fora da célula (Festa & Thiele 2011).

Esse processo é comumente codificado por um *operon* que opera em conjunto com um repressor transcricional (CueR ou CopY) que mantém o *operon* inativo na ausência de cobre. Na presença de cobre, proteínas do repressor se ligam a este metal causando assim a sua dissociação de sítios promotores específicos do DNA, e levando a expressão de genes que codificam para chaperonas e exportadores de cobre (P-type ATPases) que facilitam a proteção contra o excesso tóxico de cobre através da sua sequestração e exportação para fora da célula (Festa & Thiele 2011; Festa & Thiele 2012).

Com a evolução de eucariotos unicelulares, surgiu um novo desafio no sentido da captação de cobre e a sua relocação para metaloproteínas localizadas em várias organelas, tais como as mitocôndrias, cloroplastos, complexo de Golgi e compartimentos secretórios, aumentando assim a complexidade da homeostase deste metal. Além disso, com o subsequente aparecimento de organismos multicelulares veio a necessidade de regular o cobre em locais específicos de acordo com necessidades metabólicas específicas (Boal & Rosenzweig, 2009; Festa & Thiele 2011).

Em fungos, a primeira descrição da homeostase de cobre foi realizada em *Saccharomyces cerevisiae*. Nesta levedura o cobre é adquirido por dois transportadores de cobre de alta afinidade, Ctr1 e Ctr3. As proteínas da família Ctr apresentam três domínios transmembrânicos ricos em metioninas e são encontradas na membrana da célula regulando o transporte de cobre do meio extracelular para o intracelular (Beaudoin & Labbe 2007), depois que este metal é reduzido da forma Cu^{2+} para a forma Cu^{+} por uma metaloredutase, Fre1, localizada também na membrana celular (Festa & Thiele 2011) (Ver figura 2).

O cobre, uma vez dentro da célula, se liga a proteínas de transporte e metalochaperonas, CCs e Atx1, que auxiliam na regulação do cobre livre, impedindo com que este metal atinja níveis muito altos no citosol, e também realizam a entrega do cobre para metaloproteínas que necessitam desse metal como as superóxido dismutases, ou para proteínas de armazenamento de cobre localizadas na mitocôndria e no complexo de Golgi. Além disso existem proteínas chamadas de metalotioeninas, Cup1 e Crs5, que se ligam ao cobre impedindo com que este metal reaja com outras proteínas não específicas, e com o meio,

e permitindo também a sua estocagem (Festa & Thiele 2011; Hodgkinson & Petris 2012).

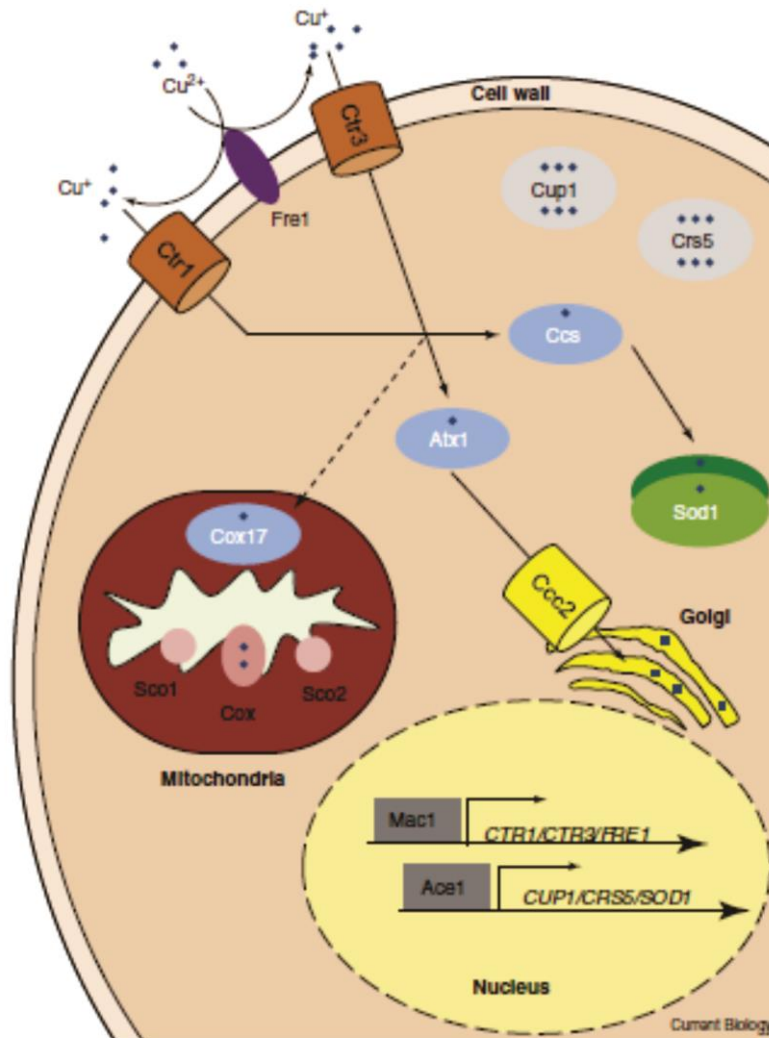


Figura 2. Homeostase de cobre descrita em *Saccharomyces cerevisiae*. Figura extraída de: Festa, RA and Thiele, DJ. Copper: An essential metal in biology. **Current biology**. 2011.

Entretanto as metalotioeninas são incapazes de transferir o cobre para metaloproteínas que necessitam de cobre. Esse papel, como já foi descrito, é exercido por metalochaperonas que tem afinidade por este metal, e desta

maneira realizam sua incorporação em proteínas específicas (Martinez-Finley et. al., 2012).

Em eucariotos existem também fatores de transcrição que respondem aos níveis de cobre. Mac 1 é um fator transcricional que responde para a falta de cobre, ativando a expressão de genes que codificam para importadores de cobre, como as Ctr1, Ctr3 e a metaloredutase Fre1. Já o fator transcricional Ace1 responde ao excesso de cobre, ativando genes que codificam para proteínas que combatem o excesso deste metal e que também relocalizam este metal dentro da célula (Festa & Thiele 2011; Festa & Thiele 2012).

Sabe-se a muito tempo que a deficiência de cobre em mamíferos compromete a imunidade celular e sensibiliza o hospedeiro diante de infecções causadas por micro-organismos. Ainda não se sabe bem o motivo dessa dependência de cobre nas respostas imunes de hospedeiros mamíferos, porém alguns estudos foram recentemente feitos, visando a importância de cobre na resposta de defesa de macrófagos, pois estas células são frequentemente a primeira linha de células de combate a patógenos (Festa & Thiele 2012).

Durante a fagocitose de um micro-organismo patogênico, o fagolisossomo do macrófago transita para um ambiente com alta capacidade microbicida, onde a presença de cobre auxilia na composição deste ambiente, acidificando o pH, gerando um maior número de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio devido a sua capacidade de óxido/redução e otimizando a função de proteases presentes no lúmen (Hodgkinson & Petri 2012; Festa & Thiele 2012; Festa & Thiele 2011). Além disso, já foi descrito que durante a fagocitose há uma grande

liberação de cobre livre no fagolisossomo, na tentativa de matar o patógeno por intoxicação diante dos grandes níveis deste metal (Raja et al., 2013).

Estudos recentes também já demonstraram em laboratório, que macrófagos tanto de linhagem eternizada como de linhagem primária, tem seus níveis de expressão para o importador de cobre Ctr1 aumentados quando tratados com Interferon- γ (INT- γ) e Lipopolissacarídeos (LPS) (Festa & Thiele 2012) demonstrando dessa maneira a importância do cobre para o macrófago durante a infecção com patógenos.

Porém diante disso, alguns fungos desenvolveram estratégias de contra-ataque como *Cryptococcus neoformans* que consegue armazenar grandes quantidades deste metal, até níveis 5 vezes acima de suas necessidades normais, para evitar a intoxicação (Raja et. al., 2013).

Outra estratégia utilizada por fungos de uma forma geral, como resposta das células aos níveis elevados de cobre é reprogramar a transcrição de genes que são importantes para a captura de cobre e sua exportação para fora da célula, de modo a manter as concentrações do mesmo dentro dos limites homeostáticos, permitindo que a quantidade deste metal seja suficiente para servir como cofator e impedindo sua acumulação em níveis citotóxicos (Beaudoin et. al., 2011; Beaudoin & Labbe 2007).

Fungos patogênicos também utilizam o cobre como um fator de virulência. A aquisição de ferro por exemplo já é conhecida como um fator de virulência, e essa aquisição requer uma ferroxidase cobre dependente (Festa & Thiele 2012). Kim e colaboradores (2009) demonstraram que *C. neoformans* utiliza

outros mecanismos de captação de cobre, utilizando o transportador Ctr4 e um fator de transcrição metaloregulatório Cuf1 que codifica para metalotioeninas de alta afinidade, quando o fungo se dissemina e infecta o cérebro.

Outros fungos patogênicos como os das espécies de *Candida*, *Histoplasma* e *Aspergillus* codificam maquinarias homeostáticas para cobre semelhantes com as aqui descritas, e futuros estudos que investiguem o papel do cobre durante a infecção de fungos patogênicos são requeridos, para uma maior compreensão do papel que o cobre desempenha durante a infecção (Samanovic, et al., 2012).

2.2.1.2 Ferro (Fe) e sua homeostase

O átomo de ferro é o elemento mais abundante nos organismos e possui a capacidade de doar e receber elétrons. A partir dessa propriedade, pode ser encontrado tanto na natureza como dentro de compartimentos biológicos, em dois estados ionizantes, Fe^{3+} (íon férrico/estado oxidado) sendo esse insolúvel, portanto não reativo e Fe^{2+} (íon férrico/estado reduzido), sendo esse estado solúvel e reativo (Ibrahim et al., 2008). Essa habilidade de oxido-redução apresentada pelo ferro permite a esse metal realizar diversas reações químicas (Gancz & Merrel, 2006) e também permite a manutenção da sua homeostase em sistemas biológicos, pois o seu armazenamento, a sua regulação e sua distribuição intracelular dependem do seu estado de oxidação (Martinez-Finley et al. 2012).

Dessa forma o ferro desempenha um papel fundamental em processos celulares vitais como as reações de transferência de elétrons, conservação de energia, síntese de biomoléculas e reparo de DNA (Rosch et. al., 1987;

Lukianova & David 2005; Lill & Muhlenhoff 2008). Recentemente foi descrito que o ferro é um metal essencial na formação do complexo da DNA polimerase em eucariotos (Netz et al., 2012). No entanto a sua alta reatividade é responsável também por sua toxicidade elevada. Os íons ferro, quando livres no ambiente, reagem oxidando as moléculas orgânicas e formando radicais livres que são compostos altamente reativos capazes de provocar graves danos ao organismo (Anderson et. al., 2007; Doherty 2007), como a degradação de lipídeos, carbonilação de proteínas e danos diretos ao DNA (Nevitt 2011). O transporte de ferro na célula devido a esse fator, tem grande importância para regular a quantidade da concentração desse íon no meio intracelular, (Anderson et. al., 2007).

A captação desse elemento em células eucariotas, principalmente as de mamíferos, é feita por receptores específicos na membrana, como por exemplo, o Trf, um transportador específico para transferrina que regula a endocitose do ferro quando ligado a esta proteína (Aisen 2004). A transferrina também tem o papel de se ligar ao ferro deixando-o inacessível para micro-organismos (Nairz et al., 2010). O armazenamento desse íon também é dependente de moléculas proteicas. Em mamíferos esse processo é mediado principalmente pela ferritina (proteína globular encontrada no citoplasma, mitocôndria e núcleo), que é a mais importante reserva de ferro de organismos mamíferos, e por volta de 60 a 70% do ferro presente em mamíferos está ligado a hemoglobina (Nairz et al., 2010). Algumas destas moléculas estão envolvidas na homeostase de ferro também em bactérias, plantas e outros organismos. Todos esses mecanismos de transporte e armazenamento de ferro em mamíferos têm como principal função impedir a oxidação de moléculas orgânicas e manter a concentração extracelular desse

ção baixa podendo potencializar mecanismos de defesa contra micro-organismos, uma vez que impede a disponibilidade de ferro livre (Denic & Agarwal 2007). O hospedeiro impõe ao patógeno a limitação da disponibilidade de ferro e a sua constante relocação (Nevitt 2011) como estratégia para diminuir a eficiência da colonização e assim dificultar o estabelecimento da infecção (Denic & Agarwal 2007). A ativação de macrófagos por $\text{INF-}\gamma$ priva o ferro de dentro dos macrófagos durante a infecção, regulando negativamente receptores para transferrina e transportadores de ferro *S/c11a1* (Nairz et al., 2010), diminuindo com isso a disponibilidade deste metal para o patógeno, e também induzindo a mobilização de ferro de dentro do fagolissomo para o citoplasma (Festa & Thiele 2012).

O sucesso da compartimentalização e relocação do ferro em organelas inacessíveis ao patógeno ou na sua associação com proteínas quelantes, permite não somente o suprimento necessário de ferro para as próprias necessidades da célula hospedeira como também permite a sua utilização como matéria prima para gerar mecanismos microbicidas, como por exemplo as espécies reativas de oxigênio (ROS) (Nevitt 2011). Dessa maneira a habilidade dos hospedeiros mamíferos de compartimentalizar e manipular o ferro contribuem de forma essencial para a resposta imune (Ratledge & Dover 2000).

Em contra partida, uma vez que a capacidade de adquirir ferro de um micro-organismo patogênico no ambiente hospedeiro é fator determinante para o estabelecimento da infecção, estratégias utilizadas para captar ferro no tecido hospedeiro são consideradas fatores de virulência (Kornitzer 2009). A aquisição desse elemento por micro-organismos ocorre de três maneiras: secreção de

sideróforos, que são moléculas quelantes com alta afinidade por íons férricos, redução do Fe^{3+} em Fe^{2+} realizado por metaloredutases presentes na membrana celular e seu posterior transporte para dentro da célula feito por proteínas de alta afinidade por ferro, e o sequestro de ferro ligado a proteínas férricas diretamente do hospedeiro, como por exemplo as transferrinas (Jacobson et. al., 1998).

Em fungos patogênicos tais como *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* genes relacionados com a aquisição, mobilização e estocagem deste elemento são regulados por um repressor tipo GATA (conserved GATA-type) altamente conservado em fungos, principalmente naqueles que são patogênicos (Nevitt 2011). Em espécies de *Cryptococcus* por exemplo, este repressor tipo GATA chamado Cir1 se liga aos sítios promotores destes genes sob condições satisfatórias de ferro impedindo a sua transcrição.

Em condições de deficiência de ferro o repressor Cir1 se desliga dos sítios promotores do DNA, o que leva a um aumento da expressão dos genes relacionados com a alta assimilação de ferro do ambiente, como os transportadores que importam ferro para dentro da célula Ctf1/Cfo1 além da metaloredutase Fre. Ocorre também um aumento da expressão de genes que codificam para o transportador de sideróforos Sit1 (Ver figura 3).

Além disso ocorre também a relocação do ferro armazenado nos vacúolos para o citoplasma através do transportador vacuolar Fth1, e o transporte de cobre para compartimentos secretórios, o que é essencial para a função das ferroxidases, difenol oxidases e laccases que catalisam a formação de melanina. Já foi proposto que a função de oxidase destas enzimas contribui de alguma

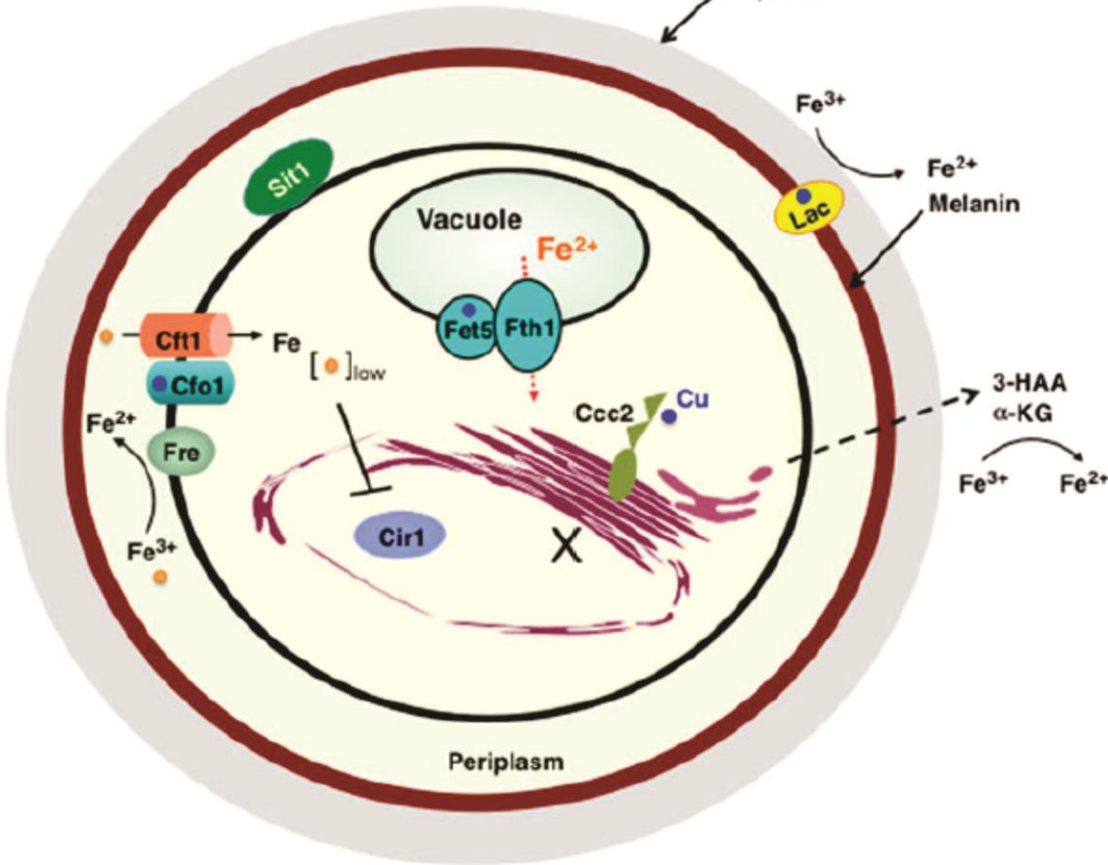


Figura 3. Captação de ferro em *Cryptococcus neoformans*. Figura extraída de: Nevitt, T. War-Fe-re: iron at the core of fungal virulence and host immunity. **Biometals**. 2011.

A absoluta dependência de ferro de ambos, tanto do patógeno quanto do hospedeiro levam a necessidade de uso de mecanismos de homeostase deste metal. Porém estes mecanismos ainda não são completamente entendidos, podem diferir muito por exemplo entre patógenos intra e extracelulares. Por isso ainda existe uma clara necessidade de estudar a homeostase deste metal nos micro-organismos (Nairz et al., 2010; Nevitt 2011).

2.2.1.3 Zinco (Zn) e sua homeostase

O zinco é um metal essencial nos sistemas biológicos. Apesar de não possuir características de óxido-redução, apresenta-se como um forte ácido de Lewis que tem a capacidade de formar complexos com vários tipos de geometria (Alberts et al.,1998). Essa característica mostra que o zinco é um importante regulador de vários processos bioquímicos, onde pode atuar como co-fator de inúmeras enzimas como, por exemplo, a RNA polimerase sendo importante no processo de transcrição (Gaither & Eide 2001).

Muitos trabalhos já descreveram a homeostase de zinco na levedura modelo *S. cerevisiae*. Este fungo codifica dois transportadores de membrana, Zrt1 e Zrt2 que transportam zinco para dentro da célula, os quais são regulados por um fator de transcrição denominado Zap1. Quando os níveis deste metal começam a ficar elevados dentro da célula, esses importadores são rapidamente regulados negativamente (Wilson et al., 2012). Outros estudos também com *S. cerevisiae* demonstraram que o transporte desse íon metálico não é dependente somente da sua concentração, mas de fatores como temperatura e saturação do metal em meio intracelular (Gaither & Eide 2001).

A importância da aquisição de zinco e as estratégias que micro-organismos patogênicos utilizam neste intuito, começaram a ser elucidadas apenas recentemente. Sabe-se que fungos patogênicos dependem de zinco para seu crescimento, e este metal tem papel fundamental para diversas enzimas que exercem funções como fatores de virulência, tais como superóxido dismutases, álcool desidrogenases e fatores de transcrição (Wilson et al., 2012).

Já foi observado que *Candida albicans* apresenta um fator de transcrição zinco-responsivo, *Crs1* (*Candida Supressor of ROK1/ zinc-responsive transcription factor*), sintetizado por um gene homólogo ao gene Zap1 de *S. cerevisiae* que regula a expressão de genes codificantes para transportadores de zinco de alta (Zrt1) e baixa afinidade (Zrt2), sendo de extrema importância para o crescimento filamentoso e a patogenicidade deste fungo (Zhao & Eide 1996). O fungo *A. fumigatus* codifica três transportadores de zinco (zrfA-C), todos eles regulados pelo fator de transcrição ZafA, um ortólogo funcional do Zap1 de *S. cerevisiae* e *Cryptococcus gatii* também possui um fator transcricional Zap1 o qual é responsável pelo controle da expressão de transportadores de zinco e muitas proteínas ligantes de zinco que participam da homeostase deste metal. Dessa maneira pode-se concluir que a regulação da expressão de transportadores de zinco parece ser bem conservada em fungos (Wilson et al., 2012; Schneider, et al., 2012).

Paracoccidioides spp. também possui genes ortólogos para os transportadores de zinco Zrt1 e Zrt2 e Parente e colaboradores (2013) observaram que estes transportadores estavam super expressos quando o fungo estava presente em condições de privação de zinco. Além disso foram identificadas 46 proteínas que foram preferencialmente expressas em condições de privação de zinco, envolvidas principalmente na defesa celular e virulência, tendo como principal função a resposta ao estress oxidativo. Foi observado então que *Paracoccidioides spp.* durante a privação de zinco ativa preferencialmente proteínas destas vias.

O vacúolo de fungos também é de extrema importância para a homeostase de zinco nestes organismos. Os transportadores Cot1/Zrc1 importam zinco para dentro do vacúolo, protegendo dessa maneira que a célula atinja níveis elevados deste metal no citoplasma, e em contrapartida, se a célula se encontra em uma situação de escassez deste metal, o zinco armazenado nos vacúolos pode ser mobilizado pelo transportador de zinco vacuolar Zrt3 (Ver figura 4). Dessa maneira o transporte de zinco no vacúolo permite tanto o seu armazenamento

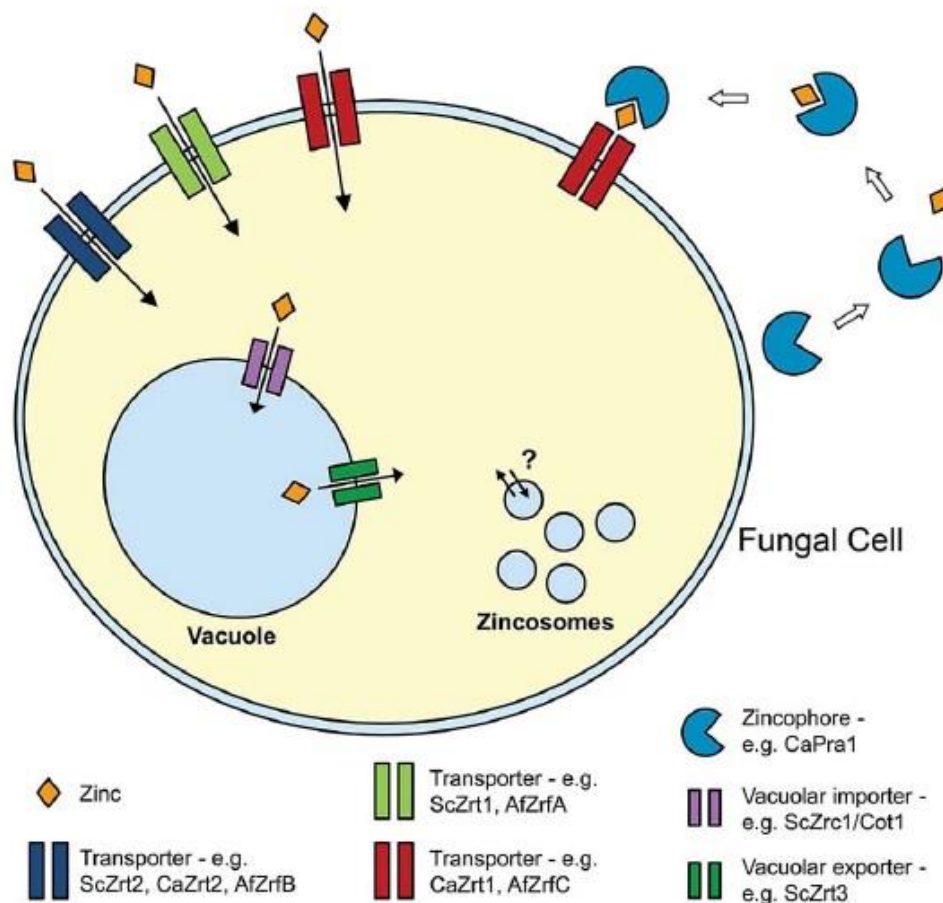


Figura 4. Homeostase de zinco na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Figura extraída de: Wilson, D.; Citiulo, F.; Hube, B. Zinc exploitation by pathogenic fungi. **Plos Pathogens**. 2012.

quanto a sua disponibilização, tanto em situações de excesso quanto de escassez deste metal (Wilson et al., 2012; Gaither & Eide 2001).

Simm e colaboradores (2007) demonstraram que a capacidade de estocagem de zinco no vacúolo de *S. cerevisiae* é suficiente para que uma única célula mãe seja capaz de produzir várias células filhas, mesmo na ausência total de zinco. O sistema vacuolar de estocagem de zinco pode ser, dessa maneira, importante nos processos de virulência em fungos patogênicos (Wilson et al., 2012).

Os zincossomos também representam outro possível compartimento de estocagem de zinco (Ver figura 4). Zincossomos são vesículas que já foram observadas em células de leveduras e também de mamíferos. A sua função é análoga a do vacúolo, servido como um local de armazenamento para o excesso de zinco e mobilizando este metal em momentos de privação. Porém, a exata natureza destas vesículas e os mecanismos pelos quais ela atua, ainda permanecem desconhecidos (Eide 2006).

Citiulo e colaboradores (2012) descobriram que o fungo *C. albicans* secreta uma proteína (Pra1) que possui uma alta afinidade por zinco, e sequestra este metal do meio ambiente, um sistema muito semelhante ao sequestro de ferro via sideróforo, sendo chamado de zincóforo. A reassociação desta proteína com a célula fúngica se dá através do transportador Zrt1, que curiosamente, é codificada no mesmo locus que a proteína Pra1. Desta maneira em *C. albicans* o transportador Zrt1 possui também a função de receptor, além da de transportador.

Vignesh e colaboradores (2013) observaram que macrófagos na presença de GMCSF (Granulocyte macrophage-colony stimulating factor), tem uma forte capacidade de privar o zinco do fungo patogênico *Histoplasma capsulatum* durante a sua infecção, diminuindo muito a sua viabilidade nos tecidos de camundongos infectados. Dessa maneira observou-se que o zinco exerce um papel essencial para este fungo durante a infecção.

A distribuição de zinco dentro das células de mamíferos é altamente dinâmica. Essa distribuição é mediada por vários transportadores de zinco, sendo os mais importantes os ZIPs que importam o zinco para o citoplasma e os ZnTs que exportam o zinco para fora da célula ou para dentro de vesículas. A disponibilidade de zinco intracelularmente é regulada através da sua estocagem em organelas específicas e também pela sua ligação com proteínas, tais como as metalotioeninas (Colvin 2010).

Durante inflamações severas em mamíferos, os hepatócitos removem o zinco do plasma, através do transportador ZIP4, reduzindo dessa maneira a sua disponibilidade para patógenos. Além disso há também a exportação do zinco para fora dos fagossomos de macrófagos durante infecções, no intuito de limitar a possibilidade de crescimento de patógenos intracelulares (Wilson et al., 2012). Adicionalmente aos processos de importação e exportação, o zinco também pode ser limitado via calprotectina, um peptídeo com atividade microbicida, que possui propriedades quelantes para o zinco e também para o manganês (Kehl-Fie et al., 2013).

Quanto mais as fronteiras do entendimento da imunidade nutricional se expandem, muito além do ferro, tendo como foco outros metais, os mecanismos moleculares que fungos patogênicos empregam para driblar a restrição de metais impostas por células de defesa representam um campo fértil para novos estudos e descobrimentos (Wilson et al., 2012).

2.2.1.4 Manganês (Mn) e a sua homeostase

Além de Fe, Cu e Zn, outros metais como selênio, molibdênio e manganês também desempenham um importante papel nas funções celulares. Por exemplo, o manganês apresenta-se como um importante ácido de Lewis, com propriedades de oxidação e redução, mas diferentemente do Fe e Cu, esse metal se apresenta de forma instável no seu potencial redox, principalmente em meios ácidos. Adicionalmente, como todos os metais de transição com potencial redox, o manganês também forma reativos de oxigênio. Além das propriedades oxido-redutivas, também tem grande participação nas reações metabólicas da fotossíntese em que desempenha papel chave no fotossistema 2 para oxidação da água em oxigênio (Bleackley & Macgillivray 2011). Em micro-organismos, a importância desse elemento está relacionada com o estresse oxidativo onde vários estudos relataram proteínas e outras moléculas dependentes deste metal como, por exemplo, as superóxido dismutases (Bleackley & Macgillivray 2011). Em algumas bactérias o manganês pode substituir o ferro mais reativo, em proteínas que se ligam a ferro, reduzindo o dano oxidativo que essas proteínas poderiam causar (Hood & Skaar 2013).

Como a concentração desse elemento no meio intracelular costuma ser baixa, as células criaram mecanismos de armazenamento de manganês em organelas celulares específicas como, por exemplo, a mitocôndria, vesículas e perioxossomos. Ainda não se conhece transportadores específicos para manganês nas células eucarióticas, porém este metal é importado para o citosol através de transportadores de zinco e também de cálcio devido a similaridades eletrostáticas (Troxell et al., 2013) e sua homeostase também é mantida por genes regulatórios de outros metais, como por exemplo o gene *Pmr* que codifica para uma ATPase dependente de cálcio, que também regula os níveis de manganês dentro da célula (Bowman et al., 2012).

Células mamíferas costumam limitar o acesso de patógenos ao manganês através da calprotectina, e através de alguns transportadores de zinco, porém mecanismos mais detalhados da homeostase deste metal durante infecções permanece ainda inexplorado (Kehl-Fie et al., 2013).

2.3 Metalômica e metaloproteômica

Na última década, houve um grande desenvolvimento nos campos da biologia com sufixo “ômicas” (Wrobel 2009), destacando-se entre estes a genômica e a proteômica. Em comparação a estes, a metalômica e a metaloproteômica são campos de estudo relativamente novos. Contudo a genômica e a proteômica disponibilizaram um vasto conjunto de dados que podem ser utilizados na metalômica e na metaloproteômica, o que possibilita potencialmente um rápido avanço das mesmas (Shi & Chance 2008).

A metalômica e a metaloproteômica são campos emergentes responsáveis em gerar descobertas da função, compreensão, transporte e armazenamento de metais traços essenciais para a vida. Metalômica é definida como a análise do total de metais em uma determinada amostra, tecido ou organismo e a metaloproteômica tem como foco explorar proteínas que se associam a metais (Shi & Chance 2008), sendo que o estudo direto destes campos permite conhecer a quantidade de metais em nível intracelular, a localização e a função que estes exercem associados a proteínas. Sua aplicação torna possível a descoberta das concentrações de elementos metálicos em níveis biológicos (Zerkle et al., 2005).

O estudo da metalômica é feito através de diversas técnicas, que permitem uma abordagem “*in vivo*” e “*in vitro*” (Chan 2011). Dentre estas diversas técnicas destacam-se três. A primeira e talvez a mais frequentemente utilizada é a combinação de uma técnica de separação de extratos de alta-resolução, como a cromatografia líquida (LC) ou eletroforese por capilares (CE) com a espectrometria de ionização por plasma (ICP-MS). A espectrometria de ionização por plasma pode providenciar informações quantitativas, isotópicas e de composição de metais (Tomalová et al. 2013). Essa técnica é muito sensível, capaz de detectar pequenas quantidades de metais e também de detectar múltiplos elementos metálicos simultaneamente. O ICP-MS se baseia no acoplamento de uma fonte de ionização por plasma, que permite a ionização das moléculas da amostra em altas temperaturas, com um espectrômetro de massas para separar e detectar os íons da devida amostra (Tomalová et al., 2013).

Hsieh e colaboradores (2013) caracterizaram o metaloproteoma de cobre, ferro, zinco e manganês da alga *Chlamydomonas reinhardtii* utilizando espectrometria de massas acoplada a ionização por plasma, e obtiveram um número maior de metaloproteínas identificadas em comparação com trabalhos que utilizaram técnicas proteômicas convencionais com o mesmo organismo, demonstrando desta maneira a grande sensibilidade desta técnica, e a capacidade dela em gerar informação acerca do metaloproteoma de um dado organismo.

A segunda técnica é a absorção espectroscópica de raios-X em larga escala, essa técnica faz análise direta de metaloproteínas e metais em tecidos e células (Shi et al., 2008; Lobinski et al., 2006). A abordagem por IMAC (Immobilized-metal affinity cromatography) é muito utilizada para isolar metaloproteínas e comumente associada a espectroscopia de raios-X (Shi & Chance 2011; Maret 2009).

Algumas técnicas proteômicas quando utilizadas na metaloproteômica podem levar a perda do metal ligante nativo da proteína, ou sua substituição por algum outro metal contaminante, levando a resultados errôneos acerca de qual metal é nativo de determinada metaloproteína ou se a proteína realmente se liga a algum metal (Shi & Chance 2011; Maret 2009). Devido a estes problemas a bioinformática surge como uma terceira técnica viável no estudo da metalômica e metaloproteômica pois permite a busca de domínios de ligação a metais conservados diretamente do genoma de um organismo ou na sua sequência proteica e também possibilita a identificação da função e localização de metaloproteínas por meio do uso de ferramentas bioinformáticas (Bertini &

Cavallaro 2009; Andreini et al., 2004), podendo ainda obter especificamente o tipo de metal ligante e também a estruturação tridimensional de metaloproteínas.

O uso de ferramentas bioinformáticas se mostra cada vez mais, ser útil na tentativa de aumentar o conhecimento nos campos da metalômica e metaloproteômica, e a existência de bancos de dados específicos auxilia nesse progresso, sendo que proteínas que se ligam a Cu, Fe, Zn e Mn são as mais depositadas e abundantes nestes bancos de dados (Sun et al., 2011). Andreini e Bertini (2012) realizaram um estudo em que caracterizaram a funcionalidade e estruturação de todas as metaloproteínas de zinco disponíveis no banco de dados PDB (Protein Data Bank) usando para isso ferramentas computacionais, provando dessa maneira que a bioinformática tem a capacidade de auxiliar grandemente as áreas da metalômica e metaloproteômica.

Estudos que visam caracterizações metalômicas e metaloproteômicas tem levado ao desenvolvimento de várias abordagens que trazem informações, experimentais ou *in silico*, da função e estruturação de metaloproteínas. Essas informações podem então ser armazenadas em anotações que associam essas metaloproteínas a sua respectiva sequência genômica, enriquecendo dessa maneira os bancos de dados já disponíveis (Bertini & Rosato 2007) e enriquecendo essas áreas do conhecimento.

2.4 Predição de Metaloproteínas

Atualmente se sabe que aproximadamente um terço de todas as proteínas já conhecidas se ligam a metais, sendo chamadas assim de metaloproteínas. Essas representam uma das mais diversas classes de proteínas, e são definidas como proteínas que se ligam a um ou mais íons metálicos ou cofatores que contém algum tipo de metal (Bertini & Rosato 2007).

Muito da função que os metais exercem na biologia dos organismos, é devido à sua associação com proteínas. Os íons metálicos nessas proteínas exercem funções catalíticas (o metal é requerido para a função catalítica correta de uma dada enzima), regulatórias (o metal que se liga a proteína regula a sua funcionalidade) ou estruturais (o metal auxilia a conformação da proteína), papéis esses que são de extrema importância para a função proteica e consequentemente para a via metabólica ou processo celular que essa proteína faz parte (Shi & Chance 2011; Bertini & Cavallaro 2009; Dudev & Lim 2008). De fato as interações de metais com a cadeia de aminoácidos desempenham papéis únicos na biologia, promovendo estruturas e reações que não poderiam existir em proteínas sem associação com metais (Festa & Thiele 2011). Andreini e colaboradores (2009) realizaram uma análise de mecanismos enzimáticos de moléculas com estruturas já conhecidas, e observaram que cerca de 40% de todas as reações catalíticas já descritas, envolvem íons metálicos.

Além do magnésio, que se liga à metaloproteínas apenas de forma transitória, o ferro, zinco e manganês são os três metais mais frequentemente utilizados por metaproteínas, e o cobre é o sétimo mais utilizado (Hsieh et al.,

2013). Além destes metais o sódio, potássio, cálcio, níquel e o cobalto são também frequentemente encontrados se ligando a proteínas em condições de funcionalidade fisiológica (Dudev & Lim 2008). A propriedade de ligação ao metal das proteínas está presente na sua sequência primária de aminoácidos. Essa sequência está diretamente relacionada com a estrutura tridimensional da proteína, e conseqüentemente o arranjo apropriado dos aminoácidos juntamente com suas características específicas se torna crucial para as propriedades de ligação ao metal, possibilitando a modelagem do sítio de ligação proteína/metal (Andreini et al., 2004).

Íons metálicos podem se ligar a proteínas através de uma variedade de sítios de ligação. Entretanto, a especificidade de um sítio de interação proteína/metal pode ser fraco, e esse sítio pode muitas vezes possibilitar a ligação de diferentes tipos de íons metálicos com afinidades semelhantes, como por exemplo metais com propriedades eletronegativas parecidas. Muitas vezes o metal mais fisiologicamente e funcionalmente relevante pode não ser o que se liga mais fortemente a um sítio específico da proteína (Bertini & Rosato 2007). Dessa maneira a seletividade da proteína para com o metal ligante se dá por muitos passos, sendo chamados de passos seletivos ou de seletividade. Muitos transportadores de afinidade específica determinam quais metais entram na célula e quais alcançam compartimentos subcelulares específicos, pois é a abundância de um determinado metal em um determinado local biológico, onde a proteína é sintetizada ou enovelada, que define qual metal vai se ligar a essa proteína. Eucariotos tem mais passos de seletividade para a síntese de uma metaloproteína do que procariotos (Dudev & Lim 2008; Maret 2009).

Quando células são cultivadas em ambiente laboratorial, muitos destes passos de seletividade da proteína para com o metal ligante ficam ausentes, pois as condições de cultura diferem muito das condições naturais. Por exemplo, o crescimento de uma dada levedura em um meio rico em cobalto, fará com que este metal se incorpore em metaloproteínas que se ligariam a zinco naturalmente, como no caso das álcool desidrogenases (Maret 2009). Pode haver a troca de metais do sítio da proteína por aqueles contidos em tampões, e também por aqueles provenientes do próprio ambiente. Alguns metais como o ferro e o zinco podem estar presentes no ambiente laboratorial em quantidades muito maiores do que os passos de seletividade permitiriam eles estarem presentes em uma condição “*in vivo*”. Os íons metálicos em metaloproteínas podem também ser substituídos “*in vitro*” demonstrando que a metaloproteína em si não é altamente seletiva em relação ao metal ligante, e que outros íons metálicos, inclusive aqueles que são tóxicos, podem se ligar a proteína e alterar completamente a sua função (Maret 2009; Dudev & Lim 2008).

Devido a estes problemas no âmbito experimental ao se trabalhar com metaloproteínas, a bioinformática e a predição de metaloproteínas diretamente do genoma conhecido de um dado organismo, surge como uma forte estratégia para o estudo de metaloproteínas, pois sequencias específicas de ligação a metais já vem sendo identificadas e anotadas ao longo dos anos (Andreini et al., 2004), disponibilizando com isso, uma vasta quantidade de dados a serem analisados. Com o advento do sequenciamento genômico, o proteoma total de várias espécies se tornaram disponíveis. Porém a caracterização funcional destes proteomas ainda não se tornou totalmente possível, mesmo que recentemente muitos avanços surgiram nesse campo, como a espectrometria de

massas. Consequentemente a isso, muitas abordagens bioinformáticas foram criadas para prever a função de sequências proteicas (Tatusov et al., 1997; Marcotte et al. 1999; Valencia 2005). Dessa maneira abordagens bioinformáticas específicas vem sendo desenvolvidas, refinadas e aplicadas a todo nível do genoma para identificar a fração do proteoma de um dado organismo que supostamente requer íons metálicos para a sua função, ou seja a identificação de todas as metaloproteínas codificadas pelo genoma de um organismo (Bertini & Rosato 2007).

As metaloproteínas são comumente identificadas como proteínas que contêm um ou mais cisteínas e/ou histidinas que formam um sítio de ligação ao metal. As metaloproteínas de zinco são encontradas praticamente em todos os organismos e são as mais abundantes em eucariotos, constituindo grande parte de seus metaloproteomas. O padrão mais comum de aminoácidos que se ligam a zinco são de 68% contendo pelo menos uma cisteína e 65% contendo pelo menos uma histidina. Enzimas dependentes de zinco estão presentes em quase todas as classes enzimáticas funcionais, sendo as hidrolases as mais comuns. Sabe-se que as moléculas de água que são ativadas pelo zinco dessas enzimas, fazem o ataque nucleofílico em seus substratos (Bertini & Rosato 2007).

A maioria das metaloproteínas de zinco, mais do que 40%, funcionam como fatores de transcrição, e consistem praticamente de dedos de zinco, que não interagem somente com o DNA mas também podem mediar interações com o RNA e também com outras proteínas. O fato do metaloproteoma de zinco ser maior em organismos eucariotos está ligado com o aumento da necessidade de regulação da expressão genica nestes organismos, além também da

compartimentalização celular e da diferenciação celular em organismos multicelulares (Bertini & Rosato 2007).

Um fato interessante é que os metaloproteomas de zinco de bactérias termo resistentes é rico em proteínas ligantes a este metal. Andreini e colaboradores (2006) analisaram o metaloproteoma de zinco de 11 micro-organismos procariotos hipertermófilos e foi observado nestes organismos que por volta de 7% a 11% do proteoma era constituído por proteínas ligantes a zinco. Este fato deve estar relacionado com o uso do zinco para estabilizar a estrutura proteica, em altas temperaturas.

Nos sistemas biológicos, o ferro pode ser incorporado em proteínas numa variedade de cofatores, e em ambos os estados oxidativos, +3 ou +2. Muitas proteínas se ligam a ferro em “clusters” de ferro e enxofre. Essas proteínas são chamadas de proteínas ferro-enxofre ou ferredoxinas e tipicamente formam cadeias laterais de cisteínas ou cisteínas e histidinas que se ligam ao complexo ferro-enxofre. Existem também proteínas que se ligam ao ferro de forma mais simples, como por exemplo as rubredoxinas, que se ligam somente a um átomo de ferro rodeado por quatro cisteínas (Bertini & Rosato 2007; Dudev & Lim 2008).

A complexidade química da maioria dos cofatores de ferro é causada devido a necessidade de controlar a alta reatividade deste metal, no intuito de prevenir interações indesejáveis. A maioria das proteínas ligantes a ferro em eucariotos está em associação com grupos heme, e o metaloproteoma de ferro não ligante a grupos heme de organismos eucariotos, com exceção das leveduras, parece não aumentar em relação ao aumento do tamanho e

complexidade do proteoma na linha evolutiva destes organismos. De fato, em termos absolutos, o número de metaloproteínas de ferro não ligantes a grupos heme, em eucariotos e em bactérias, parece estar no mesmo patamar (Bertini & Rosato 2007).

No geral, o metaloproteoma de ferro não ligante a grupos heme parece ser mais antigo evolutivamente do que o metaloproteoma de zinco. Suas variações foram orientadas devido as alterações nas composições ambientais com o passar da evolução, o que tornou a função de algumas proteínas de ferro desnecessária, havendo com isso a perda de genes para lidar com as novas necessidades funcionais que foram surgindo (Bertini & Rosato 2007).

Os íons de cobre geralmente se ligam a cadeias laterais de cisteína e histidina, seguido por uma metionina, e com menor frequência, a um ácido glutâmico ou aspártico. Proteínas que se ligam ao cobre constituem tipicamente menos de 1% do proteoma de um organismo. Particularmente em eucariotos o metaloproteoma de cobre representa de 0,2 a 0,3% do proteoma total (Bertini & Rosato 2007). Com exceção das hemocianinas que tem papel no transporte de oxigênio molecular, a maior parte das metaloproteínas de cobre tem como função a catalisação de reações redox seguido pelo transporte de íons. Eucariotos tem uma quantidade significativa de metaloproteínas de cobre específicas, sendo seu número proporcional com a complexidade do organismo, devido ao aumento da compartimentalização de células eucariotas (Bertini & Rosato, 2007).

A identificação de padrões conservados de ligação a metal, levam a identificação e classificação de metaloproteínas. Existem também fontes primárias de informações já existentes sobre padrões e motivos de ligação a metais que podem ser utilizados para associação ou comparação de identificação, como é o caso dos bancos de dados Pfam (Protein Family data base) e o PDB (Protein Data Base). Resumindo, o processo de predição do metaloproteoma de um organismo consiste basicamente em 3 passos: a predição de metaloproteínas que contém o domínio de ligação a metal, e um padrão de ligação a metal já conhecidos, a predição de metaloproteínas que contém somente o domínio de ligação a metal conhecido e a predição de metaloproteínas que contém somente o padrão de ligação a metal conhecido (Bertini & Cavallaro 2009).

Ferramentas computacionais também podem revelar a função de uma dada metaloproteína através de várias fontes de informação além da sua mera sequência de aminoácidos, podendo utilizar por exemplo a sua estrutura, pois se sabe que a função da proteína está intimamente relacionada com sua estrutura terciária, o contexto genômico no qual a metaloproteína está inserida e a sua interação proteína-proteína (Bertini & Cavallaro, 2009).

Sabe-se que algumas metaloproteínas atuam diretamente na regulação intracelular de metais, bem como na sua importação e exportação da célula (Sun, et al., 2011). Patógenos em geral devem adquirir e controlar os metais durante sua infecção em hospedeiros, para garantir a sua sobrevivência e sua disseminação (Silva et al., 2011). Dessa maneira muitas metaloproteínas exercem papéis como fatores de virulência durante a patogênese de fungos, tais

como as superóxido dismutases, as laccases, metaloproteases e metalopeptidases (Gravi et al., 2012) dentre muitas outras. Sendo assim é de extrema importância a identificação destas e outras metaloproteínas de micro-organismos patogênicos, compreendendo suas funções, localizações e vias metabólicas em que atuam.

Recentemente ficou claro que a metaloproteômica de micro-organismos em sua grande parte permanece ainda inexplorada e um bom entendimento de metaloproteomas e a sua caracterização é fundamental para o conhecimento da regulação de metais e seus papéis nos vários tipos de células e organismos (Shi & Chance 2008). Por essa razão é de grande interesse a criação de novos estudos que tornem possível a investigação sistemática da metaloproteômica, principalmente naqueles micro-organismos causadores de processos patogênicos (Sevcenco 2011), como é o caso do fungo *Paracoccidioides spp.*

JUSTIFICATIVA

O fungo *Paracoccidioides spp.*, durante todas as etapas de seu ciclo biológico, utiliza diferentes mecanismos para obtenção de nutrientes para continuar vivendo e desenvolvendo mecanismos de patogenicidade. *Paracoccidioides spp.* desenvolve mecanismos para manter sua colonização no hospedeiro e dele retirar nutrientes necessários para sua sobrevivência, dentre eles os diversos metais responsáveis pelo funcionamento adequado dos sistemas biológicos.

Os metais uma vez dentro dos sistemas biológicos, se associam a proteínas que exercem papéis primordiais na sobrevivência dos organismos. Neste contexto as análises metaloproteômicas podem ajudar no avanço de conhecimentos sobre os mecanismos homeostáticos destes micronutrientes, em quais eventos celulares eles são importantes, quais suas funções específicas e seus papéis nas vias metabólicas de *Paracoccidioides spp.*

Além disso muitas metaloproteínas exercem papéis importantes durante os processos infecciosos de fungos patogênicos, sendo definidas como fatores de virulência, tais como as superóxido dismutases, as laccases, metalopeptidases entre outras. Dessa maneira se torna importante a caracterização do metaloproteoma de *Paracoccidioides spp.*, compreendendo sua função e constituição, para que se entenda mais sobre a biologia deste fungo, e seus processos infecciosos.

Capítulo 2: Manuscrito

Predicting copper-, iron-, and zinc-proteome of the human pathogen *Paracoccidioides* spp.

Gabriel Brum Tristão^{1*}, Leandro do Prado Assunção¹, Luiz Paulo Araújo Santos¹, Clayton Luiz Borges¹, Maristela Pereira¹, Gabriele Cavalaro², Célia Maria de Almeida Soares¹ and Alexandre Melo Bailão¹

1 – Laboratório de Biologia Molecular, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO, Brazil

2 –Magnetic Resonance Center, University of Florence, Sesto Fiorentino, Italy

*e-mail: gabriet@posgrad.ufg.br, +55 062 35211110

Abstract

Approximately one third of all proteins have been estimated to contain at least one metal cofactor, being named metalloproteins. These represent one of the most diverse classes of proteins, containing metal ions that bind to specific sites, providing catalytic, regulatory and structural functions. Bioinformatic tools have been developed to predict metalloproteins encoded by an organism based only on its genome sequence. Its function as well as the type of metal binder can also be predict by bioinformatics approach. *Paracoccidioides* complex includes termodimorphic pathogenic fungi that are found as saprobic mycelia in the environment and as yeast, the parasitic form, in host tissues. They are the etiologic agents of Paracoccidioidomycosis, a prevalent systemic mycosis in Latin America, with high incidence in Brazil. It is known that many metalloproteins are important for virulence of several pathogenic microorganisms. On this way, the present work aimed to predict the cooper, iron and zinc proteins encoded by the genomes of three phylogenetic species of *Paracoccidioides* spp. (Pb01, Pb03 and Pb18). The metalloproteins were identified using bioinformatics approaches based on structure, annotation and domains. Some metalloproteins, which were predict to have two metal ligands have undergone by three-dimensional structure analysis. Cu-, Fe- and Zn-proteins represents 7% of the total proteins encoded by *Paracoccidioides* spp genomes. Zinc-proteins were the most abundant metalloproteins representing 5.7% of the fungus proteome, while copper and iron proteins represent 0.3% and 1.2% respectively. Functional classification revealed that metalloproteins are related to many cellular processes and the cellular localization showed that these proteins is spread all over the cell. Furthermore it was observed that many of these metalloproteins play roles of virulence factors in the biology of the fungus, and an analysis of the interaction of these proteins revealed that many of them depend on each other to perform their functions. Thus it is concluded that the Cu-, Fe- and Zn- metalloproteome of *Paracoccidioides* is of utmost importance for biology and virulence of this human pathogen.

Key-words: Metalloproteome, Bioinformatics, Paracoccidioidomycosis, Metals, Prediction.

Introduction

Life evolved in a complex mixture of organic and inorganic compounds. The biologic macromolecules such as amino acid and nucleotides form the carbon backbone of the fundamental compounds proteins and nucleic acids. These organic molecules are enzymatically synthesized and degraded in consonance with cell requirements. On the other hand, inorganic elements, such as copper, iron and zinc, once solubilized they can not be created or destroyed. The virtue interactions of metals with amino acid-side chains play unique roles in biology, promoting structures and reactions that would not be available to proteins alone. Therefore, metals and metalloids presents essential roles in live organisms (Festa & Thiele, 2011).

Besides its structural activity, copper essentiality holds, also, on its redox ability, that is used by metalloenzymes that catalyze electron transfer reactions (Festa & Thiele, 2012). In this

respect, this metal plays function on energy production, iron acquisition, oxygen transport, melanin production, antioxidant defense, cellular metabolism signal transduction and a broad range of other processes (Kim et al., 2008). Iron is also a redox active element, is essential as a cofactor, in the form of heme and iron-sulfur clusters, in a variety of cellular processes such as respiration, amino acid metabolism, biosynthesis of sterols and DNA, peroxide detoxification, DNA replication, among others (Nevitt, 2011; Schrettl & Haas, 2011; Netz et al., 2012). Zinc also is fundamental for all domains of life and it composes the catalytic and/or structural core of many proteins related to transcriptional control, ROS detoxification, carbohydrate oxidation, alcoholic fermentation, nucleic acid metabolism, and a host of other functions (Murakami & Hirano, 2008; Wilson et al., 2012). Most of these metal functions is due their association with proteins, called metalloproteins.

Approximately, one third of all proteins are associated with a transition metal (Shi & Chance, 2008). The presence of a inorganic element may be needed for catalytic mechanism and/or stabilization or determination of tertiary or quaternary structure (Andreini et al., 2006a). An analysis of enzymes mechanisms, restricted to molecules with known structure, has shown that about 40% of catalyzed reaction involve metal ions (Andreini et al., 2008b). Although metals are fundamental for cells correct functioning, their excess is toxic. Thus, metal availability is tightly controlled (Valko et al., 2005; Bleackley & Macgillivray, 2011). The study of the metal-binding proteins can help in the understanding of the homeostatic mechanisms of this nutrients, metal-dependent cellular events, metal roles in biology, functional annotation of proteomes and contribute to place it in context of cellular pathways (Andreini et al., 2006a). During infection there is a battle for micronutrients where host can either decrease metal availability to the invador or increase metal concentration to toxic levels and pathogens keep the metal homeostasis in host tissues to promote a successful infection (Ammendola et al., 2007; Samanovic et al., 2012; Wilson et al., 2012; Cassat & Skaar, 2013). Thus the systematic analysis of metalloproteome of pathogen fungi may contributes to uncovering the molecular events related to virulent phenotype.

With the advent of genome sequencing, the entire proteome of several species has become available. For the majority of this huge proteome data, there is not functional information available. Thorough functional characterization of whole proteomes is still not routinely possible, even though in recent years there have been many exciting advances in the field, mainly in mass spectrometry science. In this way, bioinformatic tools have been extensively exploited to predict functional features from the analysis of protein sequence (Tatusov et al., 1997; Marcotte et al., 1999; Galperin & Koonin, 2000; Valencia, 2005). Consequently, this demand resulted in several bioinformatics approaches to predict function from structure (Moult & Melamud, 2000; Thornton et al., 2000; Whisstock & Lesk, 2003; Marsden et al., 2006). Functional information of proteins is summarized in an annotation. However this task is not trivial, because of the intrinsic difficulty in prediction of function based only in sequence. The annotations are done based mainly in homology, but this poses some problems with respect to dependence of information at the time it is performed and, consequently, the propagation of annotation errors (Andreini et al., 2006b). Although, various bioinformatic web servers and databases have been created for analysis of protein sequences, very few resources are dedicated to the analysis of the metalloproteins. Indeed, it is desirable to exploit at best all available information on metal binding sites to supplement and drive analyses of deduced amino acid sequences. Some databases addressing this issue are PROMISE (discontinued), which search structural and functional information (also based on bibliography) on metalloproteins with emphasis on metal-binding properties of the metal site (Degtyarenko et al., 1999), and the Metalloprotein Database (MDB) (Castagnetto et al., 2002), which provide information on geometrical parameters of metal-binding sites in structures available in the PDB. Recently, a systematic approach to search metalloproteins in proteome databases has been developed. This method perform a domain-based searches using the PFAM domain database coupled to presence of the sequence motif found in the structure of the protein

from the PDB responsible for metal-binding, called metal-binding pattern (MBP). This elegant approach was used in a systematic description of copper-, iron- and zinc-proteins through three domains of life. The copper proteins represent less than 1% of the total proteome of an organism, while iron- and zinc-proteins represent 1- 7% and 4-10% of the proteins in a proteome, respectively.

The Paracoccidioidomycosis is a systemic mycosis restricted to the Latin America countries. Brazil is country with most of the reported cases. This disease is caused by the fungi of the species complex *Paracoccidioides* spp. The complex is composed of two species *Paracoccidioides lutzii* e *Paracoccidioides brasiliensis*, the last has three phylogenetic species S1, PS2 and PS3 with different distribution (Matute et al., 2006a; Matute et al., 2006b; Carrero et al., 2008; Teixeira et al., 2009; Teixeira et al., 2013). *Paracoccidioides* spp. are thermotolerant fungi that presents as mycelia in the nature at temperatures 18-25°C, and as yeast in mammalian hosts at 36°C. The infection occurs through the inhalation of mycelium propagules that transform in yeast in the lungs. The metal homeostasis has been well described as determinant factor in fungal pathogenesis (Bailao et al., 2006; Schrettl & Haas, 2011; Festa & Thiele, 2012; Schneider Rde et al., 2012; Wilson et al., 2012). *Paracoccidioides* spp. presents several metal homeostasis genes encoding for molecules that has been described as important virulence factors in fungi (Silva et al., 2011). In this way the analysis of metalloproteins in this pathogen is a crucial step in comprehension of fungal virulence mechanisms. In the present work it was used a bioinformatics based approach to predicts the Cu-, Fe- and Zn-proteins encoded by the genomes of the genus *Paracoccidioides*.

Methodology

Identification of Cu-, Fe- and Zn- proteins from *Paracoccidioides* spp. genome

Metalloproteins were identified by using the RDGB tool (PMID 21388232) with default options. In the RDGB strategy, the protein domains defined in the Pfam library are used to identify putative homologues in any desired genome or list of genomes. Copper-, iron- and zinc-binding Pfam domains were initially identified in the sequence of copper-, iron- and zinc-binding proteins of known 3D structure that are available from the Protein Data Bank (PDB). When the metal is present in the 3D structure of the protein, this information can be readily extracted from the PDB database together with the pattern of amino acids that are involved in the interaction of the protein with it.

The latter is called the ligand binding pattern (LBP) and is defined by the identity and spacing of the amino acids, e. g., CX(4)CX(2)H, where X is any amino acid. This pattern is usefully applied as a filter to reduce the number of false positives (i.e., of the proteins predicted to bind the metal which in reality are unable to bind it) by rejecting the proteins that lack the LBP. The lists of copper-, iron- and zinc-binding Pfam domains were manually refined before use in the RDGB protocol (I) by removing domains that do not bind the metal(s) physiologically, and (II) by adding domains that are known to bind the metal(s) physiologically although no 3D structure is available. The latter refinement is based on the annotation present in the Pfam database, which is typically sufficient detailed to allow users to evaluate the actual relevance of a domain to the biochemistry under investigation (in this case, metal-binding properties).

Functional classification and localization of Cu-, Fe- and Zn- proteins from *Paracoccidioides spp.*

The predicted metalloproteins were functional classified with the FunCat2 scheme accessed on the Pedant database (<http://pedant.gsf.de/>, (Walter et al., 2009). The WolfPsort system was used to predict the putative cell localization of the metal-binding proteins. The homology comparison among the metalloproteomes of the three species was performed using the BLAST tool. The structural analysis performed to confirm the ligand metal was done with the I-Tasser algorithm (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>). BLAST and I-Tasser were used in the analysis of the species-exclusive metalloproteins. To study potential functional associations among the copper proteins having representatives in all *Paracoccidioides spp.*, a COG identification number (Cluster of Orthologs Group) was associated to these proteins. The list of COG identification numbers was then used to query the STRING database (von Mering et al., 2003).

Results

Identification of copper-, iron- and zinc-proteins in *Paracoccidioides spp.* genomes.

The genome of three phylogenetic species of *Paracoccidioides spp* complex was sought for Cu, Fe and Zn-proteins using three complementary bioinformatics approaches: structure, domain and annotation-based (Andreini et al., 2006a). The results shown that those proteins represent, on average, 7,6% of the predicted proteome of these fungi, (Table 1). The most abundant metalloproteins were zinc-binding ones followed by iron-binding and copper-binding respectively (Supp. table 1-3). The higher frequency of Zn-proteins was expected; because zinc is one of the most abundant metal ion in living organisms playing two possible roles: catalytic and structural. It is worth saying, some identified metalloproteins presented ambiguity between their annotation and the found metal domain (see proteins see proteins, PAAG_06410, PADG_01717, PAAG_03944, PAAG_02157 as examples). These molecules were subjected to structural analysis and 70% were found to have the correct metal (Figure 1) and 30% presented other putative ligand metals, such as Mn and Ca. Some proteins presented two metals as ligands. The most frequent double ligands molecules were Fe/Zn followed for Cu/Zn and Cu/Fe respectively (Table 2). In order to confirm metalloproteins with two ligands the structure of the proteins were generated in the I-Tasser. The structural analysis revealed that 11.9% (Pb01), 17.5% (Pb03) and 13.5% (Pb18) of them present motifs for two metals and most of them corroborates with first method used. The remaining metalloproteins presented only one ligand metal and 62.1% to 81.8% of the structures were in consonance with the firsts results (Supp. table 4).

Copper-proteins

Copper is also a metal that exist in the reduced and oxidized forms and is used as a cofactor of many proteins playing role in respiratory chain, oxidative stress response, polysaccharide degradation and iron uptake (Kim et al., 2008; Hemsworth et al., 2013). Thus the study of the copper-proteins became important to understand the biology and pathogenesis of *Paracoccidioides spp*. The bioinformatic analysis shown that 26 Cu-binding proteins were found in the *P. lutzii* and Pb03 genomes while 25 were found in Pb18 genome. Functional classification of the Cu-proteins revealed that the ion transport and melanin synthesis are the most enriched functional categories because it was found 3 laccases and 6 copper transporters (Figure 1). Not surprisingly, the high affinity copper transporter which induced expression in infection-like conditions (Bailao et al., 2006; Costa et al., 2007) compose the predicted copper-proteome.

Although it was found only 2 proteins related to stress response it is important to highlight that two superoxide dismutases are copper dependent. Additionally, three amino oxidases contain Cu domain suggesting the relevance of this metal for their catalysis. *In silico* analysis also show that 5 hypothetical proteins (Supplemental Table 1) presents Cu-binding domain suggesting that functions played by this metal in biologic system remains to be discovered. The copper proteins present in the three PS were analyzed looking for potential functional association. To this aim a COG identification number was associated to each orthologue groups. According to STRING database, 17 and 16 of the copper-proteins are interconnected by high functional associations (score = 0.99) as shown in Figure 2. The interaction network represents a combination of different pieces of evidence that there are relationships of a functional nature among the proteins. In fact, the linkages between the pairs reveals that copper-proteins related to different cell activities, such as oxidative stress response (peroxidase and SODs), copper homeostasis and cytochrome oxidase assembling. The Cu-binding molecules interacts with non Cu-proteins such catalase, peroxiredoxin and heme oxidase (Figure 2)

The cell localization prediction analysis corroborates with the functional analysis and annotation of Cu-proteins (Supplementary Table 1-3). The results indicates a high frequency at the membranes because it was found many copper transporters. The number of secreted proteins was also high. Among of the molecules predicted to reach the extracellular environment are laccases, SOD, amine oxidase, polyphenoloxidase and tyrosinase. Majority of the Cu-containing proteins were localized in cytoplasm as expected for general metabolism related enzymes. Due to its function in electron-transfer chain some copper proteins were localized at mitochondrion.

Iron-proteins

Such as copper, iron is an inorganic element that are present in metalloproteins as redox centers (inserir ref do cap1 do livro). Recently, iron was also described as an element essential metal in the formation of DNA polymerases complexes in eukaryotes (Netz *et al.*, 2012). As fell in the group of biological inorganic elements essential for many cellular processes the iron-proteome was also predicted for *Paracoccidioides spp.* The three genomes encode for 115, 111 and 114 proteins in Pb01, Pb03 and P18 respectively. The general cell metabolism functions were the most enriched category, because many of the proteins are related to oxide-reduction reactions. The metabolism of amino acids and vitamins were highly representative inside this class. Additionally, many protein phosphatases were associated to iron, as expected. It was found iron proteins related to TCA and electron transfer chain that use iron sulfur clusters (Figure 1). Accordingly, iron-sulfur cluster assembling proteins compose the iron-proteome of the genus *Paracoccidioides*. Intriguingly, none iron transport was found using *is silico* analysis. Actually, it was found an calcium transporter (Pb18 proteome) and consequently the 3D modeling was built in order to solve this paradigm. This analysis shown that this transporter presents iron as a ligand (Figure 3). Among the iron-binding proteins three superoxide dismutase were detected as iron dependent. Approximately 27% of the iron-binding proteins has no predicted function indicating that many unknown cellular processes depends on iron.

Most of the iron-proteins were predict to localize in mitochondrion and cytoplasm. This observation corroborates with cell processes played by such molecules. The energy production and electron transfer reactions classically occurs in mitochondrion of eukaryotes. Also, proteins related to general metabolic events (amino acid metabolism, carbohydrate metabolism) are predict to localizes in cytosol. Moreover, plasma membrane and nucleus are cell organelles which contains iron-proteins.

Zinc-proteins

Zinc also is a biological metal playing structural and catalytical functions in proteins related to diverse cellular processes (Andreini et al., 2006b; North et al., 2012). This metal has also an intrinsic relation with fungal virulence (Silva et al., 2011; Wilson et al., 2012; Staats et al., 2013). Prediction of *Paracoccidioides spp* Zn-proteome revealed that zinc proteins are the most abundant metalloproteins encoded by their genome in comparison to Fe- and Cu-proteins. It was found more than 500 zinc binding proteins encoded for the three genomes (Supp Table 1). The most enriched functional categories in Zn-proteome was those related with transcription, cell cycle and DNA processing as well as protein fate and modification. Many zinc finger domain containing transcription factors were identified, which contributed to the function enrichment. Regarding protein fate and modification, many peptidases and proteases were found as zinc dependent. Also, proteins related to phosphorylation and ubiquitination were abundant in this category (Figure 1). Additionally, differently to Cu- and Fe-proteomic data, several metal transporters compose the predict zinc-proteome of the complex *Paracoccidioides*. In this sense, zinc-, metal-specific (other than zinc), heavy metal- and cation-transporters were found as zinc binding molecules. A considerable portion of Zn-proteome present no described function reinforcing the fact that role of metals in several cellular events are beyond of the current knowledge.

Many Zn-proteins are related to nucleic acid related processes and metabolism. Consequently, the nucleus localization is the most frequent protein target in the zinc-proteome. Additionally, cytoplasm and mitochondrion localization was also frequent. Corroborating with high number of metal-transporters the plasma membrane localization is expressive.

Homology comparisons

The metalloproteins databases were compared among the three phylogenetic species (PS) by using BLAST tool. The comparison shown that most of the proteins are common among the species as expected. Additionally, it was found specific proteins of each species as well as specific for two species (Figure 4). *Paracoccidioides lutzii* presented the highest number of specific metalloproteins which corroborate with the facts that it belongs to a new species in the genus and its greater genome. The specific metal-binding molecules specific to one or two PSs may be due to different situations: the encoding gene is specific or the encoding gene is not specific but the metal-binding motif is. In the latter group it was found orthologues with no metal-binding domain or orthologues that bind to a different metal, as revealed by structural prediction.

Comparison of the copper-proteins revealed that each isolate has 1 exclusive protein and other 5 molecules are specific for two isolates. The exclusive proteins are not encoded for exclusive genes: the one from Pb01 is not exclusive (it was found orthologues with Cu-binding domain) and the ones from Pb03 and Pb18 presented orthologues with no metal binding domain (Supplementary Table 5). Regarding the iron proteome the results revealed that most of the proteins (102 orthologues) are present in the three phylogenetic species. The Pb18 and Pb01 presented 6 iron molecules that were not found in Pb03. On the other hand, Pb03 and Pb18 genomes encode for 5 specific orthologues while Pb01 and Pb03 have three iron-proteins not found in Pb18. Although Pb18 iron proteome has no specific protein, Pb01 and P03 present 3 and 1 specific proteins, respectively. None of these proteins are encoded by specific genes. The BLAST search coupled to structural prediction analysis revealed three different situations: specific iron-protein (there are orthologues in other phylogenetic species but metal-binding protein was found in a single or two species); the iron-proteins are not specific (structural I-Tasser analysis built iron dependent models in other species); or the protein presents many orthologues

in the other species that arbitrary selection could not drive a reliable conclusion. The comparison of the zinc-binding proteomes of three genomes shows that a high portion is conserved among them (Supp. Table 5). Regarding, Pb01 and Pb03 most of the specific Zn-proteins are not encoded by specific genes, and therefore are peptides with Zn-binding domains specific to a single phylogenetic species. It was also found proteins encoded for species-specific genes, as well as, proteins that actually are not specific.

Metal dependent virulence factors

Metal essentiality and toxicity is used by the host to defend against invaders. Thus metal uptake and homeostasis by pathogens in mammal host tissues are essential for virulence (Hood & Skaar, 2012). Some metalloproteins are essential for intracellular regulation of the metals, as well as, control of their import and export (Sun et al., 2011). Pathogens must acquire and control metal utilization during infection in order to survive in their hosts (Silva et al., 2011). On this way, several metalloproteins identified in this work play roles on fungal pathogenesis (Table 3). Classical virulence factors compose the predicted metalloproteomes in *Paracoccidioides* spp. For instance, five superoxide dismutases were found, where two are Cu and Zn-dependent and three are Fe-dependent. On this way, these metals become essential elements to an effective response against ROS production by the host. Laccases enzymes related to melanin production and iron uptake which contributes with virulence of pathogenic fungi presents copper-binding domains. Urease is other enzyme that contributes primarily to fungal pathogenesis was identified as an iron-protein. This protein promotes changes in pH and toxic effects in order to increase the fungal pathogenicity (Mirbod-Donovan et al., 2006). Alcohol dehydrogenases (ADH) are related to *Paracoccidioides* sp response to host mimicking conditions. Five ADH genes were found as zinc binding molecules and one as iron binding. Additionally, other central carbon metabolism Zn-binding enzymes such as fructose 1,6-biphosphate aldolase, triose phosphate isomerase and enolase have moonlight functions related to adhesion to host cells and tissue dissemination. Protease production is a strategy used by several pathogens in host colonization and many proteases are metal-dependent proteins as found in our analysis. Also it was found many peptidases and proteases related to protein processing rather than virulence. As metals are essential to live organisms molecular components that controls their uptake and utilization have been described AS factors that contributes to virulence. In this sense several cation/metal transporters were identified in the zinc metalloproteome of the genus *Paracoccidioides*. Among several zinc-dependent transcription factors was found the GATA-type Cir1/SREA (PAAG_00610, PABG_05322 and PADG_06931/PAAG_02358, PABG_04857) related to iron homeostasis and virulence in fungi.

Discussion

Essentiality of metals, such as Cu, Fe and Zn, in biology is most related to metal dependent proteins that play fundamental roles in cells. However, the intracellular levels of this elements have to be tightly controlled, since their excess is toxic (Yannone et al., 2012). Regarding pathogenic microorganisms, the uptake, storage, use and distribution of metals are key factors for virulence. To establish infection fungal pathogens must acquire and use metals in host tissues to cope with metal scarcity induced by immune system (Vignesh et al., 2013a; Vignesh et al., 2013b). This ability to counter fungal survival by restricting basic elements growth from sugars to metals, is referred as nutritional immunity (Hood & Skaar, 2012). Metalloproteins rise

as effectors molecules in metal homeostasis maintenance during infection. In this way, the Cu-, Fe- and Zn-proteome of *Paracoccidioides* spp. was depicted by using a bioinformatic approach.

The pursuit of copper, iron and zinc-binding proteins in the genome of *Paracoccidioides* spp. revealed that these specific metalloproteins compose 0.3%, 1.3% and 6.0% of its predicted proteome, respectively. The frequencies observed are in agree with previous studies(that used same approach) that predicted Cu-, Fe- and Zn-binding proteins in organisms of the three domains of life (Andreini et al., 2006b; Andreini et al., 2007; Andreini et al., 2008a). The high number of zinc binding domains in these organism could be due the expansion of such structures in eukaryotes for a better control of gene expression, this was one of the main functional categories found (Andreini et al., 2006b). On the other hand, the frequency of copper proteins are low because eukaryotes have a substantial part of ancient copper-binding domains found through three domains of life (Andreini et al., 2008a). Still in this sense, the *Paracoccidioides* spp. Fe-proteome is in the same range of other iron-proteomes and this fact suggests strengthening the theory that the bulk of iron requiring proteins has appeared quite early in evolution. Also this fungi present smaller iron-proteome then bacteria and Archea suggesting that the specific differences found is probably due gene loss events associated to changes in environmental conditions and lifestyles (Andreini et al., 2007).

Not unexpectedly copper-protein functions are most related to ion transport, virulence and metabolism. The latter is composed of metabolic oxidases such as amine oxidases, glyoxal oxidase and laccases. Functional analysis retrieved metal transport and homeostasis as a representative category. Copper transporting ATPases are important for *Candida albicans* in copper efflux at high concentrations and also in intracellular metal trafficking. The copper ATPase Ccc2 of *C. albicans* is localized at Golgi compartment and is important for copper homeostasis and iron uptake (Weissman et al., 2002). In addition, *Saccharomyces cerevisiae* Ccc2 deliver copper to ferroxidase at Golgi compartment. The ferroxidases are required for iron uptake together with a high affinity iron transporter, so iron uptake is dependent on an efficient copper uptake and homeostasis (Stearman et al., 1996; Ramanan & Wang, 2000). Also copper chaperones are important to copper deliver copper to proteins through Ccc2 dependent mechanism (Walton et al., 2005; Banci et al., 2006). It was found three laccases in each Cu—proteome of the *Paracoccidioides* spp. These enzymes are Cu-dependent oxidases related to melanin production which is a virulence factor in pathogenic fungi (Walton et al., 2005). Some of them can act as iron oxidases during iron uptake (as described above). Another key factor in Cu homeostasis found was a copper-binding transcription factor homologue to Cuf1 of *C. neoformans*. Mutant based approaches showed that Cuf1 regulates Cu homeostasis and also the production of virulence factors such melanin and hyphal growth (Lin et al., 2006; Waterman et al., 2007). It is important to highlight that some copper homeostasis genes has been described as pieces in the fungus adaptation to host-like conditions (Bailao et al., 2006). *Paracoccidioides* spp. Cu-proteome present the key molecules for maintenance of cellular copper homeostasis not only in artificial but also in infection conditions. The functional interaction network for Cu-protein suggests a clear linkage among them that orchestrates several Cu-dependent cellular mechanisms, including activities that sustain pathogenesis.

The analysis of functional repertoire carried out by the putative iron-proteins revealed the main roles played for them are the catalysis of redox and electron transfer reactions. In a relatively general level, metabolism is the most representative functional category. It is composed of proteins belonging to amino acid metabolism, biosynthesis of vitamins, nucleotide metabolism, carbohydrate metabolism, and others. The amplitude of these metabolic processes evidence how important iron is for the basal fungal metabolism. Corroborating with that, proteomic analysis in iron starvation condition suggests *Paracoccidioides* spp. decrease iron dependent enzymes and consequently increase proteins of iron independent pathways. During iron deprivation the fungus

shut down the aerobic respiration that depends on iron-sulfur center containing proteins in the electron transfer and redox reactions, and takes fermentation as main energy producing pathway (Parente et al., 2011). Phosphatases are ubiquitous enzymes in biology that plays roles in signaling and regulations of protein activity (Williams, 2004). Among the mechanisms of phosphoryl group transfer are the metal-dependent ones. Although the exact nature of the metal ions in the active site is still in debate, there is evidences that iron integrates the enzyme catalytic mechanism (Namgaladze et al., 2002; Swingle et al., 2004).

Paracoccidioides spp genome encodes to molecular components that compose two iron uptake mechanisms: high affinity system and a low affinity system. The former is activated under iron deprivation and can be performed by two strategies: siderophore mediated and a reductive system compose of iron oxidases (laccase) and an iron transporter (Silva et al., 2011). The iron oxidases are copper-binding proteins as described above. Controversially, no iron binding transporter was detected in the analysis but a calcium transporter was. Model-based structuration confirmed iron as metal-ligand. This ambiguity is common in metalloproteomes studies because protein metal affinity is multifactorial event, because of that wrong annotations or structures are frequently detected (Maret, 2010). It is well established that defects in iron-sulphur cluster biogenesis or transport induce expression iron uptake genes (Chen et al., 2004) and that Fe-S containing proteins participate in sensing iron availability (Muhlenhoff et al., 2010). Additionally, it was recently shown that iron homeostasis is dependent on sulphur acquisition and homeostasis in *Aspergillus fumigatus* (Amich et al., 2013). The presence of many iron-sulfur cluster assembly proteins in the predicted iron-proteome of the fungus provide new molecules that may perform roles in Fe homeostasis. Moreover, aconitase of *Paracoccidioides* spp is regulated by iron suggesting its function as an iron responsive protein (Brito Wde et al., 2011).

Zn-proteomes of *Paracoccidioides* spp. represent majority of the metalloproteins described in the present work. It was identified 511 proteins with at least one metal-ligand motifs, on average. It was observed that there is a good proportionality between the total number of putative zinc-proteins and the predicted proteome. Proteins related with gene expression were the most abundant ones, as expected (20% on average). Transcription factors use zinc for structural reasons to bind to DNA. This enrichment is responsible for the high frequency of Zn-proteins found in eukaryotes (Andreini et al., 2006b). The GATA-type transcription factor (accession numbers PAAG_02358, PABG_04857 and PADG_05497) SREP inhibits expression of iron-uptake related genes in iron sufficient conditions and also regulates some iron independent genes. Additionally, SREP mutants presents abrogated virulence when compare with wild type and complemented strains in both fungi *Blastomyces dermatitides* and *Histoplasma capsulatum*. Among the most populated functional categories are protein folding, processing and degradation. It was found some protein importers, kinases/phosphatases and many proteases and peptidases. This fact evidences the fundamental role of this metal for protein processing and degradation. Regarding pathogens the protease activity is intimately connected with virulence (Parente et al., 2005; Tacco et al., 2009; Parente et al., 2010). Thus, zinc homeostasis during infection supports protease based virulence in the genus *Paracoccidioides*.

The mechanism in zinc homeostasis is well described for the model yeast *Saccharomyces cerevisiae*. This fungus encodes for two plasma membrane transporters, Zrt1 and Zrt2, which are induced by the transcription factor Zap1 and import zinc into the cell, in low zinc environments (Eide, 2006). The vacuole is extremely important for fungal zinc homeostasis. The importers Cot1/Zrc1 uptake the metal into the vacuole in toxic levels of zinc; controversially, Zrt3 export vacuolar zinc when the cells experience metal starvation (MacDiarmid et al., 2000). Zinc homeostasis is also important for fungal pathogens. *A. fumigatus* encodes three zinc transporters *ZrfA*, *ZrfB* and *ZrfC*, which are induced by ZafA (orthologue of Zap1) (Moreno et al., 2007; Amich et al., 2010). Alike, *C. albicans* Zap1 controls the expression of zinc transporters and is

important to biofilm formation, a fundamental virulence factor (Nobile et al., 2009). Similarly, Zap1 of *Cryptococcus gattii* regulates zinc cell content, zinc transporters and also Zap1 depletion abrogates fungal virulence (Schneider Rde et al., 2012). *Paracoccidioides* spp. zinc-proteome contains many metal-transporters including Zrt1 and Zrt2 (Silva et al., 2011; Bailao et al., 2012). These genes are induced if the cellular levels of Zn become too low (Parente et al., 2013). Additionally, this species complex presents some potential orthologues of Zap1, which demand future functional studies. This fungal species complex presents many putative zinc transporters that potentially participate in the zinc homeostasis maintenance during infectious process.

Recently, a metallomics based study unveil that host immune response against a fungal pathogen promotes zinc-limitation to fungal infecting cells (Vignesh et al., 2013a). GM-CSF treated macrophages promote zinc uptake to generates ROS as fungicidal mechanism, and at the same time decrease Zn availability by metallothionein production and Golgi sequestration. In order to thwart the oxidative damaged generated by phagocytes pathogens must produce ROS degrading enzymes such as superoxide dismutases (SOD) and catalases. SOD activity is important for fungal response against oxidative stress (Youseff et al., 2012). *Paracoccidioides* spp induce the production of SODs during oxidative stress, as demonstrated by proteomic approach (de Arruda Grossklaus et al., 2013). These enzymes are metal dependent and are classified in accordance to their metal as Cu/ZnSOD, MnSOD, FeSOD and NiSOD (Broering et al., 2013). *Paracoccidioides* spp. encodes for five different SODs: two are copper- and zinc-binding proteins and the other three are Fe-SODs. As these metalloenzymes are important components in the arsenal of fungal virulence factors, an efficient combat against host microbicide ROS rely on a virtuous copper, iron and zinc-uptake and homeostasis in infection.

A previous study described the association of zinc metabolism and fungal virulence, based in the identification of zinc-binding proteins and literature review. The authors used an annotation based approach only, and as said above it is not a first line technique to identify metalloproteins in databases (Andreini et al., 2006b). The present work used a systematic bioinformatic approach based in domains and conserved structures available at PDB to predict the Cu-, Fe- and Zn-proteome of a pathogenic fungus. The results show that these metals are cofactors of enzymes related to central metabolism and thus essential for biology of *Paracoccidioides* spp.. It was also noted that many metalloproteins has no characterized function indicating that many metal roles in biological systems are still unknown. Additionally, some metalloproteins belong to arsenal of virulence factors token by *Paracoccidioides* spp in order to be able to infect hosts. Although, bioinformatics based studies are important to identify metalloproteins experimental techniques must be employed to describe metalloproteomes of fungal pathogens.

References

- Amich, J, Schafferer, L, Haas, H and Krappmann, S (2013). Regulation of sulphur assimilation is essential for virulence and affects iron homeostasis of the human-pathogenic mould *Aspergillus fumigatus*. PLoS Pathog **9**(8): e1003573.
- Amich, J, Vicentefranqueira, R, Leal, F and Calera, JA (2010). *Aspergillus fumigatus* survival in alkaline and extreme zinc-limiting environments relies on the induction of a zinc homeostasis system encoded by the *zrfC* and *aspf2* genes. Eukaryot Cell **9**(3): 424-437.
- Ammendola, S, Pasquali, P, Pistoia, C, Petrucci, P, Petrarca, P, Rotilio, G and Battistoni, A (2007). High-affinity Zn²⁺ uptake system ZnuABC is required for bacterial zinc homeostasis in intracellular environments and contributes to the virulence of *Salmonella enterica*. Infect Immun **75**(12): 5867-5876.
- Andreini, C, Banci, L, Bertini, I, Elmi, S and Rosato, A (2007). Non-heme iron through the three domains of life. Proteins **67**(2): 317-324.
- Andreini, C, Banci, L, Bertini, I and Rosato, A (2006a). Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. J Proteome Res **5**(1): 196-201.
- Andreini, C, Banci, L, Bertini, I and Rosato, A (2006b). Zinc through the three domains of life. J Proteome Res **5**(11): 3173-3178.
- Andreini, C, Banci, L, Bertini, I and Rosato, A (2008a). Occurrence of copper proteins through the three domains of life: a bioinformatic approach. J Proteome Res **7**(1): 209-216.
- Andreini, C, Bertini, I, Cavallaro, G, Holliday, GL and Thornton, JM (2008b). Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles. J Biol Inorg Chem **13**(8): 1205-1218.
- Bailao, AM, Schrank, A, Borges, CL, Dutra, V, Molinari-Madlum, EEWI, Felipe, MSS, Mendes-Giannini, MJS, Martins, WS, Pereira, M and Soares, CMA (2006). Differential gene expression by *Paracoccidioides brasiliensis* in host interaction conditions: representational difference analysis identifies candidate genes associated with fungal pathogenesis. Microbes Infect **8**(12-13): 2686-2697.
- Bailao, EFLC, Parente, AF, Parente, JA, Silva-Bailao, MG, Castro, KP, Kmetzsch, L, Staats, CC, Schrank, A, Vainstein, MH, Borges, CL, Bailao, AM and Soares, CMA (2012). Metal Acquisition and Homeostasis in Fungi. Curr Fungal Infect Rep **6**(4): 257-266.
- Banci, L, Bertini, I, Cantini, F, Felli, IC, Gonnelli, L, Hadjiliadis, N, Pierattelli, R, Rosato, A and Voulgaris, P (2006). The Atx1-Ccc2 complex is a metal-mediated protein-protein interaction. Nat Chem Biol **2**(7): 367-368.
- Bleackley, MR and Macgillivray, RT (2011). Transition metal homeostasis: from yeast to human disease. Biometals **24**(5): 785-809.

- Brito Wde, A, Rezende, TC, Parente, AF, Ricart, CA, Sousa, MV, Bao, SN and Soares, CM (2011). Identification, characterization and regulation studies of the aconitase of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Biol* **115**(8): 697-707.
- Broering, EP, Truong, PT, Gale, EM and Harrop, TC (2013). Synthetic analogues of nickel superoxide dismutase: a new role for nickel in biology. *Biochemistry* **52**(1): 4-18.
- Carrero, LL, Nino-Vega, G, Teixeira, MM, Carvalho, MJ, Soares, CM, Pereira, M, Jesuino, RS, McEwen, JG, Mendoza, L, Taylor, JW, Felipe, MS and San-Blas, G (2008). New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. *Fungal Genet Biol* **45**(5): 605-612.
- Cassat, JE and Skaar, EP (2013). Iron in infection and immunity. *Cell Host Microbe* **13**(5): 509-519.
- Castagnetto, JM, Hennessy, SW, Roberts, VA, Getzoff, ED, Tainer, JA and Pique, ME (2002). MDB: the Metalloprotein Database and Browser at The Scripps Research Institute. *Nucleic Acids Res* **30**(1): 379-382.
- Chen, OS, Crisp, RJ, Valachovic, M, Bard, M, Winge, DR and Kaplan, J (2004). Transcription of the yeast iron regulon does not respond directly to iron but rather to iron-sulfur cluster biosynthesis. *J Biol Chem* **279**(28): 29513-29518.
- Costa, M, Borges, CL, Bailao, AM, Meirelles, GV, Mendonca, YA, Dantas, SF, de Faria, FP, Felipe, MS, Molinari-Madlum, EE, Mendes-Giannini, MJ, Fiuza, RB, Martins, WS, Pereira, M and Soares, CM (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): 4194-4207.
- de Arruda Grossklaus, D, Bailao, AM, Vieira Rezende, TC, Borges, CL, de Oliveira, MA, Parente, JA and de Almeida Soares, CM (2013). Response to oxidative stress in *Paracoccidioides* yeast cells as determined by proteomic analysis. *Microbes Infect* **15**(5): 347-364.
- Degtyarenko, KN, North, AC and Findlay, JB (1999). PROMISE: a database of bioinorganic motifs. *Nucleic Acids Res* **27**(1): 233-236.
- Eide, DJ (2006). Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. *Biochim Biophys Acta* **1763**(7): 711-722.
- Festa, RA and Thiele, DJ (2011). Copper: an essential metal in biology. *Curr Biol* **21**(21): R877-883.
- Festa, RA and Thiele, DJ (2012). Copper at the front line of the host-pathogen battle. *PLoS Pathog* **8**(9): e1002887.

Galperin, MY and Koonin, EV (2000). Who's your neighbor? New computational approaches for functional genomics. *Nat Biotechnol* **18**(6): 609-613.

Hemsworth, GR, Davies, GJ and Walton, PH (2013). Recent insights into copper-containing lytic polysaccharide mono-oxygenases. *Curr Opin Struct Biol*.

Hood, MI and Skaar, EP (2012). Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface. *Nat Rev Microbiol* **10**(8): 525-537.

Kim, BE, Nevitt, T and Thiele, DJ (2008). Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. *Nat Chem Biol* **4**(3): 176-185.

Lin, X, Huang, JC, Mitchell, TG and Heitman, J (2006). Virulence attributes and hyphal growth of *C. neoformans* are quantitative traits and the MAT α allele enhances filamentation. *PLoS Genet* **2**(11): e187.

MacDiarmid, CW, Gaither, LA and Eide, D (2000). Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* **19**(12): 2845-2855.

Marcotte, EM, Pellegrini, M, Thompson, MJ, Yeates, TO and Eisenberg, D (1999). A combined algorithm for genome-wide prediction of protein function. *Nature* **402**(6757): 83-86.

Maret, W (2010). Metalloproteomics, metalloproteomes, and the annotation of metalloproteins. *Metallomics* **2**(2): 117-125.

Marsden, RL, Ranea, JA, Sillero, A, Redfern, O, Yeats, C, Maibaum, M, Lee, D, Addou, S, Reeves, GA, Dallman, TJ and Orengo, CA (2006). Exploiting protein structure data to explore the evolution of protein function and biological complexity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **361**(1467): 425-440.

Matute, DR, McEwen, JG, Puccia, R, Montes, BA, San-Blas, G, Bagagli, E, Rauscher, JT, Restrepo, A, Morais, F, Nino-Vega, G and Taylor, JW (2006a). Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol Biol Evol* **23**(1): 65-73.

Matute, DR, Sepulveda, VE, Quesada, LM, Goldman, GH, Taylor, JW, Restrepo, A and McEwen, JG (2006b). Microsatellite analysis of three phylogenetic species of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Clin Microbiol* **44**(6): 2153-2157.

Mirbod-Donovan, F, Schaller, R, Hung, CY, Xue, J, Reichard, U and Cole, GT (2006). Urease produced by *Coccidioides posadasii* contributes to the virulence of this respiratory pathogen. *Infect Immun* **74**(1): 504-515.

Moreno, MA, Ibrahim-Granet, O, Vicente-franqueira, R, Amich, J, Ave, P, Leal, F, Latge, JP and Calera, JA (2007). The regulation of zinc homeostasis by the ZafA transcriptional activator is essential for *Aspergillus fumigatus* virulence. *Mol Microbiol* **64**(5): 1182-1197.

- Moult, J and Melamud, E (2000). From fold to function. *Curr Opin Struct Biol* **10**(3): 384-389.
- Muhlenhoff, U, Molik, S, Godoy, JR, Uzarska, MA, Richter, N, Seubert, A, Zhang, Y, Stubbe, J, Pierrel, F, Herrero, E, Lillig, CH and Lill, R (2010). Cytosolic monothiol glutaredoxins function in intracellular iron sensing and trafficking via their bound iron-sulfur cluster. *Cell Metab* **12**(4): 373-385.
- Murakami, M and Hirano, T (2008). Intracellular zinc homeostasis and zinc signaling. *Cancer Sci* **99**(8): 1515-1522.
- Namgaladze, D, Hofer, HW and Ullrich, V (2002). Redox control of calcineurin by targeting the binuclear Fe(2+)-Zn(2+) center at the enzyme active site. *J Biol Chem* **277**(8): 5962-5969.
- Netz, DJ, Stith, CM, Stumpfig, M, Kopf, G, Vogel, D, Genau, HM, Stodola, JL, Lill, R, Burgers, PM and Pierik, AJ (2012). Eukaryotic DNA polymerases require an iron-sulfur cluster for the formation of active complexes. *Nat Chem Biol* **8**(1): 125-132.
- Nevitt, T (2011). War-Fe-re: iron at the core of fungal virulence and host immunity. *Biometals* **24**(3): 547-558.
- Nobile, CJ, Nett, JE, Hernday, AD, Homann, OR, Deneault, JS, Nantel, A, Andes, DR, Johnson, AD and Mitchell, AP (2009). Biofilm matrix regulation by *Candida albicans* Zap1. *PLoS Biol* **7**(6): e1000133.
- North, M, Steffen, J, Loguinov, AV, Zimmerman, GR, Vulpe, CD and Eide, DJ (2012). Genome-wide functional profiling identifies genes and processes important for zinc-limited growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet* **8**(6): e1002699.
- Parente, AF, Bailao, AM, Borges, CL, Parente, JA, Magalhaes, AD, Ricart, CA and Soares, CMA (2011). Proteomic analysis reveals that iron availability alters the metabolic status of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *PLoS One* **6**(7): e22810.
- Parente, AF, de Rezende, TC, de Castro, KP, Bailao, AM, Parente, JA, Borges, CL, Silva, LP and Soares, CM (2013). A proteomic view of the response of *Paracoccidioides* yeast cells to zinc deprivation. *Fungal Biol* **117**(6): 399-410.
- Parente, JA, Costa, M, Pereira, M and Soares, CM (2005). Transcriptome overview of *Paracoccidioides brasiliensis* proteases. *Genet Mol Res* **4**(2): 358-371.
- Parente, JA, Salem-Izacc, SM, Santana, JM, Pereira, M, Borges, CL, Bailao, AM and Soares, CM (2010). A secreted serine protease of *Paracoccidioides brasiliensis* and its interactions with fungal proteins. *BMC Microbiol* **10**: 292.
- Ramanan, N and Wang, Y (2000). A high-affinity iron permease essential for *Candida albicans* virulence. *Science* **288**(5468): 1062-1064.

Samanovic, MI, Ding, C, Thiele, DJ and Darwin, KH (2012). Copper in microbial pathogenesis: meddling with the metal. *Cell Host Microbe* **11**(2): 106-115.

Schneider Rde, O, Fogaca Nde, S, Kmetzsch, L, Schrank, A, Vainstein, MH and Staats, CC (2012). Zap1 regulates zinc homeostasis and modulates virulence in *Cryptococcus gattii*. *PLoS One* **7**(8): e43773.

Schrettl, M and Haas, H (2011). Iron homeostasis--Achilles' heel of *Aspergillus fumigatus*? *Curr Opin Microbiol* **14**(4): 400-405.

Shi, W and Chance, MR (2008). Metallomics and metalloproteomics. *Cell Mol Life Sci* **65**(19): 3040-3048.

Silva, MG, Schrank, A, Bailao, EFLC, Bailao, AM, Borges, CL, Staats, CC, Parente, JA, Pereira, M, Salem-Izacc, SM, Mendes Giannini, MJ, Zancoppe-Oliveira, RM, Rosa e Silva, LK, Nosanchuk, JD, Henning Vainstein, M and Soares, CMA (2011). The homeostasis of iron, copper and zinc in *Paracoccidioides brasiliensis*, *Cryptococcus neoformans* var. *grubi*, and *Cryptococcus gattii*: a comparative analysis. *Front Microbiol* **2**: 1-12.

Staats, CC, Kmetzsch, L, Schrank, A and Vainstein, MH (2013). Fungal zinc metabolism and its connections to virulence. *Front Cell Infect Microbiol* **3**: 65.

Stearman, R, Yuan, DS, Yamaguchi-Iwai, Y, Klausner, RD and Dancis, A (1996). A permease-oxidase complex involved in high-affinity iron uptake in yeast. *Science* **271**(5255): 1552-1557.

Sun, X, Xiao, CL, Ge, R, Yin, X, Li, H, Li, N, Yang, X, Zhu, Y, He, X and He, QY (2011). Putative copper- and zinc-binding motifs in *Streptococcus pneumoniae* identified by immobilized metal affinity chromatography and mass spectrometry. *Proteomics* **11**(16): 3288-3298.

Swingle, MR, Honkanen, RE and Ciszak, EM (2004). Structural basis for the catalytic activity of human serine/threonine protein phosphatase-5. *J Biol Chem* **279**(32): 33992-33999.

Tacco, BA, Parente, JA, Barbosa, MS, Bao, SN, Goes, TD, Pereira, M and Soares, CM (2009). Characterization of a secreted aspartyl protease of the fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol*: 1-11.

Tatusov, RL, Koonin, EV and Lipman, DJ (1997). A genomic perspective on protein families. *Science* **278**(5338): 631-637.

Teixeira, MD, Theodoro, RC, Oliveira, FF, Machado, GC, Hahn, RC, Bagagli, E, San-Blas, G and Felipe, MS (2013). *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications. *Med Mycol*.

Teixeira, MM, Theodoro, RC, de Carvalho, MJ, Fernandes, L, Paes, HC, Hahn, RC, Mendoza, L, Bagagli, E, San-Blas, G and Felipe, MS (2009). Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol Phylogenet Evol* **52**(2): 273-283.

Thornton, JM, Todd, AE, Milburn, D, Borkakoti, N and Orengo, CA (2000). From structure to function: approaches and limitations. *Nat Struct Biol* **7 Suppl**: 991-994.

Valencia, A (2005). Automatic annotation of protein function. *Curr Opin Struct Biol* **15**(3): 267-274.

Valko, M, Morris, H and Cronin, MT (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* **12**(10): 1161-1208.

Vignesh, KS, Landero Figueroa, JA, Porollo, A, Caruso, JA and Deepe, GS, Jr. (2013a). Granulocyte macrophage-colony stimulating factor induced Zn sequestration enhances macrophage superoxide and limits intracellular pathogen survival. *Immunity* **39**(4): 697-710.

Vignesh, KS, Landero Figueroa, JA, Porollo, A, Caruso, JA and Deepe, GS, Jr. (2013b). Zinc Sequestration: Arming Phagocyte Defense against Fungal Attack. *PLoS Pathog* **9**(12): e1003815.

von Mering, C, Huynen, M, Jaeggi, D, Schmidt, S, Bork, P and Snel, B (2003). STRING: a database of predicted functional associations between proteins. *Nucleic Acids Res* **31**(1): 258-261.

Walter, MC, Rattei, T, Arnold, R, Guldener, U, Munsterkotter, M, Nenova, K, Kastenmuller, G, Tischler, P, Wolling, A, Volz, A, Pongratz, N, Jost, R, Mewes, HW and Frishman, D (2009). PEDANT covers all complete RefSeq genomes. *Nucleic Acids Res* **37**(Database issue): D408-411.

Walton, FJ, Idnurm, A and Heitman, J (2005). Novel gene functions required for melanization of the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* **57**(5): 1381-1396.

Waterman, SR, Hacham, M, Hu, G, Zhu, X, Park, YD, Shin, S, Panepinto, J, Valyi-Nagy, T, Beam, C, Husain, S, Singh, N and Williamson, PR (2007). Role of a CUF1/CTR4 copper regulatory axis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Invest* **117**(3): 794-802.

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**(6): 1551-1560.

Whisstock, JC and Lesk, AM (2003). Prediction of protein function from protein sequence and structure. *Q Rev Biophys* **36**(3): 307-340.

Williams, NH (2004). Models for biological phosphoryl transfer. *Biochim Biophys Acta* **1697**(1-2): 279-287.

Wilson, D, Citiulo, F and Hube, B (2012). Zinc exploitation by pathogenic fungi. *PLoS Pathog* **8**(12): e1003034.

Yannone, SM, Hartung, S, Menon, AL, Adams, MW and Tainer, JA (2012). Metals in biology: defining metalloproteomes. *Curr Opin Biotechnol* **23**(1): 89-95.

Youseff, BH, Holbrook, ED, Smolnycki, KA and Rappleye, CA (2012). Extracellular superoxide dismutase protects *Histoplasma* yeast cells from host-derived oxidative stress. *PLoS Pathog* **8**(5): e1002713.

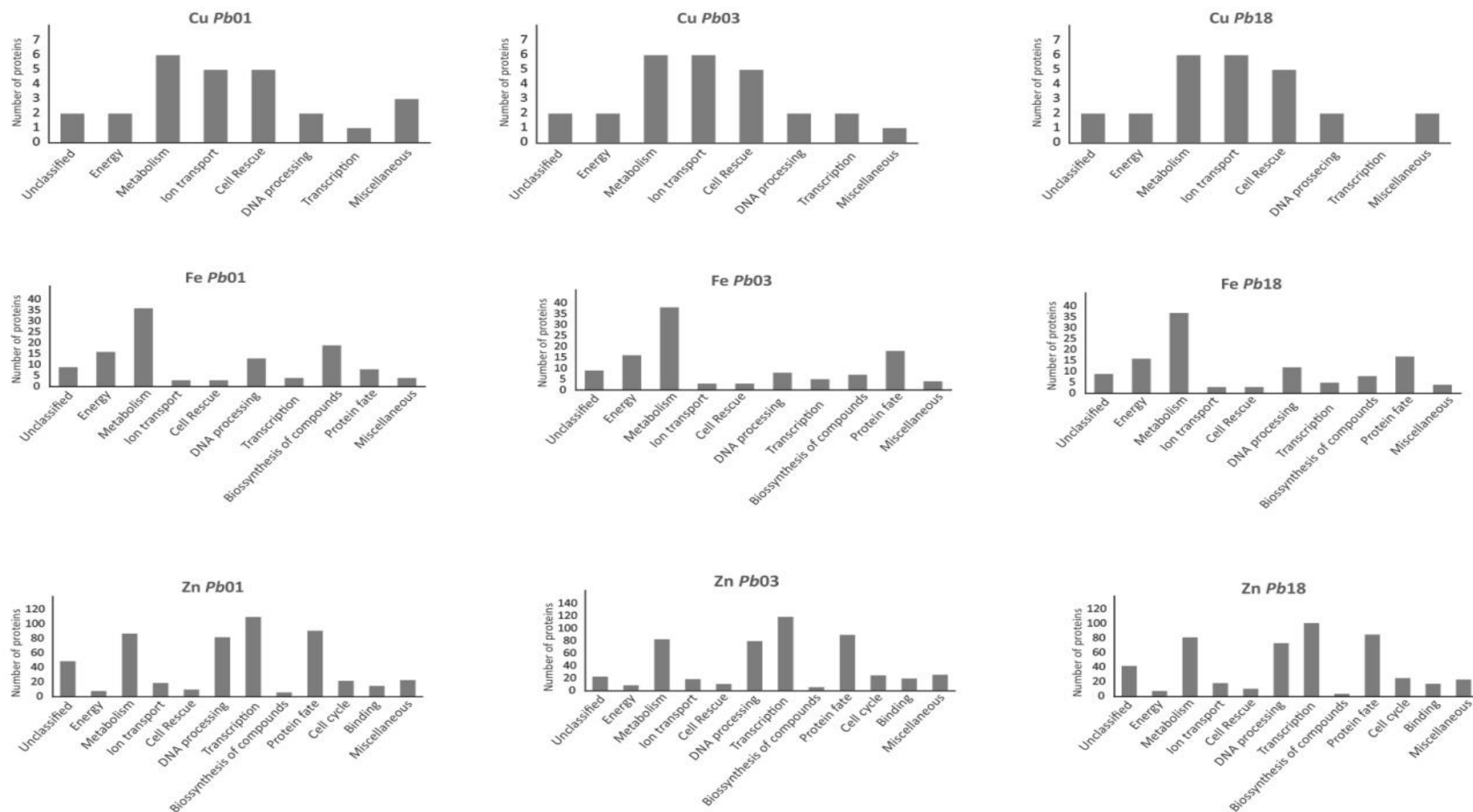


Fig 1 Functional classification of Cu-, Fe- and Zn-proteins encoded by *Paracoccidioides* spp. genomes. The metalloproteins were classified following the FunCat2 scheme available at the Pedant database.

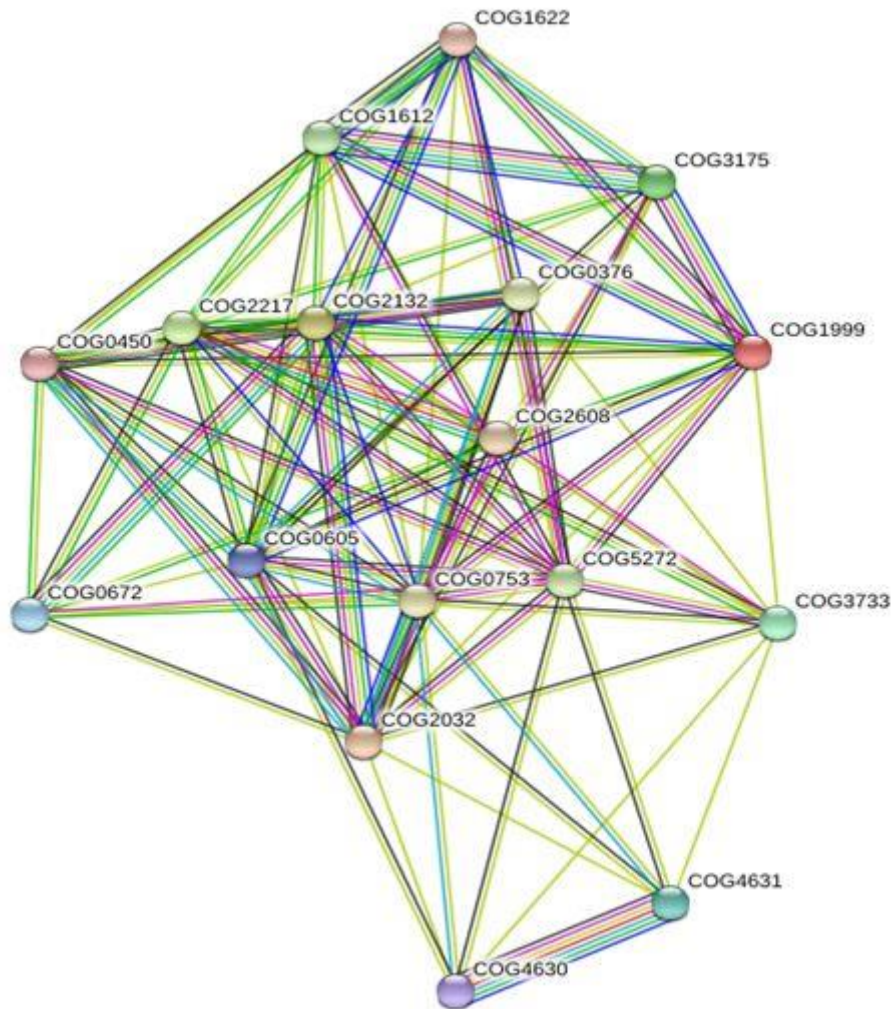


Fig 2 Functional interaction graph of copper proteins from *P. lutzii* predicted proteome. The graph was constructed in the STRING tools using standard parameters. Cu-proteins found in the present study COG3733 copper amine oxidase; COG2608 copper-transporting P-type ATPase; COG2217 copper-transporting ATPase; COG1999 mitochondrial metallochaperone Sco1; COG2132 laccase IV; COG2032 superoxide dismutase; COG0605 cytosolic Cu/Zn superoxide dismutase; COG4631 xanthine dehydrogenase; COG4630 xanthine dehydrogenase; COG3175 cytochrome c oxidase assembly protein ctaG; Partners found in the STRING database; COG5272 Ubiquitin; COG0672 High-Affinity Fe permease; COG0753 Catalase; COG0450 Peroxiredoxin; COG0376 Catalase; COG1612 Uncharacterized protein; COG1622 Heme/copper type oxidase.

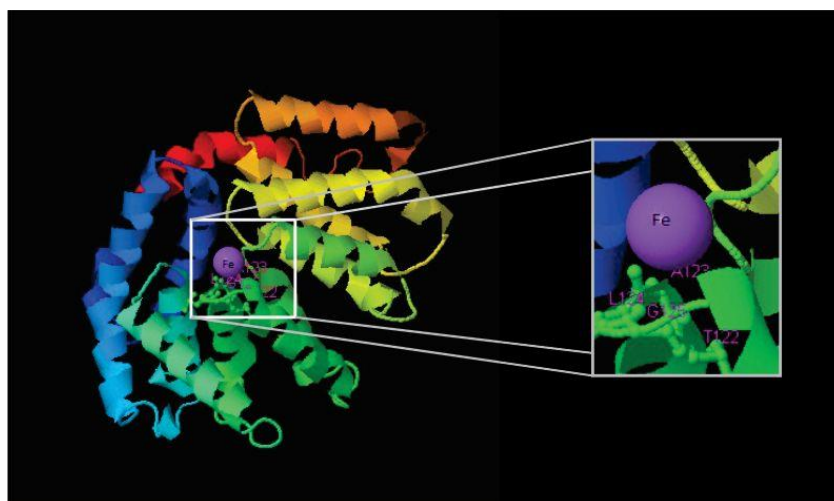


Fig 3 Structural model of metal transporter showing that Fe is the putative ligand. Structural model was obtained by using the I-Tasser software.

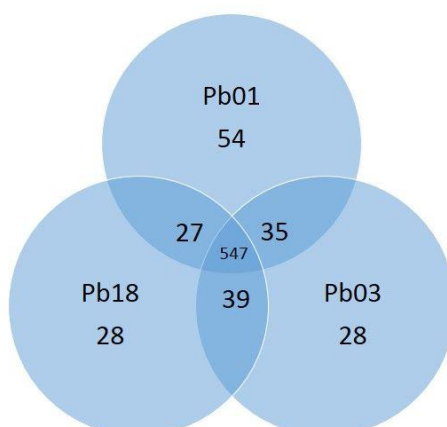


Fig 4 Venn diagram showing the homology comparisons of metalloproteins found in the three species of *Paracoccidioides* spp. The numbers represent the how many proteins are specific or common among the species. The comparison was done by using the Blast tool.

Table 1 – Number of metalloproteins identified in *Paracoccidioides* spp. genome.

<i>Paracoccidioides</i> spp	Predicted proteome	Cu proteins	Fe proteins	Zn proteins
<i>P. lutzii</i>	9136	26 (0.28)	115 (1.25)	522 (5.71)
<i>Pb18</i>	8741	25 (0.28)	115 (1.31)	511 (5.84)
<i>Pb03</i>	7876	26 (0.33)	111 (1.40)	501 (6.38)

Table 2 – Number of proteins with two metal ligand domains.

<i>Paracoccidioides</i> spp	Cu x Fe	Cu x Zn	Fe x Zn
<i>P. lutzii</i>	2	6	34
<i>Pb18</i>	2	5	30
<i>Pb03</i>	2	7	31

Table 3 – Metalloproteins described as virulence factor in fungi.

Pb01 Access Number	Pb03 Access Number	Pb18 Access Number	Protein Description	Reference
PAAG_00610	PABG_05322	PADG_06931	GATA transcription factor	(Hwang et al., 2011)
PAAG_02358	PABG_04857	PADG_05497	GATA factor SREP	(Hwang et al., 2011)
PAAG_04164	PABG_03954	PADG_07418	superoxide dismutase	(Cox et al., 2003)
PAAG_02971	PABG_00431	PADG_02842	cytosolic Cu/Zn superoxide dismutase	(Cox et al., 2003)
PAAG_06363	PABG_02770	PADG_01263	superoxide dismutase	(Cox et al., 2003)
PAAG_02725	PABG_03204	PADG_01755	superoxide dismutase	(Cox et al., 2003)
PAAG_02926	PABG_03387	PADG_01954	superoxide dismutase	(Cox et al., 2003)
PAAG_03681	PABG_00738	PADG_03184	laccase-1	(Zhu et al., 2001)
PAAG_06004	PABG_05667	PADG_05994	laccase- IV	(Zhu et al., 2001)
PAAG_00163	PABG_05183	PADG_07092	laccase- 3	(Zhu et al., 2001)
PAAG_00954	PABG_01291	PADG_03871	urease	(Mirbod-Donovan et al., 2006)
PAAG_00243	None	None	alcohol dehydrogenase IV	(Pancholi & Chhatwal, 2003)
PAAG_08903	PABG_05423	PADG_05734	alcohol dehydrogenase	(Pancholi & Chhatwal, 2003)
PAAG_06916	PABG_02939	PADG_01454	alcohol dehydrogenase	(Pancholi & Chhatwal, 2003)
PAAG_06596	PABG_02619	None	alcohol dehydrogenase	(Pancholi & Chhatwal, 2003)
PAAG_06715	PABG_02727	PADG_01174	alcohol dehydrogenase	(Pancholi & Chhatwal, 2003)
PAAG_05227	PABG_07631	PADG_05031	alcohol dehydrogenase	(Pancholi & Chhatwal, 2003)
PAAG_04541	PABG_04316	PADG_04701	alcohol dehydrogenase	(Pancholi & Chhatwal, 2003)
PAAG_06104	PABG_06552	PADG_08012	fructose-biphosphate aldolase	(Pancholi & Chhatwal, 2003)
PAAG_01995	PABG_02260	PADG_00668	fructose-biphosphate aldolase	(Pancholi & Chhatwal, 2003)
PAAG_02152	PABG_02388	PADG_00743	Class II Aldolase family protein	(Pancholi & Chhatwal, 2003)
PAAG_00557	PABG_03558	PADG_02132	mannose-6-phosphate isomerase	(Pancholi & Chhatwal, 2003)
PAAG_00771	PABG_01457	PADG_04059	enolase	(Pancholi & Chhatwal, 2003)
PAAG_07076	PABG_03073	PADG_01601	M6 family metalloprotease	(Puccia et al., 1998)

Capítulo 3: Anexos

3.0 OUTROS RESULTADOS OBTIDOS DURANTE O MESTRADO

3.1 Quantificação de íons metálicos durante a infecção

Segundo Bailão e colaboradores (2006) os mecanismos de captação de micronutrientes como ferro, cobre e zinco por *Paracoccidioides spp.* ainda não são conhecidos, mas dados transcricionais demonstram prováveis estratégias para captação de tais metais pelo fungo, sugerindo claramente que este fungo depende de estratégias que visem a manutenção da homeostase de metais durante seu processo infeccioso.

Metais de transição tais como cobre, ferro e zinco desempenham funções importantes nos seres vivos (Andreini et. al., 2006), como já previamente citado. Proteínas contendo íons metálicos intrínsecos são uma das classes com maior diversidade, desempenhando papéis estruturais, catalíticos e regulatórios críticos para função proteica e metabólica (Degtvarenko 2000).

Neste trabalho, foi detectado uma diminuição significativa nos níveis de magnésio, manganês, zinco e cobre nas células de levedura recuperadas da infecção nos macrófagos (Tabela 1) (Ver figura 5). Houve também uma clara diminuição nos níveis de ferro nas mesmas células depois da infecção. Em paralelo a isso, foi detectado também um aumento significativo nos níveis de cálcio e cobalto nos macrófagos da linhagem J774 infectados quando comparados com os não infectados do controle (Tabela 1) (Ver figura 6). Estes resultados indicam que a diminuição de Mg, Mn, Zn, Cu e Fe pode ser devido a atuação de mecanismos com o intuito de impedir a sobrevivência do fungo ou também no remanejamento da armazenagem de outros metais entre compartimentos celulares durante a infecção, pois alguns metais não possuem transportadores específicos, sendo assim seu transporte realizado por

transportadores de outros metais com carga ou valência semelhantes, mudando desta maneira a homeostase dos metais que contém transportadores específicos (Martinez-Finley et al., 2012). O aumento de Ca e Co nos macrófagos infectados indicam que estes micronutrientes são importantes ou estão envolvidos nos processos que resultam em uma eficiente resposta imune contra *Paracoccidioides sp.*

Estudos, e resultados semelhantes aos nossos foram obtidos por Winters e colaboradores (2010) visando a quantificação de metais durante a infecção de *Histoplasma capsulatum* em macrófagos, mostraram que os níveis de metais como magnésio, zinco, cobre, manganês e cálcio estavam alterados em relação ao controle. Pode-se concluir com isso que os micronutrientes são realmente importantes para a manutenção ideal dos processos de defesa do hospedeiro bem como para um bom estabelecimento nos tecidos e processos de virulência do patógeno, criando rotas de futuros estudos e alvos de possíveis tratamentos contra este fungo patogênico.

Tabela 1. Quantificação de metais por ICP-MS, de células de macrófagos J774 e *Paracoccidioides sp.* controle e recuperados da infecção. *Diferença significativa com 95% de confiabilidade. Resultados expressos em ng/ml.

Metais	J774	J774	Pb	Pb recuperado
	Controle	Infectado	Controle	Infecção
Mg	330,96	382,56	10174,86*	2245,69
Ca	204,80	583,30*	1344,91	1215,34
Mn	2,93	3,03	51,42*	15,88
Fe	332,43	383,65	1641,97	1350,86
Co	1,04	2,66*	11,74	5,61

Ni	21,39	51,74	95,46	84,61
Cu	34,76	18,93	142,10*	60,19
Zn	140,87	124,53	15003,12*	571,64
Mo	-	-	5,94	4,51

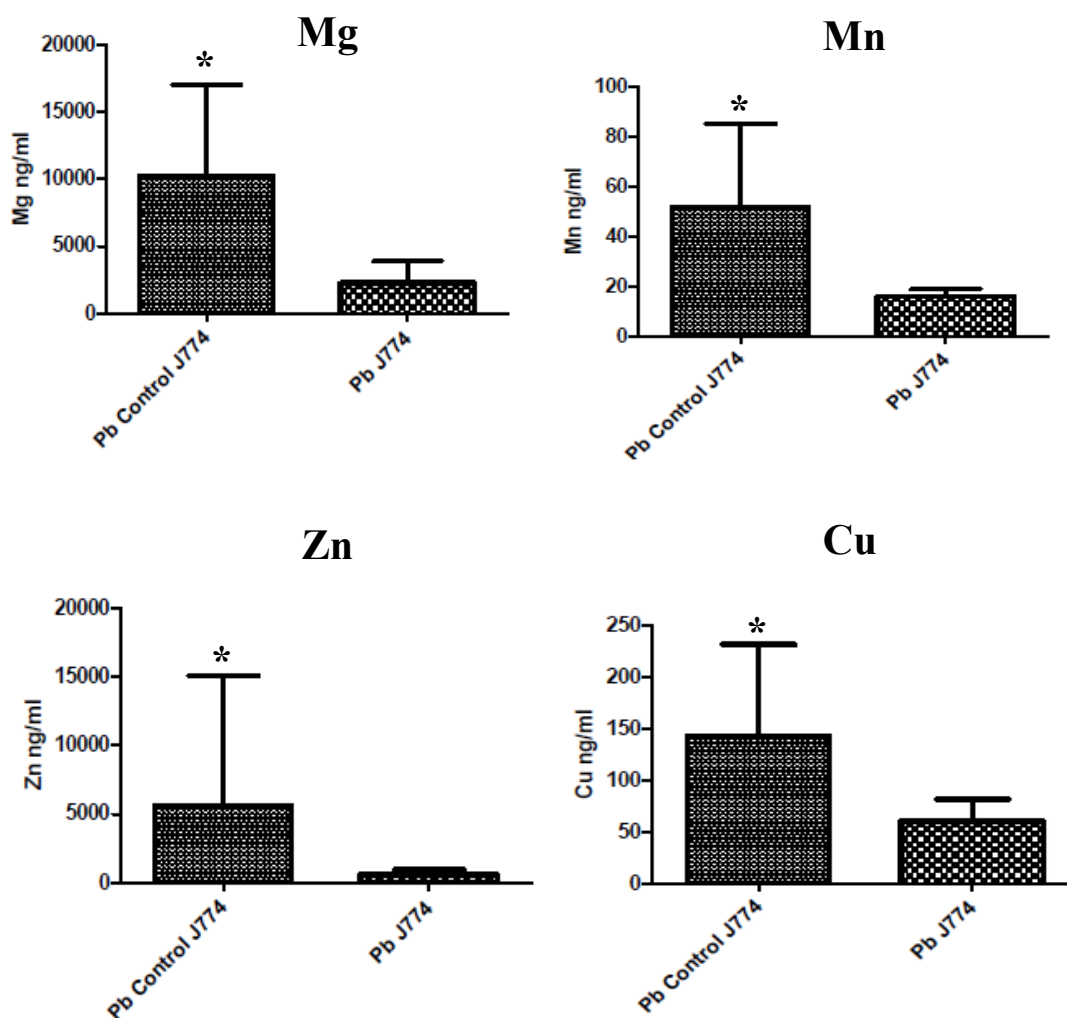


Figura 5. Gráficos dos metais que obtiveram diminuição significativa nas células de levedura de *Paracoccidioides sp.* controle em relação as recuperadas da infecção com macrófagos J774, sendo Pb control J774 as células controle do fungo e Pb J774 as recuperadas da infecção.

*Diferença significativa com 95% de confiabilidade no Teste t de Tukey sendo $p < 0,05$.

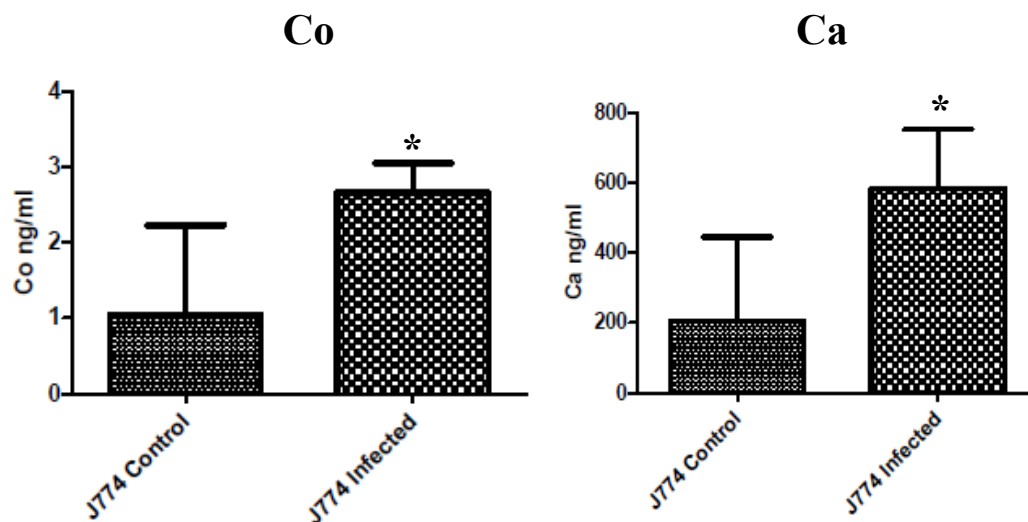


Figura 6. Gráficos dos metais que obtiveram aumento significativo nas células de macrófago J774 controle em relação as recuperadas da infecção, sendo J774 Control as células controle e J774 Infected as recuperadas da infecção. *Diferença significativa com 95% de confiabilidade no Teste t de Tukey sendo $p < 0,05$.

Como houve uma diminuição considerável de ferro nas células do fungo após a infecção, foi avaliada então a importância da disponibilidade de ferro na interação fungo-macrófago. Foram feitas duas infecções, uma sem a adição de ferro no meio de cultura dos macrófagos antes da infecção e outra sendo adicionado citrato ferroso ao meio de cultura dos macrófagos antes da infecção, e posteriormente foi feita a análise da carga fúngica sobrevivente após a infecção. A sobrevivência das células fúngicas provenientes da infecção com macrófagos tratados com citrato ferroso foi significativamente maior do que as células fúngicas recuperadas das culturas não tratadas (Ver figura 7), confirmando então que o ferro é um dos metais importantes durante a infecção de *Paracoccidioides spp.* e que a diminuição de seus níveis durante a infecção sugere uma resposta dos macrófagos na tentativa de diminuir a sobrevivência do fungo durante o processo infeccioso.

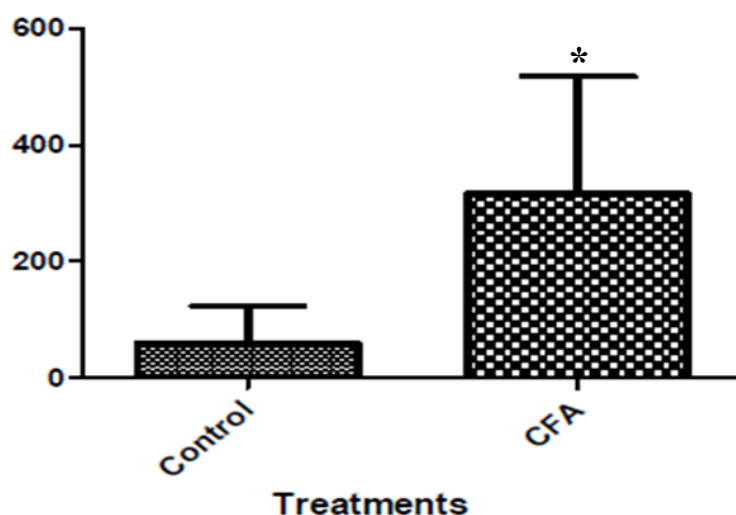


Figura 7. Efeito da disponibilidade de ferro na carga fúngica de *Paracoccidioides sp.* após a infecção em macrófagos. Os dados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônias, sendo que Control foram as células fúngicas recuperadas dos macrófagos não tratados e CFA as células fúngicas recuperadas dos macrófagos tratados com Citrato Ferroso. *Diferença significativa com 95% de confiabilidade no Teste t de Tukey sendo $p < 0,05$.

Os micronutrientes que obtiveram diferença significativa na infecção são realmente importantes para a manutenção ideal dos processos de defesa do hospedeiro bem como para um bom estabelecimento nos tecidos e processos de virulência do patógeno, pois seus níveis se mostraram alterados durante o processo de infecção indicando a necessidade de obtenção destes pelo fungo, e a tentativa de sequestro destes pelos macrófagos, concluindo com isso que estes metais tem papel central na homeostase de ambos, fungo e macrófago durante a interação patógeno-hospedeiro.

Foi observado também que outros metais além de cobre, ferro e zinco participam ativamente da homeostase durante a infecção, como por exemplo o manganês, cobalto e níquel, pois mesmo que esses metais não obtiveram diferenças significativas, apresentaram mudanças em seus níveis, indicando seu

remanejamento e que de alguma forma atuam na homeostase durante a fase da infecção.

Estes resultados criam novas rotas para futuros estudos e alvos para possíveis tratamentos da paracoccidioidomicose e também para melhor entendimento da biologia e processos de atuação do fungo durante a infecção, tendo como base os micronutrientes.

3.2 Análise metaloproteômica de extratos protéicos de *Paracoccidioides spp.*

Com o objetivo de iniciar estudos sobre metaloproteínas de *Paracoccidioides sp.* que até então se mostraram pouco estudadas, foram obtidos extratos protéicos de micélio e levedura da espécie filogenética Pb01 de *Paracoccidioides spp.* Os extratos protéicos foram obtidos a partir do cultivo do fungo em meio líquido Fava-Neto a 23°C para micélio e 36° para levedura e analisados em gel SDS-PAGE como mostrado na Figura 8.

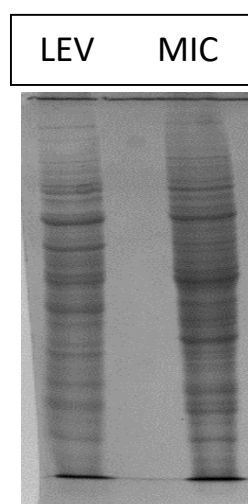


Figura 8. Extratos proteicos de Levedura (LEV) e Micélio (MIC) de *Paracoccidioides spp.* espécie filogenética Pb01, em gel SDS-PAGE.

Primeiramente então foi feita a quantificação de íons metálicos destes extratos proteicos através de Espectrometria de Indução por Plasma (ICP-MS) com o intuito de identificar qual o metal mais abundante dentre as duas fases de vida do fungo. Observou-se que o íon ferro foi o metal mais abundante presente nos extratos de *Paracoccidioides sp.* seguido por cobre e zinco. Tal observação é suportada pelo fato do íon ferro ser o metal mais abundante nos organismos vivos, devido a sua importância de oxido-redução e nos processos que geram energia celular (Andreini, *et. al.*, 2006) (Ver figura 9).

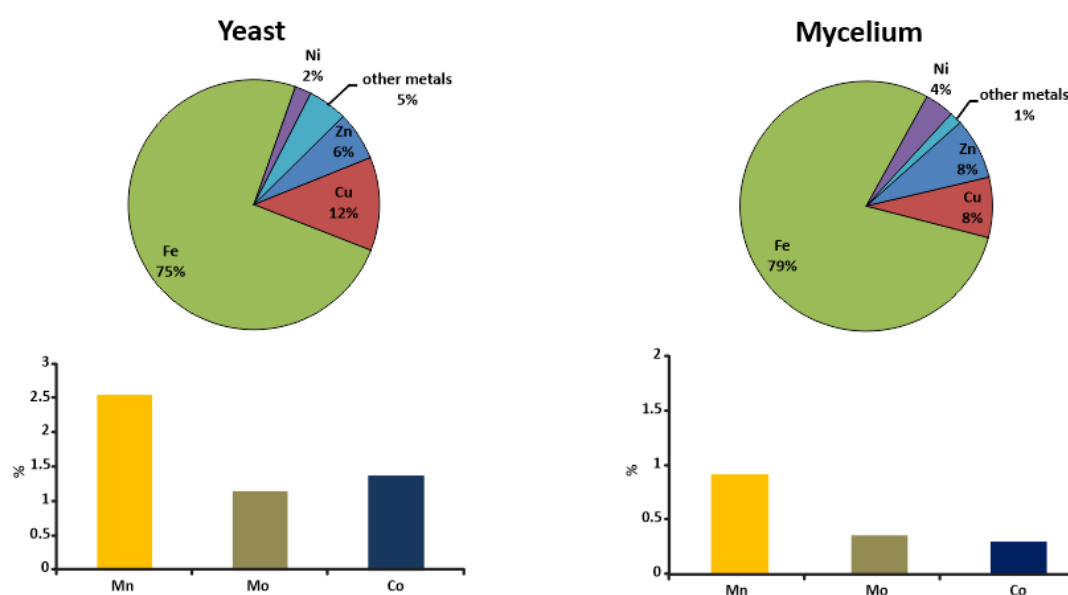


Figura 9. Quantificação do total de metais por ICP-MS presentes nos extratos protéicos de levedura e micélio de *Paracoccidioides sp.* (Pb01).

Posterior a isso, os extratos passaram por uma análise de Cromatografia Líquida de Separação acoplada a Espectrometria de Indução por Plasma (SEC-ICP-MS) que permite a separação e o fracionamento das proteínas contidas em

uma determinada amostra e também detecta simultaneamente os elementos, neste caso os metais, presentes nos picos de fracionamento, fornecendo desta maneira dados referentes a metaloproteínas contidas nas amostras.

Surpreendentemente foi observada uma diferença significativa na quantidade de cobre, manganês, zinco e níquel e também no tipo de metaloproteínas destes metais entre as fases de micélio e levedura, devido aos diferentes picos de fracionamento que indicam proteínas de tamanhos diferentes, na espécie filogenética Pb01 (Ver figura 10) indicando um diferente remanejamento da homeostase e também um diferente armazenamento destes metais entre essas fases de vida do fungo.

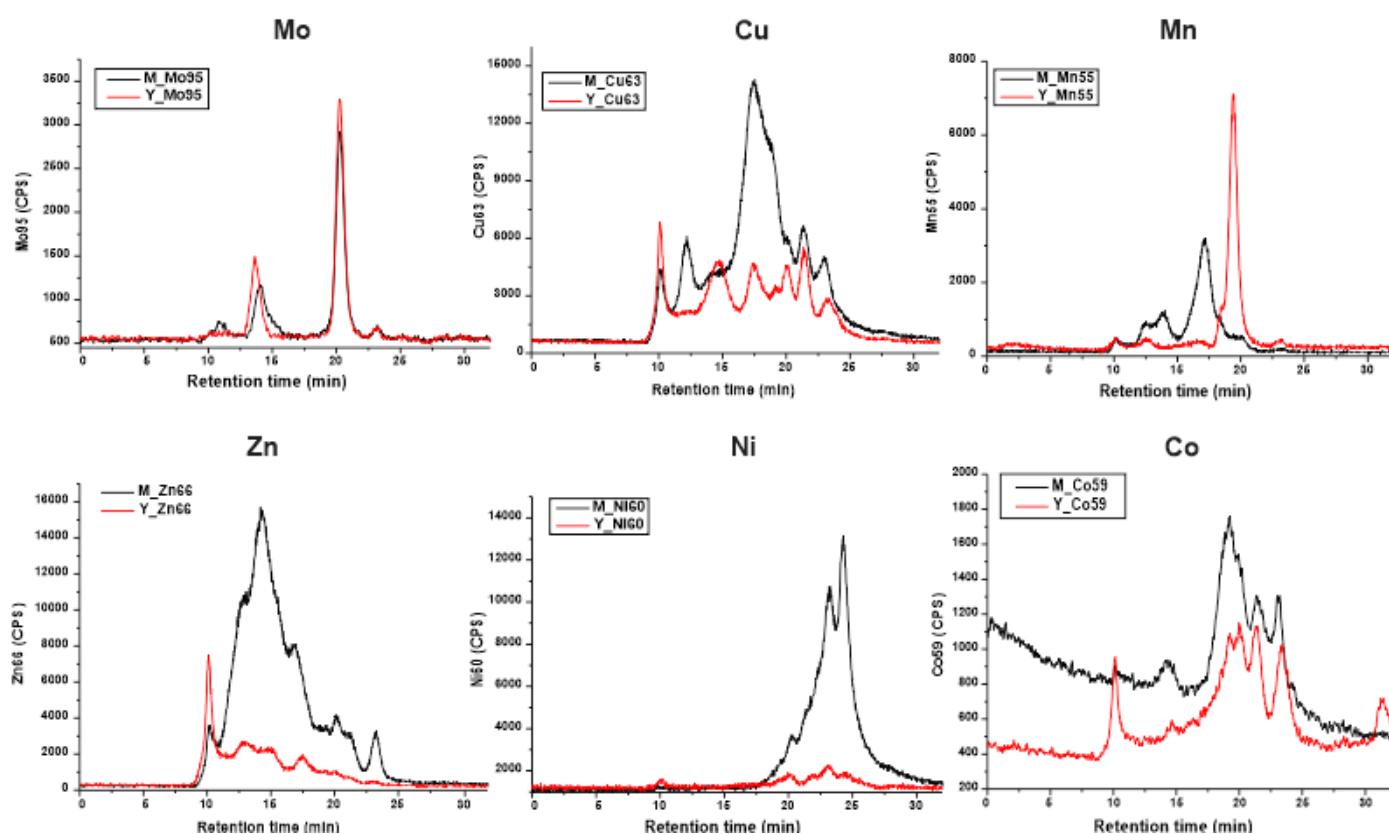


Figura 10. Análise de SEC-ICP-MS de extratos protéicos de micélio e levedura de Pb01.

A fase de micélio apresentou ter maior quantidade de metaloproteínas associadas a cobre, zinco e níquel em comparação com a fase de levedura. Essa diferença pode estar relacionada com a obtenção destes metais no meio ambiente e seu armazenamento em compartimentos celulares ou em metalotioeninas (Raja et al., 2013). Essa estocagem pode ser uma estratégia utilizada nas fases iniciais de infecção, onde o fungo precisa transitar de micélio para levedura nos epitélios pulmonares do hospedeiro, sendo que neste momento existe uma mudança drástica de ambiente e também na disponibilidade destes metais para o fungo, devido ao fato de que uma das principais estratégias das células do hospedeiro é limitar o acesso do fungo a estes micronutrientes. Essa estocagem de metaloproteínas na fase miceliana pode servir então como uma prevenção e uma resposta a estes obstáculos da fase inicial da infecção.

Na fase de levedura houve uma diferença na quantidade de metaloproteínas associadas a manganês em comparação com a fase de micélio, indicando a importância deste metal nessa fase de vida do fungo. O manganês é o cofator de muitas proteínas de combate ao stress causado pelos mecanismos de defesa das células hospedeiras, como por exemplo as superóxido dismutases, que são proteínas responsáveis pela resposta ao stress oxidativo que o fungo sofre durante a infecção. Desta maneira o acúmulo deste metal nesta fase deve estar relacionado com algum mecanismo de persistência do fungo nos sítios de infecção.

Como foi observado, os metais são de grande importância para a biologia do fungo *Paracoccidioides spp.* Independente da sua fase de vida, o fungo

exerce mecanismos de obtenção e armazenamento destes metais, bem como emprega estratégias para manter a homeostase dos mesmos.

A medida que os futuros estudos se aproximarem mais dentro deste contexto, da relação intrínseca do fungo com estes micronutrientes, novas estratégias poderão ser traçadas, tanto nas áreas novas e emergentes da metalômica e metaloproteômica, como também no conhecimento e aprofundamento dos mecanismos que o fungo utiliza e sua dependência de íons metálicos.

4.0 CONCLUSÕES ATÉ O PRESENTE MOMENTO

Os resultados aqui obtidos mostraram até o presente momento de forma clara que as técnicas utilizadas nos campos da metalômica e metaloproteômica se mostraram satisfatórias e promissoras, abrindo portas e surgindo como alternativas para futuros estudos e estratégias de pesquisa.

Os níveis dos íons metálicos de magnésio, cálcio, manganês, cobalto, cobre e zinco, se mostraram alterados durante a infecção sugerindo a participação destes elementos na complexa interação fungo-macrófago, e intensificando o conceito da importância destes elementos na homeostase tanto do fungo quanto do macrófago.

Foi observado na análise metaloproteômica dos extratos protéicos que o ferro foi o elemento mais abundante tanto na fase de micélio quanto na fase de levedura do fungo, seguido de cobre e zinco. Foi observado também que houve uma diferença significativa nos níveis de cobre, zinco e níquel de micélio comparada com a fase de levedura, indicando a importância destes metais na fase miceliana e uma diferença nos níveis de manganês na fase de levedura comparada com a de micélio.

Conclui-se desta forma que os íons metálicos de transição apresentam uma grande importância para os sistemas biológicos do fungo *Paracoccidioides spp.* podendo ter participação significativa na regulação de diversos processos metabólicos e são essenciais na sobrevivência do fungo dentro das células e tecidos do hospedeiro.

5.0 MATERIAL E METODOS DOS RESULTADOS OBTIDOS DURANTE O MESTRADO

5.1. Manutenção de *Paracoccidioides spp.*

Em todos os experimentos foram utilizados os isolados “Pb01 (ATCCMYA-826)” e “Pb18 (ATCC-32069)” de *Paracoccidioides spp.* A fase de levedura foi mantida *in vitro* com crescimento a 36 °C, em meio Fava-Neto por 7 dias (Fava-Neto, 1995) e em seguida foi transferida para o meio Fava-Neto líquido e cultivado a 36 °C por 72 horas até a fase exponencial, onde foram feitas as infecções.

5.2 Manutenção dos macrófagos eternizados J774

Os macrófagos J774 (ATCC TIB-67) foram obtidos através do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), sendo o número do lote de compra J774 A.1 (000074).

Estes foram mantidos em meio RPMI 1640 (Biowhittaker, Walkersville, Md.) suplementado com soro fetal bovino (FBS) à 10% e solução de aminoácidos essenciais à 1% em garrafas de cultivo celular sendo incubados em estufa própria para cultivo celular a 37 °C sob 5 % de atmosfera de CO₂. De 72h em 72h foi feito repique para multiplicação e manutenção dos macrófagos. Foi realizado também um acompanhamento diário para avaliar o crescimento dos macrófagos e evitar possíveis contaminações.

5.3 Infecção experimental

Os macrófagos aderidos na superfície das garrafas de cultivo foram raspados e transferidos para tubos cônicos de 50ml com PBS 1x e centrifugados à 2.500 rpm por 10min. Após isso foram ressuspensos em meio RPMI e contados na câmara de Newbauer, sendo a concentração ajustada para $1,0 \times 10^6$ cél/ml. 500ul deste volume final foi então inoculado em cada “poço” da placa de infecção, sendo que dessa maneira cada poço da placa continha $5,0 \times 10^5$ cél/mL de macrófagos. A seguir foi inoculada uma concentração de $1,25 \times 10^6$ cél/ml de leveduras de *Paracoccidioides sp.* A proporção final da infecção desta maneira foi de 2,5 células do fungo para cada 1 macrófago. Foi feito também os inóculos controle, onde placas foram inoculadas apenas com macrófagos e outras apenas com leveduras do fungo, nas suas respectivas concentrações.

5.4 Recuperação da infecção

O sobrenadante de cada poço de infecção foi retirado e o mesmo lavado duas vezes com 1ml de PBS 1x. Após a lavagem foi colocado 100ul de SDS na concentração de 0,1% em cada poço e a placa foi colocada na estufa por 15min a 37 °C para que ocorresse a lise dos macrófagos. Depois disto o volume de cada poço foi então transferido para tubos de 1,5 ml que foram centrifugados a 10.000 rpm por 10min. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, sendo este volume correspondente aos macrófagos recuperados da infecção, e o precipitado que ficou no tubo original, sendo as células do fungo. As amostras de macrófago passaram pelo processo de quantificação e posterior liofilização, e as amostras do fungo passaram também por liofilização e depois normalizadas por peso seco.

5.5 Obtenções de extratos proteicos de micélio e de levedura

Os extratos proteicos de levedura e micélio dos isolados Pb01 e Pb18 de *Paracoccidioides spp.* foram obtidos a partir do cultivo dos fungos em meio Fava-Neto (Fava-Neto, 1995) semi-sólido por 7 dias e, depois, as células foram transferidas para o meio Fava-Neto líquido e incubadas por 72 horas a 37°C para levedura e 7 dias a 22°C para micélio, sob agitação, a 150 rpm. Posteriormente, as células foram centrifugadas (4000 rpm), lavadas com PBS 1x duas vezes em falcons, ressuspensas com tampão PBS 1x e transferidas para tubos de extração contendo pérolas de vidro, onde foram agitadas com auxílio de Beadbeater. O lisado foi centrifugado duas vezes para retirada de restos celulares. Os extratos proteicos foram quantificados pelo método de Bradford (Bradford, 1976), com auxílio de leitor de ELISA, e por fim foram liofilizados e normalizados por peso seco. Todos os materiais utilizados foram antes tratados com ácido nítrico para a retirada de possíveis metais contaminantes.

5.6 Tratamento com Ácido Nítrico

Todos os materiais utilizados para os testes de infecção e para a obtenção dos extratos proteicos de micélio e levedura foram tratados com solução de ácido nítrico a 10% para a solubilização, lavagem e retirada de possíveis metais contaminantes do ambiente. Para isso os materiais utilizados foram lavados com a solução de ácido nítrico a 10% e deixados de repouso por 24 horas. Posteriormente foram lavados com água bidestilada e deixados em repouso por 24 horas. Depois de secos foram utilizados nos experimentos.

5.7 Análise dos metais por ICP-MS

As amostras obtidas dos experimentos da infecção e das extrações protéicas foram submetidas para as análises de metais. A identificação e quantificação dos metais foi feita utilizando-se o espectrômetro de massas ICP-MS 7500ce (Agilent Technologies) na Universidade de Cincinnati, em Santa Clara, CA, USA. Este equipamento é equipado com uma célula octapolo e pode ser operado com ou sem gás de colisão. O sistema de introdução de amostras sob condições de plasma padrão é constituído por um nebulizador *Meinhard*, uma câmara de esprei refrigerada Peltier (2C) e uma fonte de excitação ao estado de plasma. Os dados foram expressos em ng/ml.

5.8 Análise dos extratos proteicos por HPLC-ICP-MS

As amostras obtidas das extrações proteicas de micélio e levedura dos isolados Pb01 e Pb18 foram submetidas primeiramente a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) para a separação das metaloproteínas, contidas nas amostras, por exclusão de tamanho. Essa técnica consiste na passagem da amostra através de capilares ultra finos que geram uma grande pressão, onde colidem com a coluna de separação acarretando a separação das partículas por tamanho. O HPLC foi acoplado ao ICP-MS que simultaneamente a separação das metaloproteínas permitiu a identificação e quantificação dos metais nas amostras.

5.9 Análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente através do Teste t de Tukey, com 95% de confiabilidade, sendo $p < 0,05$.

6.0 BIBLIOGRAFIA

Alberts, K.; Nadassy, S.J.; Wodak, F. Analysis of zinc binding in protein crystal structures. **Protein science**. 1998.

Andreini, C.; Bertini, I.; Rosato, A. A hint to search for metalloproteins in gene banks. **Bioinformatics**. 2004.

Andreini, C.; Bani, L.; Bertini, I.; Rosato, A. Zinc through the three domains of life. **J. Proteome Res**. 2012.

Andreini, C.; Bertini, I.; Cavallaro, G.; Holliday, L.G.; Thorton, J.M. Metal MACiE: a database of metals involved in biological catalysis. **Bioinformatics**. 2009.

Aisen, P. Transferrin receptor 1. **J. Biochem. Cell Biol**. 2004.

Anderson, G.J.; Darshan, D.; Wilkins, S.J.; Frazer, D.M. Regulations of systemic iron homeostasis: How the body responds to changes in iron demand. **Biometals**. 2007.

Appelberg, R. Macrophage nutritive antimicrobial mechanisms. **Journal of Leukocyte Biology**. 2006.

Basu, P. Microbial metallomics. **Metallomics**. 2013.

Bailão, A.M.; Schrank, A.; Borges, C.L.; Dutra, V.; Walquíria Inês Molinari-Maldum, E.E.; Soares Felipe, M.S.; Soares Mendes-Gianinni, M.J.; Martins, W.S.; Pereira, M.; Soares, C.M.A. Differential gene expression by *Paracoccidioides brasiliensis* in host interaction conditions: representational difference analysis identifies candidate genes associated with fungal pathogenesis. **Microbes Infect**. 2006.

Beaudoin, J. & Labbe, S. Crm1-mediated nuclear export to the *Schizosaccharomyces pombe* transcription factor Cuf1 during a shift from low to high copper concentrations. **Eukaryotic Cell**. 2007.

Beaudoin, J.; Thiele, DJ.; Labbe, S.; Puig, S. Dissection of relative contribution of the *Schizosaccharomyces pombe* Ctr4 and Ctr5 proteins to the copper transport and cell surface delivery functions. **Microbiology**. 2011.

Bertini, I. & Cavallaro, G. Bioinformatics in bioinorganic chemistry. **Metallomics**. 2009.

Bertini, I. & Rosato, A. From genes to metalloproteins: A bioinformatic approach. **Eur. J. Inorg. Chem.** 2007.

Bleackley, MR. & Macgillivray, RT. Transition metal homeostasis: from yeast to human disease. **Biometals**. 2011.

Boal, AK.; Rosenzweig, AC. Structural biology of copper trafficking. **Chemical Reviews**. 2009.

Bowman, BJ.; Abreu, S.; Johl, JK.; Bowman, EJ. The *Pmr* gene, encoding a Ca²⁺-ATPase, is required for calcium and manganese homeostasis and normal development of hyphae and conidia in *Neurospora crassa*. **Eukaryotic Cell**. 2012.

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

Brummer, E.; Castaneda, E.; Restrepo, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin. Microbiol. Rev.** 1993.

Chan, TY. Inorganic mercury poisoning associated with skin-lightening cosmetic products. **Clin. Toxicol.** 2011.

Citiulo, F.; Jacobsen, ID.; Miramon, P.; Schild, L.; Brunke, S.; Zinfel, P.; Brock, M.; Hube, B.; Wilson, D. *Candida albicans* scavenge host zinc via Pra1 during endothelial invasion. **Plos Pathogens**. 2012.

Coutinho, ZF.; Silva, D.; Lazerda, M.; Petri, V.; Oliveira, RM.; Sabrosa, PC.; Wanke, B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil. **Cad. Saúde Pública**. 2002.

Colvin, RA.; Holmes, WR.; Fontaine, CP.; Maret, W. Cytosolic zinc buffering and muffling: Their role in intracellular zinc homeostasis. **Metallomics**. 2010.

Denic, S. & Agarwal, MM. Nutritional iron deficiency: an evolutionary perspective. **Nutrition**. 2007.

Degtvarenko, K. Bioinorganic motifs: Towards functional classification of metalloproteins. **Bioinformatics**. 2000.

Doherty, CP. Hos-pathogen interactions: The role of iron. **J. Nutr**. 2007.

Dudev, T. & Lim, C. Metal binding affinity and selectivity in metalloproteins: Insights from computational studies. **Annu. Rev. Biophys**. 2008.

Eide, DJ. Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. **Molecular Cell Research**. 2006.

Festa, RA. & Thiele, DJ. Copper: An essential metal in biology. **Current Biology**. 2011.

Festa, RA. & Thiele, DJ. Copper at the front line of the host-pathogen battle. **Plos Pathogens**. 2012.

Franco, M. Host-Parasite relationships in Paracoccidioidomycosis. **Journal of Medical and Veterinary mycology**. 1994.

Gravi, TE.; Paschoalin, T.; Dias, BR.; Moreira, FD.; Belizario, JE.; Oliveira, E.; Carmona, AK.; Juliano, MA.; Travassos, LR.; Rodrigues, EG. Identification of metallopeptidase with TOP-like activity in *Paracoccidioides brasiliensis* with increased expression in a virulent strain. **Medical Mycology**. 2012.

Gaither, LA. & Eide, DJ. Eukaryotic zinc transporters and their regulation. **Biometals**. 2001.

Hood, MI. & Skaar, EP. Nutritional immunity: Transition metals at the pathogen-host interface. **Nat. Rev. Microbiol**. 2013.

Hodgkinson, V. & Petri, MJ. Copper homeostasis at the host-pathogen interface. **Journal of Biological Chemistry**. 2012.

Hsieh, IS.; Castruita, M.; Malasarm, D.; Urzica, E.; Eerde, J.; Dudley, PM.; Yamasaki, H.; Casero, D.; Pellegrini, M.; Merchant, SS.; Loo, JA. The proteome of copper, iron, zinc and manganese micronutrient deficiency in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Molecular & Cellular Proteomics**. 2013.

Ibrahim, AS.; Spellberg, B.; Edwards, J. Iron acquisition: A novel perspective on mucomycosis pathogenesis and treatment. **Curr. Opin. Infect. Dis.** 2008.

Jacobson, ES.; Goodner, AP.; Nyhus, KJ. Ferrous iron uptake in *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**. 1998.

Kim, JH.; Furzey, AK.; Tonelli, M.; Ta, DT.; Westler, WM.; Vickery, LE.; Marckley, JL. Structure and dynamics of the iron-sulfur cluster assembly scaffold protein IscU and its interaction with the cochaperone HscB. **Biochemistry**. 2009.

Kornitzer, D. Fungal mechanisms of host iron acquisition. **Curr. Opin. Microbiol**. 2009.

Lacaz, CS.; Vidal, MS.; Heins-Vaccari, EM.; de Melo, MT.; Del-Negro, GM.; Arriagada, GL.; Freitas, S. *Paracoccidioides brasiliensis* a mycologic and immunochemical study of two strains. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**. 1999.

Lill, R. & Muhlenhoff, U. Maturation of Iron-Sulfur proteins in eukaryotes: Mechanisms, connected processes and diseases. **Annu. Rev. Biochem**. 2008.

Lukianova, OA. & David, SS. A role for iron-sulfur clusters in DNA repair. **Curr. Opin. Chem. Biol**. 2005.

Lobinski, R.; Schaumloffel, D.; Szpunar, J. Mass spectrometry in bioinorganic analytical chemistry. **Mass Spectrometry Review**. 2006.

Maret, W. Metalloproteomics, metalloproteomes and the annotation of metalloproteins. **Metallomics**. 2009.

Marcotte, EM.; Pellegrini, M.; Thompson, MJ.; Yeates, TO.; Eisenberg, D. A combined algorithm for genome-wide prediction of protein function. **Nature**. 1999.

Marques, AS. Paracoccidioidomycosis: Epidemiological, clinical, diagnostic and treatment up-dating. **Continuing Medical Education**. 2013.

Martinez-Finley, EJ.; Chakraborty, S.; Fretham, SJB.; Aschner, M. Cellular transport and homeostasis of essential and non essential metals. **Metallomics**. 2012.

Matute, DR.; McEwen, JG.; Puccia, R.; Montes, BA.; San-Blas, G.; Bagagli, E.; Rauscher, JT.; Restrepo, A.; Morais, F.; Nino-Vega, G.; Taylor, JW. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Mol. Biol. Evol.** 2006.

Nairz, M.; Schroll, A.; Sonnweber, T.; Weiss, G. The struggle for iron – a metal at the host-pathogen interface. **Cellular Microbiology**. 2010.

Netz, DJA.; Stith, CM.; Stumpfig, M.; Kopf, G.; Vogel, D.; Geneau, HM.; Stodola, JL.; Lill, R.; Burgers, PM.; Pierik, AJ. Eukaryotic DNA polymerase require an iron-sulfur cluster for the formation of active complexes. **National Institutes of Health**. 2012.

Nevitt, T. War-Fe-re: Iron at the core of fungal virulence and hos immunity. **Biometals**. 2011.

Parente, AFA.; De Rezende, TCV.; De Castro, KP.; Parente, JA.; Borges, CL.; Silva, LP.; Soares, CMA. A proteomic view of the response of *Paracoccidioides* yeast cells to zinc deprivation. **Fugal Biology**. 2013.

Permyakov, E. Metalloproteomics. **Jonh Wiley & Sons, Inc. Ed. 1. Pg: 105-122**. 2009.

Pigosso, LL.; Parente, AFA.; Coelho, ASG.; Silva, LP.; Borges, CL.; Bailão, AM.; Soares, CMA. Comparative proteomics in the genus *Paracoccidioides*. **Fungal Genetics and Biology**. 2013.

Prado, M.; Silva, MB.; Laurenti, R.; Travassos, LR.; Taborda, CP. Mortality due to systemic mycosis as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: A review from 1996 to 2006. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 2009.

Raja, MR.; Waterman, SR.; Qiu, J.; Bleher, R.; Williamson, PR.; Halloran, VO. A copper hyperaccumulation phenotype correlates with pathogenesis in *Cryptococcus neoformans*. **Metallomics.** 2013.

Ratledge, C. & Dover, LG. Iron metabolism in pathogenic bacteria. **Microbiology.** 2000.

Rosch, LM.; Sherman, AR.; Layman, DK. Iron deficiency impairs protein synthesis in immune of rat pups. **J. Nutr.** 1987.

Samanovic, MI.; Ding, C.; Thiele, DJ.; Darwin, HK. Copper in microbial pathogenesis: Meddling with the metal. **Cell Host & Microbe.** 2012.

San-Blas, G.; Nino-Vega, G.; Iturriaga, T. *Paracoccidioides brasiliensis* and Paracoccidioidomycosis: Molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Med. Mycol.** 2002.

Sevcenco, AM.; Pinkse, MWH.; Wolterbeek.; HTh.; Verhaert, PDEM.; Hagen, WR.; Hagedorn, PL. Exploring the microbial metalloproteome using MIRAGE. **The Royal Society of Chemistry.** 2011.

Silva, MG.; Schrank, A.; Bailão, EFLC.; Bailão, AM.; Borges, CL.; Staats, CC.; Parente, JA.; Pereira, M.; Salem-Izaac, SM.; Mendes-Gianinni, MJS.; Oliveira, RMZ.; Silva, LKR.; Nosanchuck, JD.; Vainstein, MH.; Soares, CMA. The homeostasis of iron, copper and zinc in *Paracoccidioides brasiliensis*, *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, and *Cryptococcus gattii*: a comparative analysis. **Frontiers in Microbiology.** 2011.

Simm, C.; Lahner, B.; Salt, D.; LeFurgey, A.; Ingram, P.; Yandell, B.; Eide, JD. *Saccharomyces cerevisiae* vacuole in zinc storage and intracellular zinc distribution. **Eukaryotic Cell.** 2007.

Schneider, RO.; Fogaça, NSS.; Kmetzch, L.; Schrank, A.; Vainstein, MH.; Staats, CC. Zap1 regulates zinc homeostasis and modulates virulence in *Cryptococcus gattii*. **Plos One.** 2012.

Sun, X.; Xiao, C.; Ge, R.; Yin, X.; Li, H.; Li, N.; Yang, X.; Zhu, H.; He, X.; He, KY. Putative copper – and zinc-binding motifs in *Streptococcus pneumoniae* indentified by immobilized metal affinity chromatography and mass spectrometry. **Proteomics**. 2011.

Shi, W. & Chance, MR. Metallomics and Metalloproteomics. **Cellular and Molecular Life Sciences**. 2008.

Shi, H.; Bencze, KZ.; Stemmler, TL.; Philippott, CC. A cytosolic iron chaperone that delivers iron to ferritin. **Science**. 2008.

Tatusov, RL.; Koonin, EV.; Lipman, DJ. A genomic perspective on protein families. **Science**. 1997.

Teixeira, MM.; Theodoro, RC.; Carvalho, MJA.; Fernandes, L.; Paes, HE.; Hahn, RC.; Mendoza, L.; Bagagli, E.; San-Blas, G.; Felipe, MSS. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 2009.

Tóbon, AM.; Agudelo, CA.; Osorio, ML.; Alvarez, DL.; Arango, M.; Cano, LE.; Restrepo, A. Residual pulmonary abnormalities in adult patients with chronic Paracoccidioidomycosis: Prolonged follow-up after itraconazole therapy. **Clinical Infectious Diseases**. 2003.

Tomalová, I.; Foltynova, P.; Kanicky, V.; Preisler, J. MALDI-MS and ICP-MS detection of a single CE separation record: A toll for Metalloproteomics. **Analytical Chemistry**. 2013.

Torres, I.; Garcia, AM.; Hernandez, O.; Gonzalez, A.; McEwen, JG.; Restrepo, A.; Arango, M. Presence and expression of the mating type locus in *Paracoccidioides brasiliensis* isolate. **Fungal Genetics and Biology**. 2010.

Troxell, B.; Ye, M.; Yang, Y.; Carrasco, SE.; Lou, Y.; Yang, XF. Manganese and zinc regulate virulence determinants in *Borrelia burgdorferi*. **American Society of Microbiology**. 2013.

Valencia, A. Automatic annotation of protein function. **Curr. Opin. Struct. Biol**. 2005.

Van Ho, A.; Ward, DM.; Kaplan, J. Transition metal transport in yeast. **Annu. Rev. Microbiol.** 2002.

Vignesh, KS.; Landero-Figueroa, JA.; Parollo, A.; Caruso, JA.; Deepe, GS. Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor induced zinc sequestration enhances macrophage superoxide and limits intracellular pathogen survival. **Immunity.** 2013.

Weinberg, ED. The role of iron in protozoan and fungal infectious diseases. **Eukaryot Microbiol.** 2009.

Wilson, D.; Citiulo, F.; Hube, B. Zinc exploitation by pathogenic fungi. **Plos Pathogens.** 2012.

Winters, MS.; Chan, Q.; Caruso, JA.; Deep, GSJr. Metallomic analysis of macrophages infected with *Histoplasma capsulatum* reveals a fundamental role for zinc in host defences. **The Journal of Infectious Diseases.** 2010.

Wrobel, K.; Caruso, JA. Epigenetics: An important challenge for ICP-MS in metallomics studies. **Anal Bioanal Chem.** 2009.

Zhao, H. & Eide, D. The Zrt2 gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.** 1996.

Zerckle, AL.; House, CH.; Cox, RP.; Canfield, DE. Metal limitation of cyanobacterial N² fixation and implications for the Precambrian nitrogen cycle. **Geobiology.** 2005.