



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

Igor Godinho Portis

Análise proteômica em células leveduriformes do fungo
Paracoccidioides sp. em excesso de cobre

Goiânia
2015

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

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

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

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Nome completo do autor: Igor Godinho Portis

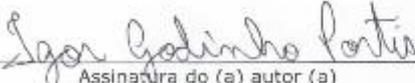
Título do trabalho:

Análise proteômica em células leveduriformes do fungo *Paracoccidioides* sp. em excesso de cobre

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: 20/12/2016

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



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

Análise proteômica em células leveduriformes do fungo
Paracoccidioides sp. em excesso de cobre

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Goiás, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Genética e Biologia
Molecular do Instituto de Ciências
Biológicas, como requisito para
obtenção do título de Mestre.

Orientando: Igor Godinho Portis

Orientadora: Dra. Célia Maria de Almeida Soares

Co-Orientadora: Patrícia de Sousa Lima

Goiânia

2015

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

Portis, Igor Godinho

Análise proteômica em células leveduriformes do fungo *Paracoccidioides* sp. em excesso de cobre [manuscrito] / Igor Godinho Portis, Patrícia de Sousa Lima, Célia Maria de Almeida Soares. - 2015.

LXV, 65 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Célia Maria de Almeida Soares; co orientadora Dra. Patrícia de Sousa Lima.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Goiânia, 2015.

Bibliografia.

Inclui fotografias, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, algoritmos, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Fungo. 2. Metabolismo. 3. Melanina. 4. Virulência. 5. Biologia molecular. I. Lima, Patrícia de Sousa. II. de Almeida Soares, Célia Maria. III. de Almeida Soares, Célia Maria, orient. IV. Lima, Patrícia de Sousa, co-orient. V. Título.

CDU 577.2



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

1 **ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Nº 025**

2 Aos vinte e quatro dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e quinze, às
3 quatorze horas, na Sala 10 do ICB IV, Campus II, UFG, reuniram-se os
4 componentes da banca examinadora: **Profa. Dra. Célia Maria de Almeida**
5 **Soares, Prof. Dr. Clayton Luiz Borges e Profa. Dra. Lilian Cristiane**
6 **Baeza** para, em sessão pública presidida pelo primeiro examinador citado,
7 procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: "**Análise**
8 **proteômica em células leveduriformes do fungo *Paracoccidioides sp.***
9 **Em excesso de cobre**", em nível de mestrado, área de concentração em
10 **Genética e Biologia Molecular**, de autoria de **Igor Godinho Portis**,
11 discente do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da
12 Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo presidente, que fez a
13 apresentação formal dos membros da banca. A palavra, a seguir, foi concedida
14 ao autor da dissertação que, em cerca de 20 minutos, procedeu à
15 apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da
16 banca arguiu ao examinado, tendo-se adotado o sistema de diálogo
17 sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da
18 dissertação. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº 955/26 de
19 fevereiro de 2010 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura
20 (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Genética e
21 Biologia Molecular, a dissertação foi APROVADA, considerando-se
22 integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de
23 Mestre em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Federal de Goiás. A
24 conclusão do curso dar-se-á quando da entrega da versão definitiva da
25 dissertação na secretaria do programa, com as devidas correções sugeridas
26 pela banca examinadora, no prazo de trinta dias a contar da data da defesa.
27 Cumpridas as formalidades de pauta, às 16 horas e 15 minutos,
28 encerrou-se a sessão de defesa e, para constar, eu, Lorena Reis Pinho,



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR
29 Assistente em Administração da Universidade Federal de Goiás, lavrei a
30 presente ata que, após lida e aprovada, será assinada pelos membros da
31 banca examinadora em três vias de igual teor.

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

Profa. Dra. Célia Maria de Almeida Soares

ICB/UFG

Prof. Dr. Clayton Luiz Borges

ICB/UFG

Profa. Dra. Lilian Cristiane Baeza

ICB/UFG

“Não precisamos apagar a luz do próximo para que a nossa brilhe” Mahatma Gandhi

Agradecimentos

Meus agradecimentos a minha orientadora, Dra. Célia Maria de Almeida Soares, pela confiança concedida, por fazer esse projeto ser realizado e por ser o grande exemplo de pesquisadora.

À co-orientadora Patrícia de Sousa Lima, pela paciência, disponibilidade, pela ajuda na realização do trabalho e amizade.

À pós-doutoranda Laurine Pigosso que me auxiliou nos experimentos e a ajuda foi imprescindível para a realização do trabalho.

À todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFG.

À Universidade Federal de Goiás (UFG).

Ao Laboratório de Biologia Molecular.

Aos órgãos fomentadores de pesquisa CAPES, CNPq, FAPEG.

Aos fiéis companheiros do LBM Alessandro, André, Gabriel, Leandro Prado, Edilânia, Danielle, Kássio, Tathy, Fabiana. Ao amigo Macks Wendhell que está comigo na jornada a alguns anos.

Aos amigos Marta, Mirian, Kleber, Marielle, Ju de Cúrcio, Joyce, Lívia, Janaina, Vanessa, Zairo, Lana, Isabella, Bianca, Rayane, Guilherme, Mirlane, Geovana, Jordana, Laura, Leandro, Wesley, Carlos, Mirelle, Mariana, Lilian e todos os membros do LBM.

Aos professores que compõem o LBM, Dr. Alexandre Bailão, Dr. Clayton Luiz Broges, Dra. Maristela Pereira, Dra. Silvia Salem-Izacc e Dra. Juliana Parente, meus agradecimentos.

Em especial aos amigos Lucas Nojosa, pela ajuda, amizade e companheirismo. Á Amanda (e Manu) pela ajuda no trabalho e amizade. À Dra. Luciana Casaletti, pela amizade e ajuda. Á Karla pela grande amizade construída, pelos momentos alegres e por sempre contar com você, muito obrigado a você.

Á minha namorada Kamilla Cristina, pelo apoio, pela confiança e carinho que sempre teve, fazendo os momentos difíceis mais tranquilos, também dedico a você e a toda sua família, meus sogros Otília, Sebastião e aos cunhados Thiago e Gustavo e as concunhadas Maristella e Tamires, obrigado.

Á toda minha família, tios, tias, primos, primas, amigos e meus avós, Ilda, Goiaci e Adão.

Ao meus amigos Antônio Neto e Paulo Vitor (professor), pela amizade sincera e por toda força que vocês me deram, foram essenciais, muito obrigado!

Aos meus pais, Antônio Carlos e Cristiane Elisia, podem faltar palavras a vocês, não porque gastei todas, mas pela importância de vocês, não só nesse trabalho, mas em minha vida, com amor, carinho, tenho vocês como exemplo. Obrigado, amo vocês.

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO	15
1.1 <i>Paracoccidioides</i> spp.	15
1.2 Paracoccidioidomicose	16
1.3. Micronutriente cobre	18
2.0 JUSTIFICATIVA	22
3.0 OBJETIVOS	23
3.1. Objetivo geral	23
3.2. Objetivos específicos	23
4.0 MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 Manutenção de <i>P. brasiliensis</i>	24
4.2 Crescimento de <i>Paracoccidioides</i> sp. na ausência de cobre, controle e excesso de cobre	25
4.3 Determinação da viabilidade celular	25
4.4 Análises <i>in silico</i> de genes relacionados ao metabolismo de cobre em fungos	25
4.5 Análise da expressão de genes na condição de excesso de cobre	25
4.6. Análise de melanina	26
4.7. Preparo de extratos proteicos, aquisição dos dados e identificação proteica por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (NanoUPLC-MS ^E)	27
4.8. Processamento dos dados e determinação das categorias funcionais das proteínas diferencialmente expressas determinadas por NanoUPLC-MS ^E	28
5.0 RESULTADOS	26
5.1. Análise de crescimento de <i>Paracoccidioides</i> sp. em excesso de cobre	29
5.2 Viabilidade celular na presença de excesso de cobre	30
5.3 Análises de transcritos através de qRT-PCR	32
5.4 Análise de melanina	33

5.5 Análise proteômica	34
5.6 Gráficos de qualidade	35
5.7 Proteínas induzidas na presença de sulfato de cobre (100 μM) com relação ao tratamento sem cobre (BCS)	39
5.8 Proteínas reprimidas na privação de sulfato de cobre (BCS) da correlação 100 μM/BCS	44
6.0 DISCUSSÃO	49
7.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
9.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

Lista de figuras e tabelas

Figura 01. Crescimento em placas de células leveduriformes de <i>Paracoccidioides</i> sp. (Pb01) em meio MVM (McVeigh/ Morton) meio controle e meio com sulfato de cobre.	29
Figura 02. Crescimento de <i>Paracoccidioides</i> sp. em concentrações definidas.	30
Figura 03. Análise do efeito de excesso de cobre em células leveduriformes de <i>Paracoccidioides</i> sp. na viabilidade.	31
Figura 04. Análise da expressão de genes relacionados na homeostase de cobre (qPCR).	32
Figura 05. Foto em microscopia de luz de células na condição controle e melanizadas de <i>Paracoccidioides</i> sp.	33
Figura 06. Análise de melanina por Dot blot.	33
Figura 07. Classificação funcional de proteínas.	34
Figura 08. Faixa de detecção dinâmica das proteínas.	35
Figura 09. Tipo de detecção dos peptídeos.	36
Figura 10. Análise de precisão na detecção de massa.	45
Figura 11. Via de biossíntese da melanina.	40
Tabela 1. Proteínas induzidas em excesso de cobre.	41
Tabela 2. Proteínas reprimidas.	45

Resumo

Paracoccidiodomicose é a micose sistêmica mais prevalente da América Latina, causada por fungos do gênero *Paracoccidioides* spp. O fungo cresce como micélio no ambiente saprofítico, sendo a infecção causada por propágulos de micélio e ou conídios, que se diferenciam na forma leveduriforme no hospedeiro. O cobre é um micronutriente essencial para eucariotos e bactérias, de extrema importância a várias proteínas, sendo cofator de muitas enzimas e utilizado em diversos processos bioquímicos. Entretanto em excesso, o cobre pode provocar danos a proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, por isso a importância da homeostase desse metal. O objetivo deste estudo foi avaliar o comportamento do fungo *Paracoccidioides* sp. em presença de excesso de cobre, através de análise proteômica. Na presença de excesso de cobre, as colônias leveduriformes de *Paracoccidioides* sp. apresentaram coloração marrom. A expressão dos transcritos codificantes do transportador de cobre *Ctr3* e da chaperona *Atx1*, apresentaram inibição e indução, respectivamente na presença de excesso de cobre, como verificado através de qRT-PCR. Proteínas relacionadas a respostas ao estresse, com produção de melanina e com vias para obtenção de energia, foram reguladas, o que sugere que *Paracoccidioides* sp. responde ao estresse de excesso de cobre com estratégias de desintoxicação celular, proteção e indução de várias vias de obtenção de energia.

Abstract

Paracoccidioidomycosis is the most prevalent systemic mycosis in Latin America, caused by fungi of the genus *Paracoccidioides*. The fungus grows as mycelium in the saprophytic environment, with the infection caused mycelium propagules and/or conidia, that will differentiate into the yeast form. Copper is an essential micronutrient for eukaryotes and bacteria, is extremely important to various proteins, and cofactor of many enzymes and used in many biochemical processes. However, excessive, copper can cause damage to proteins, lipids and nucleic acids, inferring the importance of this metal homeostasis. The objective of this study was to evaluate the fungus *Paracoccidioides* sp behavior in the presence of copper excess, through proteomics analysis. In the presence of copper excess, the yeast colonies of *Paracoccidioides* sp. depicted brown color. Expression of transcripts encoding CTR3, a copper transporter and the copper chaperone ATX1 showed inhibition and induction, respectively in the presence of excess copper, as verified by qRT-PCR. Proteins related to stress responses, with melanin production and pathways for energy, are regulated, suggesting that *Paracoccidioides* sp. responds to copper excess with detoxification strategies, protection and induction of various pathways of obtaining energy.

1.0. Introdução

1.1. *Paracoccidioides* spp.

O gênero *Paracoccidioides* compreende fungos termo dimórficos, causadores da paracoccidioidomicose, a micose sistêmica mais prevalente da América Latina. Esses fungos apresentam capacidade de crescer na forma de levedura à 36°C e na forma de micélio à temperaturas inferiores a 28°C. A habilidade do fungo em se transformar morfogeneticamente de micélio para levedura é uma particularidade que está envolvida na virulência, infecção no hospedeiro e na adaptação ao meio (Rooney, PJ & Klein, BS, 2002).

O gênero *Paracoccidioides* é composto por 2 diferentes linhagens filogenéticas (S1, PS2, PS3, PS4) e a espécie *P. lutzii* (Teixeira *et al.*, 2014). Os fungos são endêmicos na área que se estende do México à Argentina, onde estima-se que 10 milhões de pessoas estejam contaminadas (Restrepo, 2003; Brummer *et al.*, 1993).

A incidência da doença é variável; enquanto alguns países tem casos esporádicos outros tem uma ocorrência alta da doença, o que ocorre também em estados do Brasil. A doença é mais frequente nos estados de São Paulo, Rio Grande do Sul, Paraná, Rio de Janeiro e Goiás, mas ultimamente vem também afetando outros estados. Tem sido observado nas últimas décadas uma alteração demográfica da população atingida pela micose e na distribuição geográfica do fungo. Dependendo da região, houve um aumento sem que se possa saber as causas. Talvez pelo aumento da urbanização e pela melhoria do diagnóstico possa se justificar esse aumento. Também as novas fronteiras agrícolas podem ter contribuído, principalmente nas regiões Centro-oeste e Norte do Brasil (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

A capacidade de conversão de fases (micélio/levedura) em *Paracoccidioides* está relacionada com mudanças na parede celular do fungo e nas estruturas de polímeros de carboidratos presentes nela (San-Blas, 1982). Foram realizados estudos nas formas do fungo a respeito da composição de parede celular, tendo sido observado maior presença de β -1,3-glucana nas células do fungo. Além disso, quitina também foi encontrada nas duas formas mas com maior teor na forma de levedura (San-Blas, 1982).

A infecção por *Paracoccidioides* sp. pode ocorrer na infância ou na adolescência, com a evolução dependendo da virulência do fungo, da quantidade de conídios inalados

e da integridade no sistema imunológico do hospedeiro. Um desequilíbrio na saúde do hospedeiro pode levar a evolução da doença, aparecendo as manifestações clínicas geralmente no indivíduo já adulto (Bisinelli JS e Ferreira MLS, 2002). O fungo *Paracoccidioides* sp. acomete, na maioria dos casos, trabalhadores rurais do sexo masculino, entre 30 a 60 anos (Lacaz *et al.*, 1991). O local e a condição em que *Paracoccidioides* sp. ocorre no ambiente, é pouco conhecido em virtude do raro isolamento do fungo na natureza e o prolongado período em que permanece de forma latente no hospedeiro (Bagagli E *et al.*, 1998). Porém, foi observado que o crescimento do fungo é mais abundante em solos úmidos e amostras coletadas em tocas de tatu mostraram crescimento de *Paracoccidioides* sp. em solos arenosos e argilosos (Richini-Pereira *et al.*, 2008).

A razão de acometimento da paracoccidioidomicose (PCM) varia de 10 a 15 homens para 1 mulher em adultos; já na infância mostra-se um acometimento uniforme da infecção e da doença em ambos o sexos, com pequena predominância do sexo masculino em adultos jovens (Wanke *et al.*, 1994). Porém as mulheres em idade fértil são menos afetadas pelo fungo, em função de hormônios femininos, como o estrogênio, que mostrou ser capaz de inibir a transformação do fungo de micélio para levedura (Restrepo A *et al.*, 1984).

Paracoccidioides sp., como diversos fungos patogênicos, apresenta vários fatores que podem acarretar danos ao hospedeiro e contribuem para o fenótipo da virulência, como a aderência, colonização e características que permitem que o fungo resista a ambientes hostis no hospedeiro (Mendes-Giannini *et al.*, 2005; Filler & Sheppard, 2006). Estudos sobre a interação fungo-hospedeiro, a nível molecular, são de importância para a identificação de genes responsáveis pela proliferação e manutenção do agente no hospedeiro. Sabe-se que diversas apresentações clínicas da doença podem ocorrer, tais como formas cutâneas, sistêmicas, atingindo vários órgãos e tecidos, com ênfase no pulmão (Franco *et al.*, 1994).

1.2. Paracoccidioidomicose (PCM)

Em relação a PCM, pode apresentar-se na forma aguda ou subaguda (juvenil) e a forma crônica. Na forma aguda são afetados principalmente crianças e adultos jovens, representando de 3 a 5% dos casos, sendo a forma mais grave e de prognóstico mais difícil

(Brummer *et al.*, 1993). A forma aguda caracteriza-se com um quadro clínico com o envolvimento de vários órgãos como fígado, gânglios linfáticos, baço e medula óssea. Nessa forma a PCM conduz à perda gradual da resposta imune celular e induz a produção de diversos anticorpos específicos (Restrepo *et al.*, 1989).

Mais de 90% dos casos da PCM se apresenta na forma crônica ou adulta, sendo a grande maioria dos pacientes, do sexo masculino. Na forma crônica há um desenvolvimento lento da doença com evidente comprometimento pulmonar (Brummer *et al.*, 1993). Em diversos casos, pelo desenvolvimento da doença ser lento, o paciente só vai ao médico com sintomas de comprometimento extra pulmonar, já apresentando o envolvimento de outros órgãos como pele, linfonodos, tubo digestivo e mucosas das vias aéreas superiores – sendo esta a forma multifocal da micose (Londero, 1986; Brummer *et al.*, 1993). Na forma crônica, pelo fato de ser lenta, observa-se uma grande disseminação da doença, e muitas vezes desenvolvendo a forma multifocal (Restrepo *et al.*, 1983).

O diagnóstico da doença é realizado através da identificação do fungo, a partir do isolamento do material coletado. Também são empregadas técnicas sorológicas (Marques AS, 1998). A forma mais barata e simples de diagnóstico é o exame micológico para o qual se obtém o material da lesão cutânea ou mucosa, aspirado do linfonodo, abscesso ou fluido sinovial, sendo posteriormente observadas as formas de gemulação no microscópio (Rivitti EA e Aoki V, 1999).

Pode ocorrer a cura espontânea da PCM, que ocorre mais em infecções primárias do pulmão. Nos casos em que o fungo é isolado no paciente, este tem que ser submetido a tratamento. Existem tratamentos eficazes para a PCM, porém a natureza polimórfica das lesões dificulta o diagnóstico, resultando em doença progressiva e podendo deixar sequelas incapacitantes (Restrepo A, 1994).

O tratamento para PCM inclui o uso de antifúngicos, apoio nutricional, tratamento de eventuais sequelas e co-morbidade e o tratamento de doenças oportunistas que podem estar associados. Apesar de diversos tipos de medicamentos para o tratamento do PCM, como os antifúngicos itraconazol e anfotericina B, não há um consenso sobre qual a melhor droga a ser usada, variando de cada centro de tratamento (PCM, 2005). As drogas mais comumente utilizadas para o tratamento da PCM são sulfonamidas, anfotericina B e derivados imidazólicos, como cetaconazol, itraconazol e fluconazol. O voriconazol, uma nova geração de triazóis antifúngicos, podendo ser utilizado oralmente ou intravenoso, constitui uma boa alternativa terapêutica, principalmente em PCM no sistema

nervoso, pela sua boa penetração e eficiência, porém há a limitação pelo alto custo do medicamento (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

1.3. Micronutriente cobre

Cobre é um micronutriente essencial para eucariotos e bactérias, utilizado estruturalmente em muitos processos bioquímicos e como cofator catalítico, sendo essencial para a vida (Banci *et al.*, 2010b). Como um elemento traço, o cobre representa cerca de 0,00007% da crosta terrestre. Através da síntese de proteínas com auxílio de um vasto espectro de ligantes químicos como enxofre, oxigênio e nitrogênio, o cobre confere mudanças na estrutura da proteína, atividade catalítica e nas interações proteína-proteína, possibilitando assim um série diversa de eventos bioquímicos e reguladores (Linder & Goode, CA, 1991).

O cobre pode existir nos sistemas biológicos em duas formas, Cu^{1+} (reduzido) e o Cu^{2+} (oxidado). Esta capacidade redox tem sido aproveitada para catálise de uma infinidade de enzimas nas quais as atividades são críticas em diversas funções regulatórias e bioquímicas em microrganismos, plantas e também nos mamíferos (Kim *et al.*, 2008). Pelas amplas utilizações e necessidades de cobre em todo os seres vivos, não é inesperado que os seres humanos e os patógenos humanos partilhem dos requisitos para adquirir níveis suficientes para o crescimento, proliferação e desenvolvimento (Bertini I *et al.*, 2007; Lippard SJ e Berg JM, 1994).

As biomoléculas dependentes de cobre podem existir em diferentes localizações e diferentes tipos, tendo sido um desafio identificar as gamas de proteínas ligadas ao cobre. Abordagens bioinformáticas estimam o proteoma de ligantes de cobre como menos de 1% do total em bactéria, archea e genomas eucariotos (Andreini *et al.*, 2008).

O cobre é um cofator de várias metaloenzimas, incluindo a superóxido dismutase e a citocromo c oxidase. Em função de sua habilidade catalítica se há cobre livre na célula, este reagirá com o oxigênio gerando espécies reativas de oxigênio, o que será danoso a ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas (Lalioi *et al.*, 2009). No entanto o cobre é um cofator catalítico e estrutural que aciona uma grande variedade de processos bioquímicos importantes para a vida. (Linder, & Goode., 1991).

Muitas vias metabólicas importantes, como o metabolismo do piruvato, o ciclo do TCA, e a cadeia respiratória, requerem proteínas com grupos prostéticos contendo ferro

e cobre, porém esta capacidade de doar e aceitar elétrons, faz do ferro e do cobre, elementos tóxicos quando em excesso, o que determina que as células tenham mecanismos para manter os metais em níveis adequados para os processos biológicos (De Freitas *et al.*, 2003).

Estudos bioquímicos estabeleceram alguns transportadores de cobre transmembranares, sendo ATPases transportadoras de cobre aquelas que participam no transporte intracelular, distribuindo o cobre no interior da célula (Lutsenko e Petris, 2003). Transportadores de membrana plasmática, designados como CTRs, funcionam na aquisição do cobre a partir do ambiente (De Feo *et al.*, 2007). A família de transportadores CTR não utiliza a energia de hidrólise de ATP, sendo o cobre transportado através da diferença de gradiente, sendo assim sequestrado do meio mais concentrado em cobre para o menos concentrado (Lee *et al.*, 2002).

O Cu^+ é absorvido por dois mecanismos distintos em *Saccharomyces cerevisiae*, um de alta afinidade e outro de baixa afinidade. O mecanismo de alta afinidade é composto por duas permeases, Ctr1 e Ctr3, que são dependentes de ação de metaloredutases de superfície (Kim *et al.*, 2008). Alguns estudos demonstraram que quando deletado o gene codificante de Ctr1, ocorre uma deficiência na absorção de cobre e também indiretamente na de ferro (Van Ho *et al.*, 2002; Rees & Thiele, 2004). Um outro membro da família Ctr, o Ctr2, está envolvido no estoque de cobre no vacúolo e na importação de cobre da membrana plasmática para dentro da célula (Rees & Thiele, 2007). Em situações de privação de cobre, Ctr2 fornece cobre do vacúolo para o citoplasma, mantendo sua homeostase em *S. cerevisiae* (Rees & Thiele, 2004).

Ctr1 e *Ctr3* transportam o cobre do exterior da célula para o interior, posteriormente este cobre sendo distribuído para chaperonas ligadas ao cobre, para a incorporação em proteínas alvo, como a citocromo c oxidase subunidade Cox2p e a Cu/Zn superóxido dismutases mitocondrial e citosólica e para a transferência para os transportadores de distribuição como o Ccc2 que transferem o cobre para o lúmen da via secretora (Cobine *et al.*, 2006). Chaperonas citosólicas incluem a ATX1, que dirige íons de cobre para ativar as enzimas alvo. O ATX1 é um dos vários genes cobre-dependentes, com alta afinidade na via de captação de ferro em levedura. Genes CTR1 são responsáveis pela absorção do cobre na membrana plasmática. Ccc2 é uma proteína responsável por bombear o cobre para o compartimento secretor, tendo um papel na

virulência em fungos (C. Askwith *et al.*, 1994; DS Yuan *et al.*, 1995; R Stearman *et al.*, 1996).

Muitas proteínas cobre-dependentes atravessam a via secretora com destino à membrana plasmática, membranas intracelulares ou para participar de vias de secreção. Isto inclui proteínas secretadas de formas intracelulares como Cu/Zn SOD, tirosinase, fatores de coagulação do sangue, ferroxidases que são multicobres. Atx1 é um acompanhante de cobre, responsável pela acoplação dos ions de cobre (Pufahl RA *et al.*, 1997; Banci *et al.*, 2007).

Patógenos invasores tem que competir por nutrientes que são limitados, para estabelecer e manter a infecção bem sucedida no hospedeiro (Schaible, U.E. e Kaufmann, S.H, 2004; Prentice AM *et al.*, 2007). Um exemplo de metal que já é bem caracterizado em infecções é o ferro, o qual é um fator de virulência em microrganismos, como bactérias e fungos (Doherty, CP, 2007; Jung, WH *et al.*, 2006). Estudos recentes também tem mostrado que o cobre atua na modulação de fatores de virulência importantes, e sua função se estende além da aquisição de ferro. Nesse contexto, *Cryptococcus neoformans* se adapta ao ambiente intracelular do macrófago alterando a expressão de genes, entre eles aqueles codificantes de uma lacase e uma permease (Fan, W *et al.*, 2005). A lacase é uma enzima multicobre que oxida compostos fenólicos e está envolvida na biossíntese de melanina, um importante fator de virulência, trazendo proteção à célula contra as espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas durante o ataque oxidativo dos macrófagos. Tendo em vista isso, é de se esperar que a aquisição de cobre contribua para a virulência. Foi demonstrado, através de análise genética em *C. neoformans*, que um transportador de alta afinidade de cobre, o Ctr4, com seu regulador de transcrição o CUF1 (MAC1), são necessários para a infecção do cérebro, em modelos de ratos (Waterman, SR, *et al.*, 2007). CUF1 é responsável por regular o a homeostase de cobre tanto na deficiência de cobre quanto na sua adequação (Lin, X *et al.*, 2006). Também foi demonstrado a expressão elevada de CTR4 em macrófagos infectados com *C. neoformans*, em células recuperadas do cérebro de ratos, tornando consistente a participação de CTR4 nos processos de infecção. Outros genes cobre-dependentes como o CUF1 também tem importante papel nos processos chaves na virulência e epidemiologia de *C. neoformans*. Outro gene cobre-dependente como o LAC (Lacase) mostrou-se importante na infecção. Foram realizados em *C. neoformans*, análises com estirpes alteradas geneticamente, mostrando que os mutantes para os *lac1* e *lac2* (lacases) tiveram redução na infecção no cérebro de ratos,

tornando ainda mais crescente a importância de genes envolvidos na disseminação e estabelecimento da infecção que são dependentes de cobre (Nielsen, K *et al.*, 2005; Noverr, MC *et al.*, 2004).

O transporte de cobre extracelular para as células é de suma importância para a distribuição desse metal para as enzimas cobre-dependentes, como também outras atividades vitais do organismo necessitam do metal. Estudos de mutagenese em células de *C. neoformans*, tem demonstrado que a deleção do gene que codifica o Ccc2, provoca virulência atenuada (Walton FJ *et al.*, 2005). A função de Ccc2 é o carregamento de cobre, durante a infecção em ratos, *C. neoformans* mostrou uma expressão aumentada de Ccc2 quando foram fagocitadas por macrófagos (Fan W *et al.*, 2005). Ccc2 também é necessário no carregamento de íons de cobre para a lacase. A Lacase sendo importante na produção de melanina que oferece proteção contra o ROS (Huffnagle *et al.*, 1995). A melanina também oferece defesa contra estresses ambientais, ultravioleta, agentes farmacológicos, entre outros (Casadevall A *et al.*, 2000; Heitman J *et al.*, 2006). Foi demonstrado que a deleção de Ccc2 também gera defeitos na chaperona de cobre, ATX1, o que conseqüentemente gera defeitos na produção de melanina (Walton FJ *et al.*, 2005).

Apesar da melanina oferecer uma proteção eficaz contra estresses em geral, pode-se caracterizar papel de proteção semelhante para a SOD Cu/Zn, durante o ataque oxidativo sofrido por células fagocitadas por macrófagos. Tem sido demonstrado que *Candida albicans*, assim como *C. neoformans* requerem o SOD Cu/Zn para a virulência completa em modelos de infecção em ratos. Consistente com esses resultados verificou-se que a ausência de SOD Cu/Zn nestes organismos aumenta a susceptibilidade a macrófagos (Hwang CS *et al.*, 2002; Cox GM *et al.*, 2003).

Tem sido demonstrado que vários mecanismos para a aquisição de cobre desempenham papel importante na virulência de fungos e bactérias, havendo uma disputa entre o hospedeiro e o patógeno sobre o cobre disponível. Em células intestinais que estavam expostas a bactérias para a repovoamento do intestino haviam genes transportadores de cobre expressos (Hooper LV *et al.*, 2001). Em *C. neoformans* há uma expressão aumentada do gene CTR4 na infecção (Waterman SR *et al.*, 2007).

2.0. Justificativa

Como anteriormente citado, os mecanismos de captação de cobre e sua importação para os patógenos e hospedeiro tem sido investigadas. Entretanto, no que concerne ao excesso de cobre e suas implicações na biologia do patógeno, estudos são bastante incipientes. Tendo em vista que o cobre participa em diversas reações bioquímicas, sendo extremamente necessário para a regulação de genes, agindo como cofator de enzimas, ativando vias metabólicas e sendo muito importante na virulência de fungos e bactérias. O cobre é também responsável por ativar sistemas de defesa dos microrganismos contra estresses ambientais e/ou contra o sistema de defesa do hospedeiro.

Entretanto o cobre em excesso livre na célula pode deixar de ser um micronutriente essencial passando a ser um metal tóxico, danificando ácidos nucleicos, proteínas, entre outras biomoléculas. Sendo assim o estudo do comportamento do organismos na presença do excesso de cobre importante para entender as respostas biológicas ao excesso do metal. Nesse contexto, estudos sobre o efeito do excesso de cobre e sua homeostasia em patógenos são relevantes. Sabe-se que um dos mecanismos de defesa utilizados pelos macrófagos do hospedeiro é a elevação do nível de cobre dentro do macrófago, após ter fagocitado as células invasoras, causando assim um ambiente hostil e de difícil sobrevivência para o patógeno (Wagner D *et al.*, 2005; Besold NA, Culbertson EM & Culotta, 2016). Sendo de extrema importância um estudo para reconhecer os mecanismos utilizados na interação patógeno-hospedeiro durante a infecção, incluindo o excesso de cobre que pode ser uma estratégia dos macrófagos do hospedeiro, com as respostas do patógeno que utiliza mecanismos de defesa e também de ataques que podem utilizar o metal cobre.

3.0. Objetivos

3.1. Objetivo geral

O objetivo geral do trabalho é investigar o efeito do excesso de cobre na biologia do fungo *Paracoccidioides* sp utilizando espectrometria de massa e outras técnicas de biologia molecular.

3.2. Objetivos específicos

- Verificar o efeito de concentrações crescentes do cobre (50 μ M e 100 μ M) no crescimento de *Paracoccidioides* sp.;
- Analisar a viabilidade do *Paracoccidioides* sp. durante a exposição ao excesso de cobre.
- Analisar a expressão de genes relacionados com a captação de cobre para diversos processos bioquímicos, durante a exposição do *Paracoccidioides* sp. a excesso de cobre;
- Realizar análise proteômica do fungo exposto a excesso de cobre;
- Identificar prováveis proteínas chave nas respostas do fungo ao excesso de cobre.

4.0. Materiais e Métodos

4.1. Manutenção de *Paracoccidioides sp.* (isolado 01)

Em todos os experimentos o isolado *Pb* 01 (ATCCMYA-826) foi utilizado, o qual foi mantido, na forma leveduriforme, *in vitro*, a 36 °C, com repique a cada 7 dias, em meio Fava-Neto [1% (p/v) peptona; 0,5% (p/v) extrato de levedura; 0,3% (p/v) protease peptona; 0,5% (p/v) extrato de carne; 0,5% (p/v) NaCl; 4% (p/v) glicose; 1% (p/v) ágar, pH 7,2] (Fava-Neto, 1995).

4.2. Crescimento do *Paracoccidioides sp.* na ausência de cobre, controle e excesso de cobre

A análise de crescimento do fungo foi realizada em placas Petri. Primeiramente o fungo foi crescido em meio BHI (Brain Heart Infusion) líquido durante 3 dias a temperatura de 36°C com 150 rpm (rotações por minuto). Posteriormente as células foram lavadas com solução de PBS (Tampão salina fosfato) e contadas com a utilização de uma câmara de Neubauer. A seguir, foram realizadas as diluições de 10^{-6} , 10^{-5} e 10^{-4} /mL, que foram aplicadas em placas com meio MVM (McVeigh/Morton), contendo inicialmente 50 μ M, 100 μ M, 1mM e 5mM de sulfato de cobre (concentrações definidas após crescimentos em placas de diversas concentrações), posteriormente foram selecionados as concentrações de 50 e 100 μ M para as outras análises. Os controles foram realizados no meio acima citado, sem a adição do sulfato de cobre, contendo 1% (p/v) de glicose, fosfato de potássio monobásico (KH₂SO₄) 11 mM, sulfato de magnésio (MgSO₄) 2 mM, cloreto de cálcio (CaCl₂) 1 mM, sulfato de amônio (NH₄SO₄) 15mM, L-asparagina 0,2%, L-cistina 0,002%, solução de vitaminas 1 ml e solução de elementos traços 0,1 ml.

A solução de vitaminas contém por 100 ml tiamina, hidróclorido 6,0 mg, niacina 6,0 mg, pantotenato de cálcio 6,0 mg, inositol 10 mg, biotina 0,1 mg, riboflavina 1,0 mg, ácido fólico 10 mg, cloreto de colina 10 mg, cloridrato de piridoxina 10 mg. A solução de elementos traços contém por 100 ml ácido bórico 900 μ M, sulfato de cobre 600 μ M, sulfato ferroso amoniacal 4 mM, sulfato de manganês 200 μ M, molibdato de amônia 29 μ M, sulfato de zinco 2,75 mM. O meio sem o cobre foi acrescido de batocuproinadisulfato sódico (BCS) (Sigma) um quelante de cobre na concentração de 50 μ M adicionando-se 1 μ l por ml de meio e a solução de elementos traços não continha o

sulfato de cobre. As placas foram incubadas a 36°C durante 7 dias para o crescimento do fungo.

4.3. Determinação da Viabilidade celular

Para realizar a o teste de viabilidade celular, foi realizado um pré-inóculo com meio BHI (Brain hearth infusion) e as células leveduriformes de *Pb01* foram incubadas por 2 dias, sob agitação. Após esse período as células foram lavadas em PBS (Solução Salina Tamponada) e inoculadas em meio liquido MVM (McVeigh/ Morton), nas condições de controle, privação de cobre (BCS), 50 µM de sulfato de cobre e 100µM de sulfato de cobre. A viabilidade celular foi realizada através de citometria de fluxo nos tempos de 0h, 3h, 6h, 24h, 48h, utilizando do kit Via Count da Millipore.

4.4. Análises *in silico* de genes relacionados ao metabolismo de cobre em fungos

Foram escolhidos os genes *Ctr3* e *Atx1*, relacionados com a captura de cobre e com processos bioquímicos dependentes de cobre, genes estes que estão bem caracterizados no fungo *S. cerevisiae*. Foi realizada uma busca no site do Broad Institute (www.broadinstitute.org), genoma de *Paracoccidioides* spp. E realizado oligonucleotídeos para cada gene.

Gene	Sense	Antisense	Number Accession
CTR3	GCCTGCTTCATTTCTCATCG	GGGTCGGGAGACTCAAGCG	PAAG_05251.1
ATX1	CTCAAGAACTCGACGGAGTG	CCGCCTCACCGCTATTCACA	PAAG_00326.1
Alpha Tubulin	ACAGTGCTTGGGA ACTATAACC	GGGACATATTTGCCACTGCC	PAAG_12506.2

4.5. Análise da expressão de genes relacionados com homeostase de cobre

Para a análise da expressão dos genes *Ctr3* e *Atx1* na condição controle e excesso de cobre (100µM) em células leveduriformes de *Paracoccidioides* sp. (*Pb01*), foram extraídos os RNAs, utilizando-se o reagente Trizol, segundo o protocolo do fabricante (Invitrogen). Foi utilizado o sistema comercial 1 High Capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems Foster City, CA). Os cDNAs sintetizados foram diluídos em água e a reação de RT-PCR foi realizada usando a mistura de SYBR green PCR master mix

(Applied Biosystems, Foster City, CA) com o sistema Applied Biosystems Step One Plus real-time PCR system (Applied Biosystems Inc.). As reações de PCR foram realizadas em triplicatas biológicas para cada amostra de cDNA com os respectivos genes de interesse e os dados normalizados com o gene constitutivo que codifica a alfa tubulina como controle endógeno. Foi confirmada a especificidade de cada par de oligonucleotídeos (no tempo de 6 horas), pela visualização dos produtos amplificados em gel de agarose 1,2%. As amostras de cDNAs foram diluídas 1:5 em água, para a aplicação das amostras na placa. Foram calculados os níveis de expressão relativa com o método da curva padrão para a quantificação relativa (Bookout et al., 2006). Os resultados foram validados pelo teste *t*-Student's, sendo consideradas diferenças significativas amostras que apresentaram $P \leq 0,05$.

4.6. Análises de melanina

Para a identificação de melanização nas células de *Paracoccidioides* sp., foi realizado o inóculo das células fúngicas em meio MVM, controle e 100µM de cobre, as células ficaram em agitação entre 36°C e 37°C, durante 5 dias. Posteriormente as células foram coletadas e realizado a maceração por nitrogênio. Depois de obtermos os extratos, as amostras foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose por vácuo (25µg e 12, 5µg de amostra) e incubadas com os anticorpos, anti-melanina e anti-enolase (1:1000; 1:40.000) respectivamente, e posteriormente realizado a revelação das amostras.

4.7. Preparo de extratos protéicos, aquisição dos dados e identificação protéica por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (NanoUPLC-MS^E)

Após o crescimento de células leveduriformes do fungo *Paracoccidioides* sp. em condições de privação de cobre (BCS), controle e em excesso de cobre (100µM) por 48 h em meio mínimo MVM (McVeigh/ Morton) (Restrepo A, Jimenez BE, 1980), as células foram centrifugadas à 1.500 g, e lavadas em solução de bicarbonato de sódio 50 mM, pH 8,5, e rompidas com pérolas de vidro utilizando o aparelho *bead beater* (BioSpec, Oklahoma, USA) em 5 ciclos de 30 segundos com intervalos, no gelo, como previamente descrito (Lima *et al.*, 2014). O lisado celular foi centrifugado à 10.000 g por 15 min à 4 °C e o sobrenadante quantificado usando o reagente Bradford (Sigma-Aldrich) (Bradford MM, 1976). As digestões protéicas foram realizadas como descrito previamente por (Murad *et al.*, 2011; Murad & Rech, 2012), com algumas modificações. Foram utilizados

300 µg dos extratos protéicos para digestão. As amostras foram submetidas à ação do surfactante *RapiGest SF*TM adicionando-se 150 µL da solução (v/v) (*Waters Corp, Milford, MA*). Após breve agitação, as amostras foram incubadas à 80°C por 15 min. Foram adicionados 2,5 µL de solução de DTT (*GE Healthcare*) a 100 mM e então, as amostras foram incubadas à 30°C por 30 min. Em seguida, adicionou-se 2,5 µL da solução de iodoacetamina (*GE Healthcare*) a 300 mM com incubação ao abrigo da luz, por 30 min, à temperatura ambiente. A enzima tripsina foi adicionada na amostra no volume de 60 µL na concentração de 50 ng/µL (*Promega, Madison, WI, USA*) e as amostras foram submetidas à agitação e incubadas à 37°C por 16 h. Após a digestão trípica, 60 µL de ácido trifluoroacético (TFA) (*Sigma-Aldrich*) a 5% (v/v) foi adicionado à cada amostra para hidrolisar o *RapiGest*TM com incubação à 37°C por 90 min. As amostras foram posteriormente centrifugadas a 18.000 g por 30 min, à 6 °C. Os peptídeos digeridos foram secos à vácuo e ressuspensos em formiato de amônio a 20 mM adicionado de fosforilase B (*MassPREP*TM *Digestion Standard PHB*), como padrão exógeno, na concentração final de 150 fmol/ µL.

As amostras foram separadas por cromatografia líquida de ultra desempenho pelo sistema *nanoACQUITY*TM (*Waters Corporation, Manchester, UK*) que possui duas colunas de fase reversa em *tandem* usando as concentrações graduais crescentes (10, 14, 16, 20, e 65%) de acetonitrila (ACN) (*Sigma-Aldrich*) para a liberação dos peptídeos. Para a obtenção dos espectros de massas foi utilizado o espectrômetro de massas modelo *Synapt G2 HDMS*TM *mass spectrometer* (*Waters, Manchester, UK*), utilizando *nanoelectrospray* como fonte de ionização e dois analisadores - quadrupolo e tempo de voo (*nanoESI-Q-TOF, Waters*). Peptídeos da proteína [*Glu*¹]-*Fibrinopeptide B* (GFB) foram utilizados como padrão de massa para calibração do aparelho. Quantidades equimolares de peptídeos foram fracionados e três réplicas experimentais foram obtidas para cada amostra.

4.8. Processamento dos dados e determinação das categorias funcionais das proteínas diferencialmente expressas determinadas por NanoUPLC-MS^E

Os espectros de massas obtidos por NanoUPLC-MS^E foram processados usando *ProteinLynx Global Server* (PLGS) versão 2.4 (*Waters Corp, Milford, MA*). Os dados brutos foram buscados contra o banco de dados de *Paracoccidioides* spp. (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiH

[ome.html](#)) utilizando algoritmos previamente descritos em (Geromanos *et al*, 2009, Li *et al*, 2009) com sequências corretas e reversas. Os parâmetros para identificação incluíram: a) número mínimo de íons fragmentados por peptídeos (2); b) número mínimo de íons fragmentados por proteína (5); c) número mínimo de peptídeos por proteína (1); d) massa máxima para proteína (600 kDa); e) enzima escolhida para digestão: tripsina; f) modificação fixa: carbamidometilação de resíduos de cisteína; g) modificações variáveis: oxidação da metionina e fosforilação STY; h) máximo de falso-positivo de 4%. A normalização realizada para acuradamente comparar os níveis de expressão das proteínas nas diferentes condições foi realizada a partir da detecção de uma proteína com coeficiente mínimo de variação em relação à sua abundância, considerando todas as réplicas utilizadas, como previamente descrito (Pizzatti L *et al.*, 2012; Lima et al., 2014). Dos dados gerados foram determinadas a faixa de detecção dinâmica, a fragmentação e a precisão de identificação de massa dos peptídeos. Foram utilizados os programas *FBAT software* (Laird et al, 2000), *MassPivot* (gentilmente cedido por Dr. Andre M. Murad), *Spotfire®* (TIBCO Software Inc.©) e *Microsoft Office Excel* (Microsoft©). Os processos biológicos das proteínas diferencialmente expressas foram obtidos usando ferramentas de busca por categorias funcionais tais como o Pedant no MIPS (http://pedant.helmholtz-muenchen.de/pedant3htmlview/pedant3view?Method=analysis&Db=p3_r48325 Par [br asi_Pb01](#)) e o banco de dados Uniprot (<http://www.uniprot.org/>).

5.0. Resultados

5.1. Análise do crescimento de *Paracoccidioides* sp em excesso de cobre

Inicialmente foi realizado a análise do perfil de crescimento em células leveduriformes de *Paracoccidioides* sp. (*Pb01*) sob diferentes concentrações de cobre. Foram analisados o crescimento do fungo nas condições sem cobre (BCS), condição controle (CT), 50 μ M, 100 μ M, 1mM e 10mM (Figura 1), nas diluições mostradas na figura. Observou-se que nas concentrações de sulfato de cobre maiores, como 1mM e 5mM, ocorre pequeno crescimento quando comparado com o controle e até mesmo com a condição de privação de cobre, que mostraram um bom crescimento.

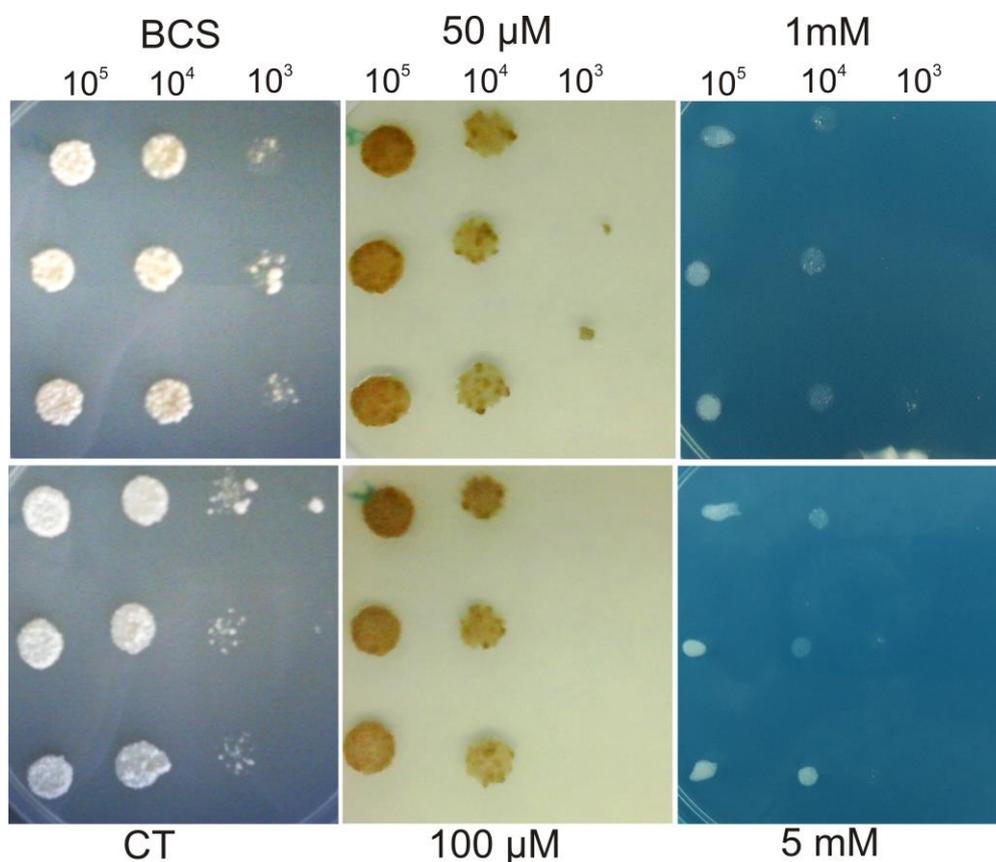


Figura 01. Crescimento em placas de células leveduriformes de *Paracoccidioides* sp. (*Pb01*) em meio MVM (McVeigh/ Morton). Placa sem cobre (BCS); Placa controle (cobre normal/CT); Placa contendo 50 μ M de sulfato de cobre; Placa contendo 100 μ M de sulfato de cobre; Placa contendo 1mM de sulfato de cobre; Placa contendo 5mM de sulfato de cobre. Foi realizado o gotejamento das células do fungo nas placas em diferentes diluições (10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3}), durante 7 dias, sendo a incubação realizada em estufa a 36°C.

Dado a inibição de crescimento observada em altas concentrações de sulfato de cobre, foi realizada a análise de crescimento em concentrações menores (50 μ M e 100 μ M), como mostrado na Figura 2. Inicialmente, foi analisado o crescimento do fungo *Paracoccidioides* sp. em meio MVM com o quelante de cobre BCS, como demonstrado na figura. Nota-se que apesar do cobre ser essencial para a proliferação e para processos bioquímicos, houve crescimento na ausência deste metal, embora as colônias sejam menos densas do que o controle. O crescimento do fungo no meio contendo 50 μ M e 100 μ M de sulfato de cobre, respectivamente, foi avaliado. Verifica-se, nas duas concentrações, menor crescimento quando comparado ao controle. As colônias na presença de excesso de cobre apresentaram uma coloração diferente da padrão para *Paracoccidioides* sp., ou seja, um pigmento marrom escuro.

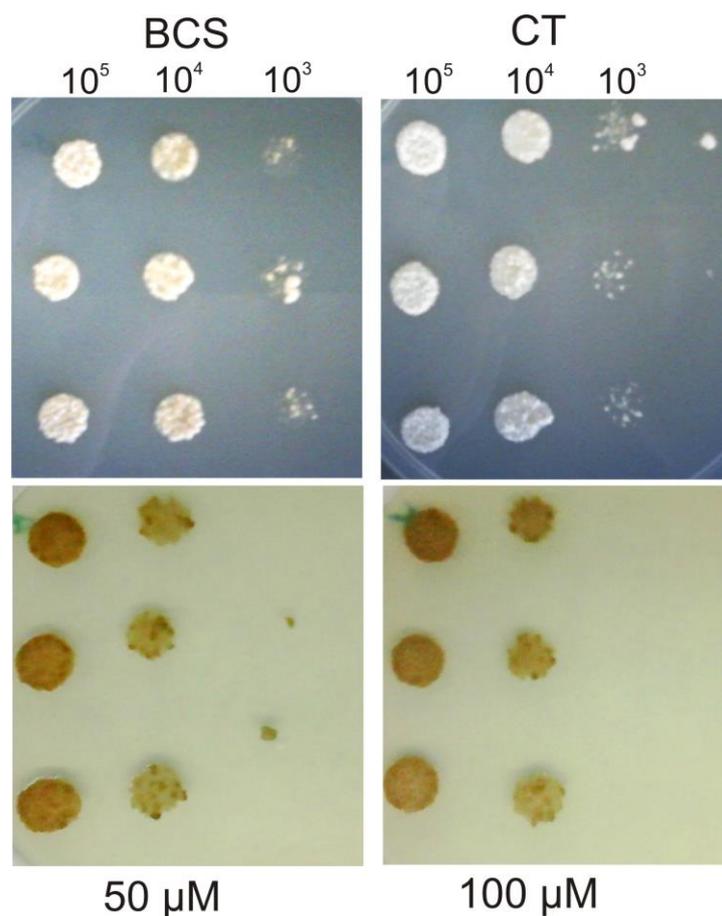


Figura 02. Crescimento de *Paracoccidioides* sp. em placas com MVM. Crescimento do *Paracoccidioides* sp. em meio com BCS (quelante de cobre; sem cobre); Crescimento do *Paracoccidioides* sp. no meio

controle; Crescimento do *Paracoccidioides* sp. em meio com 50µM de sulfato de cobre; Crescimento do *Paracoccidioides* sp. em meio com 100 µM de sulfato de cobre.

5.2. Viabilidade celular na presença de excesso de cobre

Foi realizado o teste de viabilidade celular com o citômetro de fluxo. Foram realizadas as análises das concentrações de 50 e 100µM, controle (Ct) e sem cobre (BCS), nos tempos de 0, 3, 6, 24 e 48 horas. Mostrando no gráfico que a viabilidade do fungo não foi muito afetada, como notamos no crescimento em placa, mesmo o cobre sendo tóxico em excesso, as células do *Paracoccidioides* sp. mostraram uma boa viabilidade, auxiliando assim na escolha dos pontos para análise proteômica.

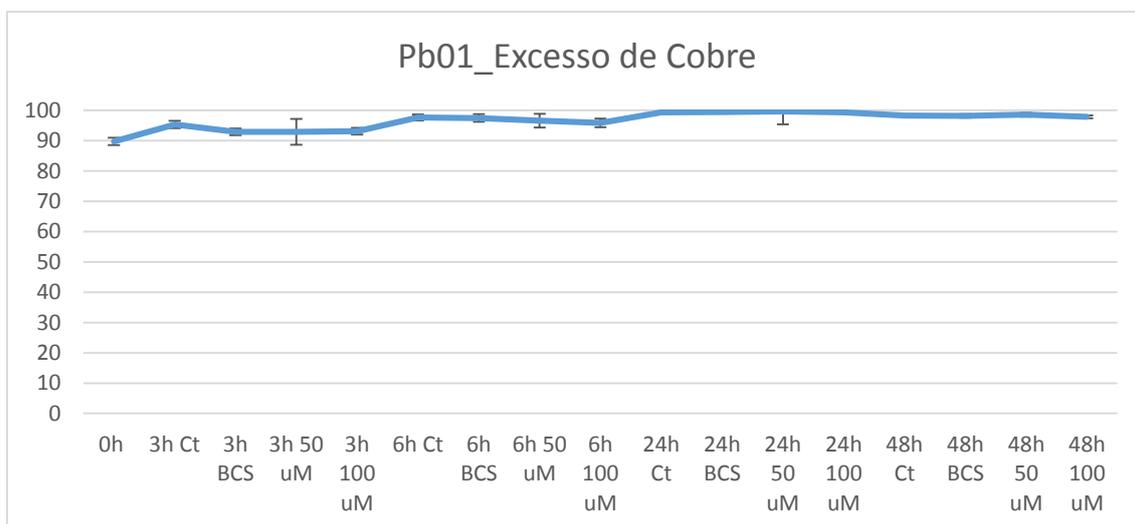


Figura 03. Viabilidade celular de *Paracoccidioides* sp. em diferentes tempos e condições, controle (Ct) na ausência de cobre (BCS), excesso com 50µM de sulfato de cobre, 100µM de sulfato de cobre

5.3. Análise de transcritos através de qRT-PCR

Posteriormente foram selecionados genes relacionados ao metabolismo do micronutriente cobre em processos bioquímicos e biológicos. O transportador de cobre CTR3 e a chaperona ATX1 foram selecionados para análises dos respectivos transcritos. A expressão de CTR3 em excesso (100 μ M) de cobre em 6 horas, mostrou uma redução significativa, como demonstra a Figura 04. A expressão de ATX1 foi aumentada significativamente, como demonstrado na Figura 3.

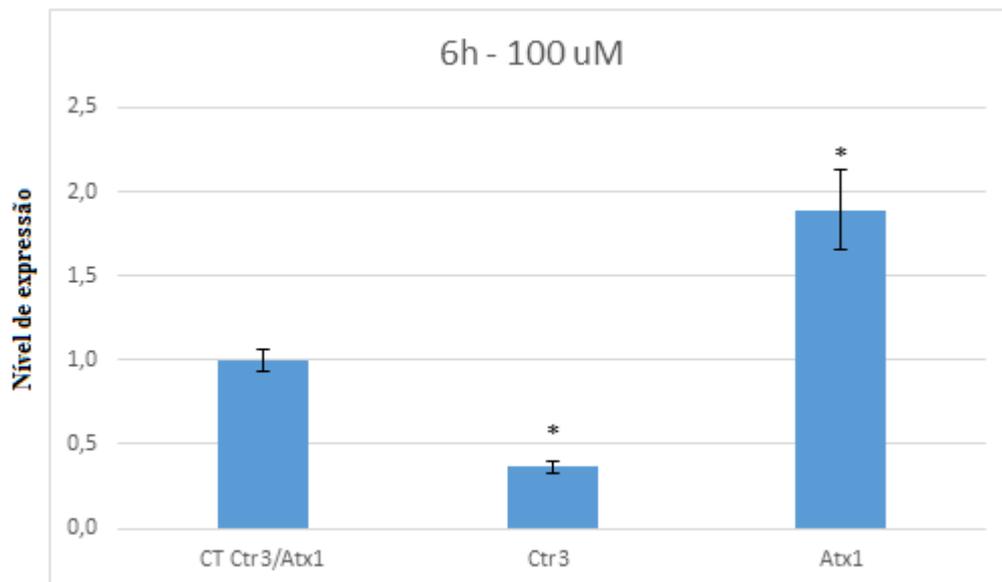


Figura 04. Análise do efeito de excesso de cobre em células leveduriformes de *Paracoccidioides* sp. na expressão de genes relacionados a homeostase do metal. Expressão de Ctr3 e Atx1 em células de *Paracoccidioides* sp. em condição de excesso de cobre e controle (MVM sem modificações). As células foram incubadas a 36°C e a análise de qRT-PCR ocorreu no tempo de 6 horas. Os dados foram normalizados utilizando o gene constitutivo de alfa tubulina como controle endógeno. Os dados são apresentados com a média e o desvio padrão das triplicatas. * significativamente diferente do controle, utilizando o valor de $P \leq 0,05$.

5.4. Análise de melanina em células de *Paracoccidioides* sp. expostas ao excesso de cobre

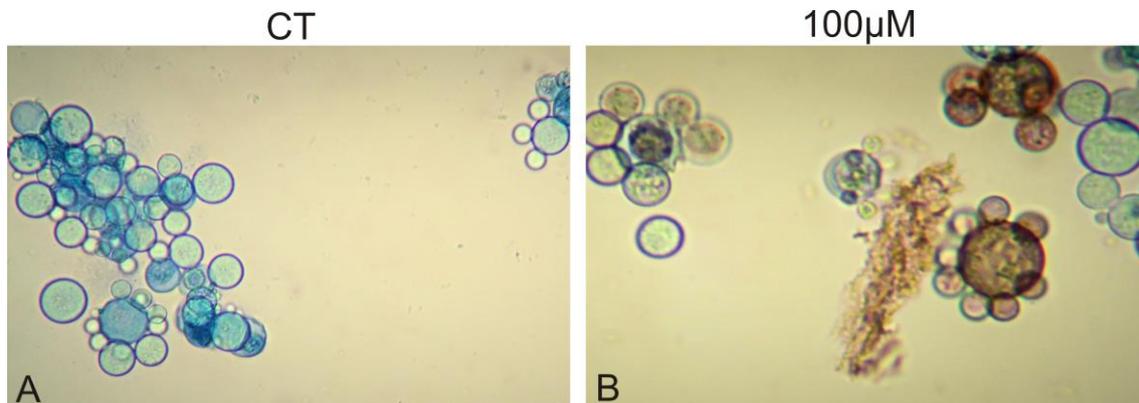


Figura 05. Células de leveduras de *Paracoccidioides* sp. em microscopia de luz. A) Células na condição controle (com corante azul de trypan). B) Células em excesso de cobre, 100µM.

Na figura 5 foi observado as células com coloração marrom (letra B), essas células são as expostas ao excesso de cobre (100µM), em comparação com a figura A, as células controle que apresentaram a coloração normal, sem pigmentação marrom.

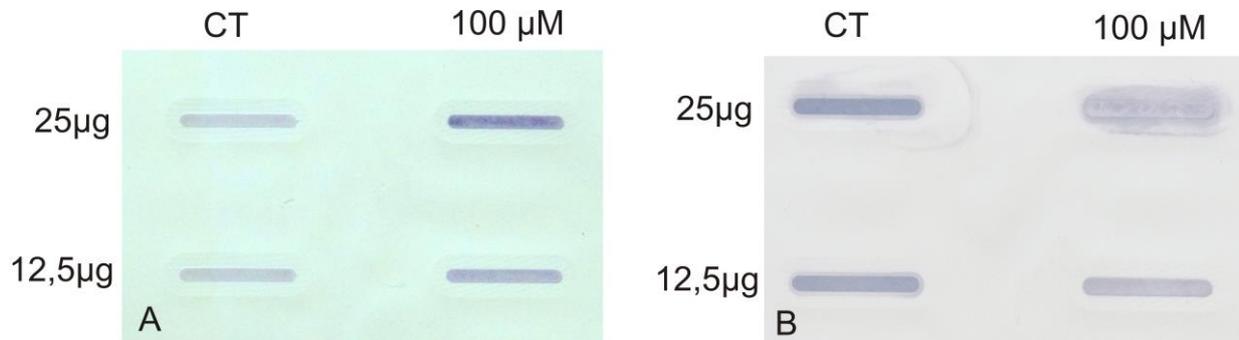


Figura 06. Análise de dot blot. A) Amostra controle e amostra de 100µM de cobre com anti-melanina. B) Amostra controle e amostra de 100µM com anti-enolase, como um padrão de ligação

A amostra foi submetida a maceração por nitrogênio, foi realizado a ligação das amostras com os anticorpos através do método de dot blot, foi utilizado 25 e 12,5 µg de amostras, CT e 100µM. Como observado em A, na condição controle (CT) não houve ligação com o anticorpo da melanina, já na condição de excesso (100µM) houve ligação nas duas concentrações, principalmente na de 25µg de amostra, mostrando assim uma maior produção de melanina. E na figura B mostra as amostras com um anticorpo padrão para validar o teste.

5.5. Análise proteômica de *Paracoccidioides* sp. em excesso de cobre

Posteriormente à realização das análises proteômicas por espectrômetro de massas modelo *Synapt G2 HDMSTM mass spectrometer* (Waters, Manchester, UK) de massa acoplado a cromatografia líquida de ultra desempenho pelo sistema *nanoACQUITYTM* (Waters Corporation, Manchester, UK), foi realizada a classificação funcional das proteínas identificadas nas condições controle e excesso de cobre. Os dados são apresentados como uma relação entre as classes de proteínas anotadas na condição de excesso de cobre (100 μ M de sulfato de cobre) em relação à condição controle. Na Figura 5, são apresentadas as proteínas induzidas na correlação de 100 μ M de sulfato de cobre/Controle, como acima citado. Verifica-se no gráfico A, que 43% das proteínas induzidas em excesso de cobre está envolvida com metabolismo. A segunda maior categoria funcional mostrada no gráfico são outras funções, como a detoxificação celular, resposta ao estresse oxidativo e tradução, representando 21% das proteínas induzidas em excesso de cobre. A proporção de 11% das proteínas induzidas está relacionada a destino proteico, sendo um total de 63 proteínas induzidas. No gráfico B são apresentadas as proteínas reprimidas na condição controle, 34% das proteínas estão na classe de metabolismo, 15% relacionadas a síntese proteica e 13% relacionadas a destino proteico, 8% relacionado com energia, ainda verificamos uma relação de 9% de proteínas com função de ligação e co-fator, em um total de 79 proteínas que estão reprimidas.

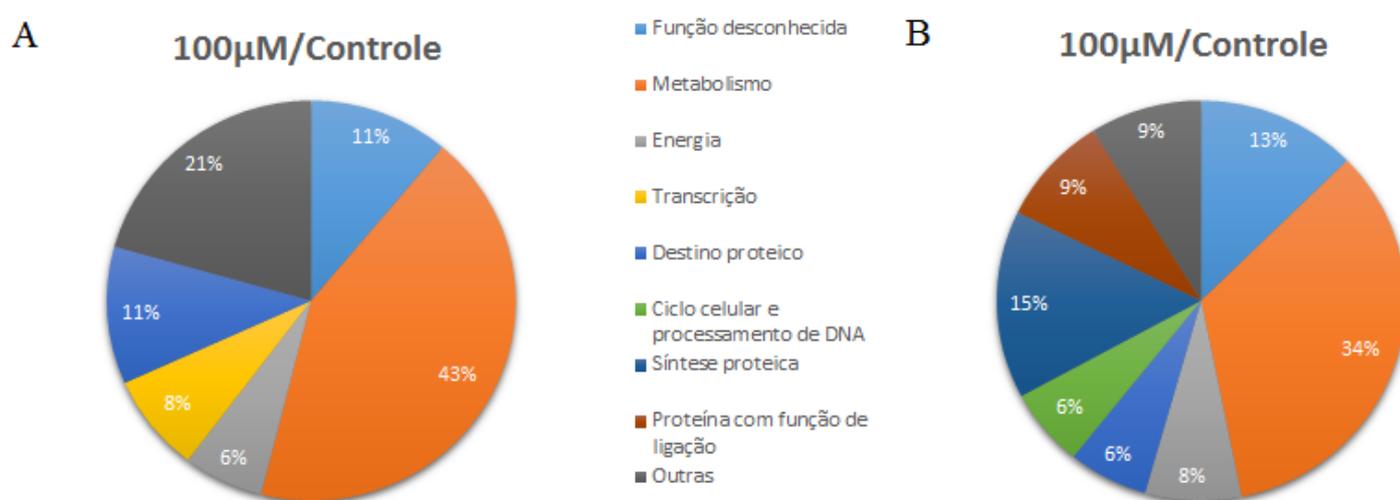
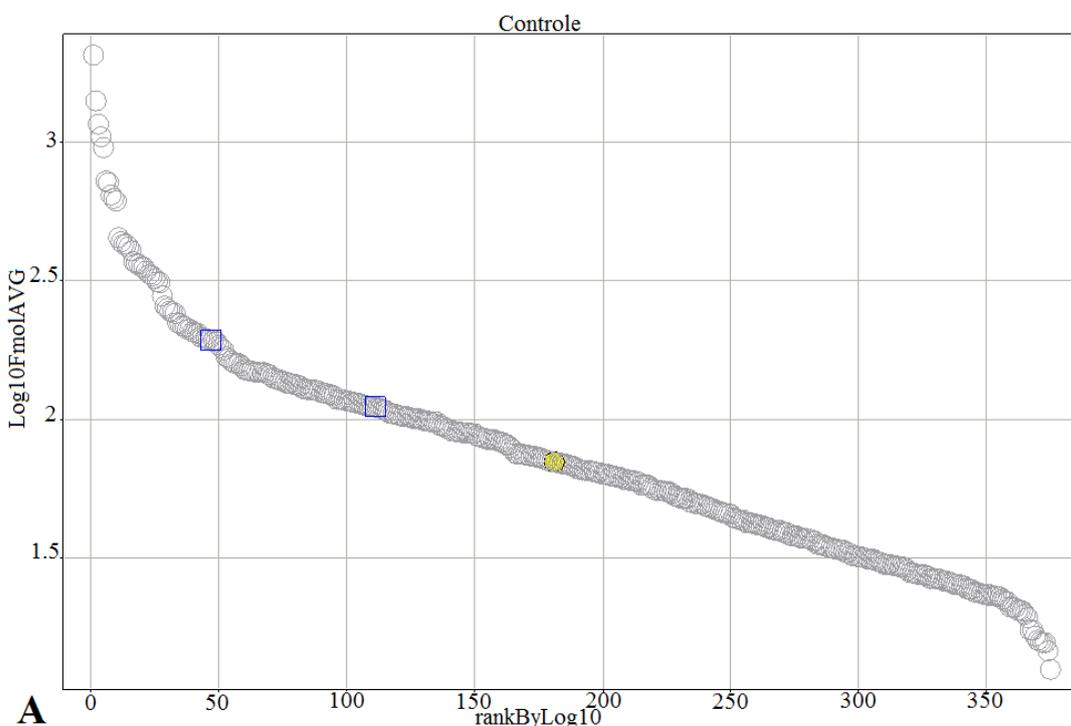


Figura 07. Painel A) Classes de proteínas induzidas durante o tratamento de células leveduriformes de *Paracoccidioides* sp. com 100 μ M de sulfato de cobre. Painel B) Classe de proteínas reprimidas na condição controle de células leveduriformes de *Paracoccidioides* sp. As proteínas foram anotadas utilizando-se o

banco de dados de processos biológicos MIPS Funcat e banco de dados como Uniprot e Pedant (http://pedant.helmholtz-muenchen.de/pedant3htmlview/pedant3view?Method=analysis&Db=p3_r48325_Par_brasi_Pb01), banco de dados Uniprot (<http://www.uniprot.org/>). Ao lado da figura está apresentada a legenda das cores com a função que cada uma representa.

5.6. Gráficos de qualidade

As separações e identificações dos peptídeos foi realizado pelo método de NanoUPLC-MS^E sendo a identificação das proteínas obtida pelo processamento dos espectros pelo *ProteinLynx Global Server* (PLGS) versão 2.4 (*Waters Corp, Milford, MA*), sendo que esta técnica tem mostrado melhor resultado quando comparado com o método convencional LC-MS/MS (Murad *et al.*, 2011). Posteriormente, os dados gerados dos peptídeos e das proteínas foram avaliados para se verificar a qualidade da análise do NanoUPLC-MS^E e a qualidade da identificação das proteínas. A figura 6 apresenta os gráficos dinâmicos de detecção da abundância de cada proteína, mostrando que obteve-se uma boa detecção, alcançando-se proteínas com alta e baixa abundâncias, muitas identificadas de forma regular, sendo que os dados mostraram uma boa faixa de detecção.



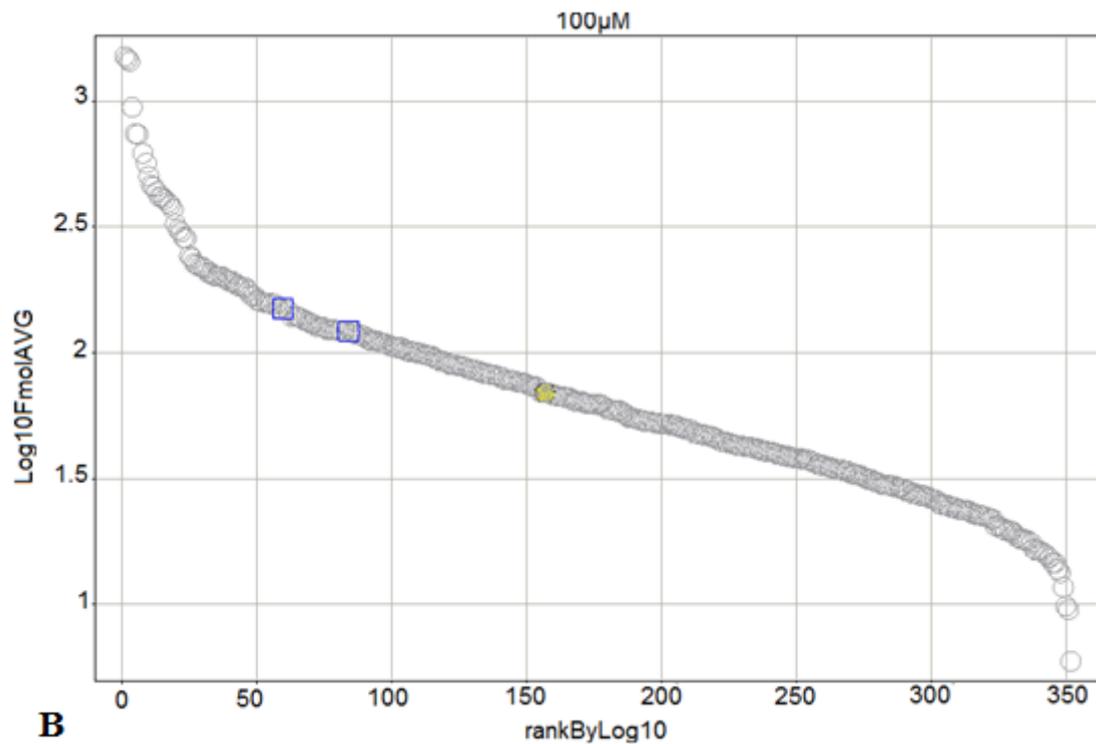


Figura 08. **Faixa de detecção dinâmica das proteínas.** O gráfico mostra a faixa de detecção das proteínas de acordo com a abundancia nas condições. Proteínas identificadas de forma regular são representadas por círculo, reversa por quadrados. A) Controle. B) 100µM de sulfato de cobre.

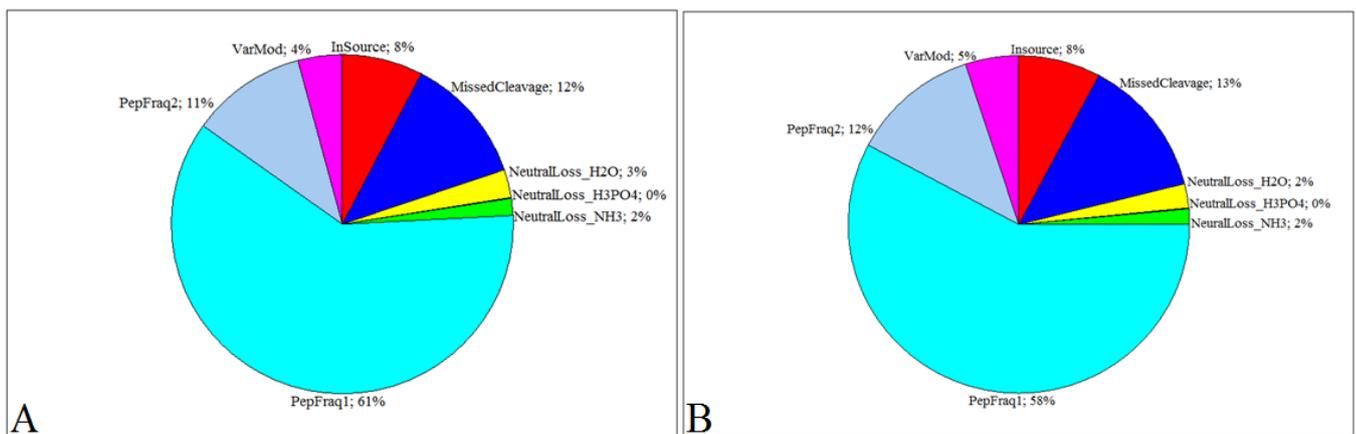
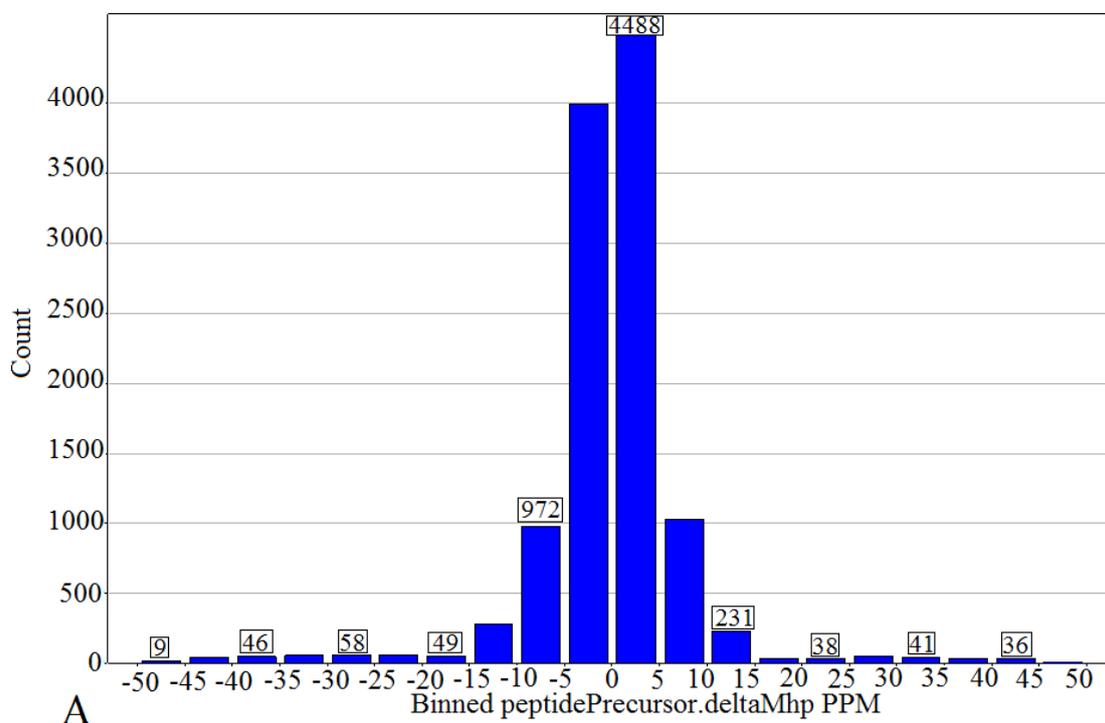


Figura 09. **Tipo de detecção dos peptídeos.** **Pepfrag 1** e **Pepfrag 2** indicam o tipo de identificação utilizando o banco de dados do *Paracoccidioides* pelo PLGS aplicando os algoritmos descritos por (Geromanos *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009); **VarMod**, modificações variáveis; **InSource**, corresponde a fragmentação ocorrida na fonte da ionização; **MissCleavage**, perda da clivagem pela tripsina; **NeutralLoss H2O**, **H3PO4** e **NH3**, corresponde às perdas de precursores de água, ácido fosfórico e amônia respectivamente. A) Controle; B) 100µM de sulfato de cobre.

Na condição controle, 61% dos peptídeos foram identificados no primeiro passo, 11% no segundo passo. Na perda de clivagem foram 12%, na fragmentação na fonte iônica foram 8%, modificações variáveis 4% e as perdas de precursores de 2% para H₂O, 0% para ácido fosfórico e 2% para amônia.

Na condição de 100µM de sulfato de cobre foi obtido 58% dos peptídeos no primeiro passo, no segundo passo com 12% dos peptídeos identificados. Na perda de clivagem foram 13% dos peptídeos, na fragmentação na fonte iônica foram 8%, modificações variáveis 5%, as perdas de precursores foram 2% para H₂O, 0% para ácido fosfórico e 2% para amônia, também conferindo um resultado confiável. Em geral os dados mostraram-se de boa qualidade, com os Pepfrag 1 e 2 com alta porcentagem e a perda por clivagem e fragmentação na fonte iônica foram baixas não passando de 15%.

Na figura 08 os gráficos demonstram a precisão na detecção de massa, mostrando que ambas as condições (Controle e 100µM de sulfato de cobre) observou-se que a maioria dos peptídeos detectados na análise tiveram erro menores que 15 ppm (partes por milhão).



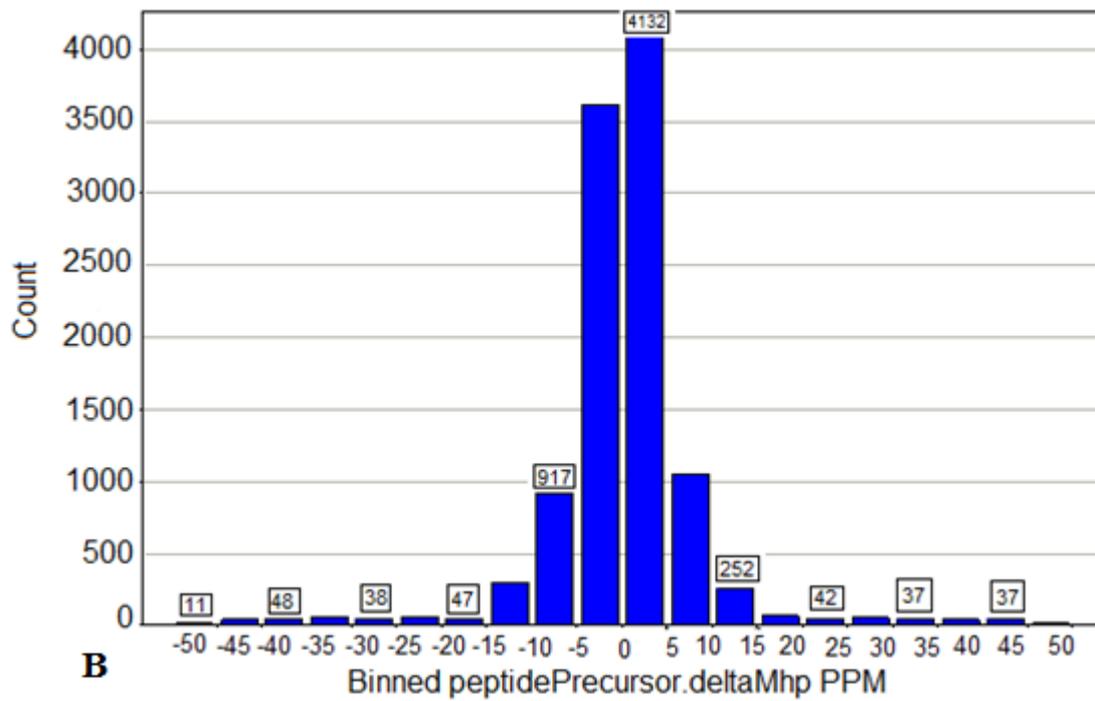


Figura 10. **Análise de precisão na detecção de massa.** Os gráficos mostram a acurácia na detecção das massas dos peptídeos nas condições analisadas. A) Controle; B) 100 μ M de sulfato de cobre.

5.7. Proteínas induzidas na presença de sulfato de cobre (100 μ M) com relação a condição controle

Foram identificadas proteínas induzidas no excesso de cobre relacionadas com metabolismo de aminoácidos, metabolismo de nitrogênio, relacionado com controle de transcrição, splicing e tradução. Foi identificado também proteínas de produção de etanol e do ciclo do glioxilato (malato sintase glioxissomal, isocitrato liase). Também proteínas de metabolismo de tirosina, como maleilacetoacetato isomerase e fumarylacetoacetase, a primeira relacionada com o metabolismo de tirosina e a segunda com a degradação

Foi identificado proteínas induzidas em excesso de cobre da via da pentose fosfato, como a Ribose-5-fosfato isomerase e transketolase, sendo a Ribose-5-fosfato isomerase responsável pela conversão da ribose-5- fosfato em ribulose-5-fosfato. Duas proteínas identificadas relacionadas com o ciclo do glioxilato (malato sintase glioxissomal e isocitrato liase) a primeira sintetiza malato a partir do isocitrato e a segunda que cliva isocitrato em succinato e glioxilato. Foi identificado uma proteína do ciclo do TCA, a malato desidrogenase, que converte malato em oxaloacetato. São mostrados também algumas proteínas relacionadas com desintoxicação, podendo ser uma defesa relacionada com o excesso de cobre.

Foi identificado também entre as proteínas induzidas em excesso de cobre, uma proteína que pode estar relacionada com a síntese de melanina, a Quinone oxidoreductase (NQO1). NQO1 é responsável pela conversão de dopaquinona em dopacromo, via leukodopacromo, realizando a síntese de eumelanina.

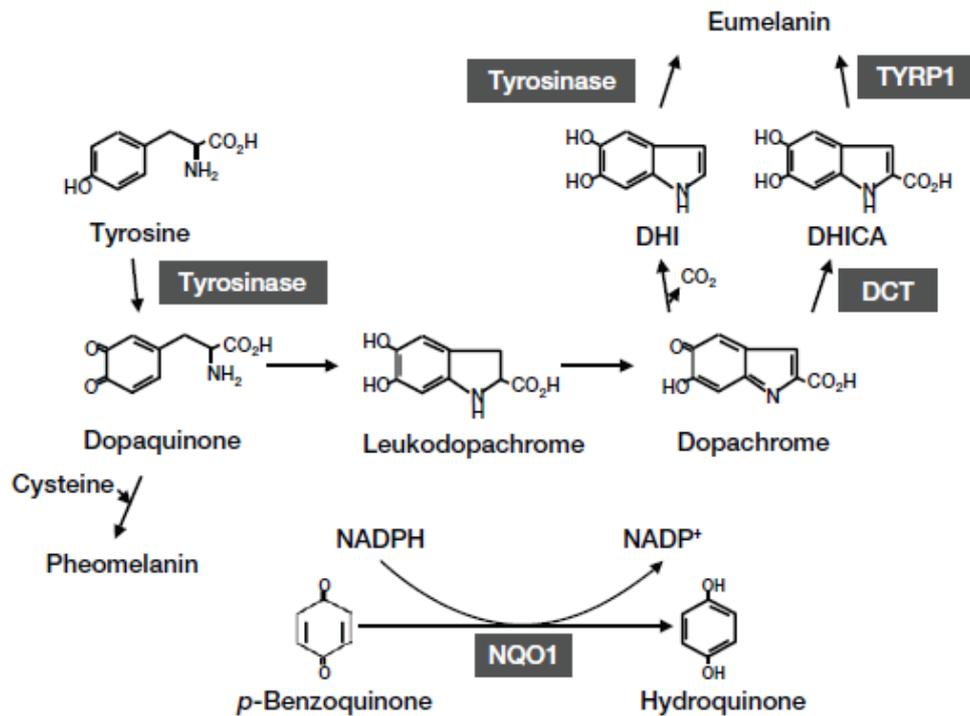


Figura 11. Representação de duas vias da biosíntese de melanina a partir da tirosina. Uma via é a Feomelanina, a outra é a Eumelanina. Mostrando passo a passo as reações e enzimas envolvidas no processo de síntese do pigmento. Na parte inferior da figura representa a reação da enzima quinone oxidoreductase. (Figura retirada do artigo NADPH:Quinone Oxidoreductase-1 as a New Regulatory Enzyme That Increases Melanin Synthesis. Journal of Investigative Dermatology. Autoria Yuji Yamaguchi *et al.*, 2009).

Tabela 01. Proteínas induzidas em condição de excesso de cobre (100 µM), em relação à condição controle, utilizando para identificação o NanoUPLC-MS^E.

	ID	Annotation	Score AVG	Fold Change	Biological process
Metabolism					
Amino acid metabolism					
	PAAG_09004	puromycin-sensitive aminopeptidase	1404	0,26	amino acid metabolism
	PAAG_04401	branched chain amino acid aminotransferase	7835,21	0,77	amino acid metabolism
	PAAG_01991	homoserine dehydrogenase	1517,76	0,46	amino acid metabolism
	PAAG_06431	ornithine aminotransferase	840,2	0,31	amino acid metabolism
	PAAG_05253	1 pyrroline 5 carboxylate dehydrogenase	1842,03	0,29	biosynthesis of glutamate
	PAAG_02901	S adenosylmethionine synthase	1509,73	0,43	degradation of methionine/metal binding
	PAAG_07813	cysteine synthase	402,67	0,34	biosynthesis of cysteine
	PAAG_08162	maleylacetoacetate isomerase	557,45	0,33	degradation of phenylalanine/oxidative stress response
	PAAG_08163	fumarylacetoacetase	1690,29	0,29	degradation of tyrosine
	PAAG_02644	kynurenine-oxoglutarate transaminase	3322,71	0,29	tryptophan metabolism
	PAAG_04443	spermidine synthase 293 aa	3932,36	0,33	metabolism of amines
Nitrogen and sulfur metabolism					
	PAAG_01321	oxidoreductase 2-nitropropane dioxygenase family	6798,33	0,39	nitrogen, sulfur and selenium metabolism
	PAAG_04966	hydrolase	272,6	0,69	nitrogen, sulfur and selenium metabolism
C-compound and carbohydrate metabolism					
	PAAG_07276	glycogen starch synthase	357,7	0,26	sugar, glucoside, polyol and carboxylate catabolism
	PAAG_06953	short chain dehydrogenase/reductase family	514,99	#	metabolism of sugar alcohols
Lipid, fatty acid and isoprenoid metabolism					
	PAAG_03960	isopentenyl diphosphate delta isomerase	1138,84	#	lipid, fatty acid and isoprenoid metabolism
	PAAG_02664	3-ketoacyl-CoA thiolase	4242,78	0,33	fatty acid metabolism
Purin nucleotide/nucleoside/nucleobase metabolism					
	PAAG_02633	ribose phosphate pyrophosphokinase 3	270,79	0,26	purin nucleotide/nucleoside/nucleobase metabolism
	PAAG_07529	orotidine 5 phosphate decarboxylase	384,23	#	purin nucleotide/nucleoside/nucleobase metabolism
Secondary metabolism					
	PAAG_00851	6 7 dimethyl 8 ribityllumazine synthase 175 aa	3184,12	0,26	biosynthesis of vitamins, cofactors, and prosthetic groups

	PAAG_08349	C-1-tetrahydrofolate synthase	223,6	#	biosynthesis of vitamins, cofactors, and prosthetic groups
Energy					
Glycolysis and gluconeogenesis					
	PAAG_02682	fructose-1,6-bisphosphatase	3528,84	0,40	glycolysis/gluconeogenesis
Glyoxylate cycle					
	PAAG_04542	malate synthase glyoxysomal	962,23	0,43	glyoxylate cycle
	PAAG_04549	isocitrate lyase	3541,62	0,31	glyoxylate cycle
Tricarboxylic -acid pathway					
	PAAG_00053	malate dehydrogenase	51538,34	0,26	TCA cycle
Electron transport and membrane-associated energy conservation					
	PAAG_03631	12-oxophytodienoate reductase	7855,65	0,33	electron transport and membrane-associated energy conservation
	PAAG_07246	cytochrome c oxidase	9256,1	0,27	electron transport
	PAAG_03309	suaprga1	8997,05	0,50	aerobic respiration
Ethanol production					
Pentose phosphate pathway					
	PAAG_05146	ribose 5 phosphate isomerase A	555,97	0,30	Pentose phosphate pathway
	PAAG_04444	transketolase	3325,64	0,26	Pentose phosphate pathway
Histones					
	PAAG_08918	histone H2B	5459,04	0,59	chromosome condensation
	PAAG_08917	histone H2A	678,39	0,38	chromosome condensation
	PAAG_07098	histone	11459,33	0,70	transcriptional control
	PAAG_07099	histone H3	1465,22	0,69	transcriptional control
	PAAG_00126	histone 156 aa	11617,49	0,66	transcriptional control
Transcription					
	PAAG_02437	U2 small nuclear ribonucleoprotein B	734,47	#	splicing
	PAAG_01630	small nuclear ribonucleoprotein LSM2	1085,35	#	splicing
Translational					
	PAAG_00689	ATP dependent RNA helicase eIF4A 399 aa	435,17	#	translation initiation
	PAAG_03028	elongation factor 1-beta	2181,4	#	translation elongation

Protein Fate

PAAG_05788	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A2	4925,2	0,29	protein folding and stabilization
PAAG_01778	peptidyl prolyl cis trans isomerase H 181 aa	649,71	#	protein folding and stabilization
PAAG_07037	calnexin	246,19	#	protein folding and stabilization
PAAG_01929	HNRNP arginine N-methyltransferase	289,6	#	posttranslational modification of amino acids

Binding

PAAG_03719	thimet oligopeptidase	422,01	0,38	protein/peptide degradation (Heavy metal binding; Cu, Fe, Zn)
PAAG_07319	xaa-Pro aminopeptidase	623,05	0,34	protein/peptide degradation (metal binding)
PAAG_07467	dipeptidyl-peptidase	850,37	0,26	cytoplasmic and nuclear protein degradation (heavy metal binding)
PAAG_04814	nucleic acid-binding protein	1669,77	0,27	nucleic acid-binding
PAAG_01454	catalase	2500,79	0,33	heavy metal binding
PAAG_02382	quinone oxidoreductase	2630,73	0,29	heavy metal binding
PAAG_06344	rab GDP-dissociation inhibitor	369,31	#	regulation by binding/dissociation
PAAG_03532	actin 361 aa	3705,71	0,31	ATP binding

Transport

PAAG_07890	vacuolar sorting protein snf7 223 aa	702,66	#	protein transport
------------	--------------------------------------	--------	---	-------------------

Cell rescue, defense and virulence

PAAG_00871	heat shock protein	10443,7	0,31	heat shock response
PAAG_05416	NADP dependent leukotriene B 4 12hydroxydehydrogenase	1408,49	0,72	detoxification
PAAG_05690	esterase D	736,99	#	detoxification response

Hypothetical protein

PAAG_12075	nuclear protein localization protein	239,56	#	-
PAAG_05761	4-carboxymuconolactone decarboxylase family protein	443,97	#	-
PAAG_01001	hypothetical protein	971,39	#	-
PAAG_00090	hypothetical protein	256,46	#	-
PAAG_00059	hypothetical protein	697,48	#	-
PAAG_01717	hypothetical protein	343,44	#	-
PAAG_00691	fumarylacetoacetate hydrolase domain-containing protein	1433,32	0,31	-

^a Identificação de proteínas diferencialmente regulados a partir de base de dados do genoma *Paracoccidioides* (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html) utilizando o ProteinLynx Global Server (PLGS) versão 2.4 (Waters Corporation. Manchester. UK);

^b Anotação das proteínas da base de dados do genoma de *Paracoccidioides* ou por homologia da base de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>);

^c Média de peptídeos correspondentes e pontuação para cada proteína obtida a partir de dados de MS usando o ProteinLynx Global Server (PLGS);

^d Perfis de expressão de proteínas em log₂ (Níveis de alteração), obtido a partir de ProteinLynx Global Server (PLGS) análise normalizada com padrão interno.

^e Processo biológico de proteínas diferencialmente expressas a partir de MIPS

(http://pedant.helmholtz-muenchen.de/pedant3htmlview/pedant3view?Method=analysis&Db=p3_r48325_Par_brazi_Pb01) e base de dados Uniprot (<http://www.uniprot.org/>).

#: Identificadas na condição de excesso de cobre (100 µM), na correlação 100 µM/BCS.

5.8. Proteínas reprimidas da correlação 100 μ M/Controle

A tabela 02 é referente as proteínas que estão reprimidas da correlação (100 μ M/Controle). Observa-se algumas diferenças com as proteínas induzidas, como o número de proteínas sendo maior no controle e também o metabolismo de triptofano e tirosina estando diminuído.

No metabolismo de carboidratos foi observado proteínas relacionadas com a glicólise e a gliconeogênese, como também na via do ciclo do TCA. Foi identificado muitas proteínas relacionadas com via de desintoxicação sendo reprimidas, não foi identificado nenhuma proteína que possa estar na via da melanina, sendo isto esperado, pois o fungo nesta condição (controle) não possui um estresse como no excesso de cobre.

Tabela 02. Proteínas reprimidas na condição de privação de cobre (BCS) na correlação 100µM/BCS utilizando para identificação o NanoUPLC-MS^E.

ID	Annotation	Score AVG	Fold change	Biological process
Metabolism				
Amino acid metabolism				
PAAG_08718	succinate-semialdehyde dehydrogenase	302,2	#	metabolism of glutamate
PAAG_00954	urease	580,12	#	metabolism of urea
PAAG_08065	aspartate semialdehyde dehydrogenase	423,66	-0,39	byosynthesis of lysine
PAAG_01568	glycine dehydrogenase	493,48	-0,44	byosynthesis of glycine
PAAG_02354	serine 3-dehydrogenase	963,7	-0,91	metabolism of serine
PAAG_04555	sarcosine oxidase	458,94	#	metabolism of serine
PAAG_08164	homogentisate 1 2 dioxygenase	732	-0,51	degradation of tyrosine
PAAG_08668	anthranilate synthase component 2	444,07	-0,40	byosynthesis of tryptophan
PAAG_05406	histidinol dehydrogenase	370,07	-0,59	byosynthesis of histidine
PAAG_08313	L-PSP endoribonuclease	17538,83	-0,34	byosynthesis of isoleucine
Nitrogen and sulfur metabolism				
PAAG_07811	sulfite oxidase	1591,57	-0,47	sulfur metabolism
C-compound and carbohydrate metabolism				
PAAG_01178	6 phosphogluconate dehydrogenase decarboxylating	2183,06	-0,61	C-compoud and carbohydrate metabolism
PAAG_03774	S hydroxymethyl glutathione dehydrogenase	829,2	#	C-compound and carbohydrate metabolism (Glycolysis and gluconeogenesis)
PAAG_08174	mannose-1-phosphate guanyltransferase subunit beta-A	243,41	#	C-compoud and carbohydrate metabolism
PAAG_01931	phosphoacetylglucosamine mutase	216,36	#	aminosaccharide anabolism
Purin nucleotide/nucleoside/nucleobase metabolism				
PAAG_06643	uracil phosphoribosyltransferase	801,46	#	pyrimidine nucleotide/nucleoside/nucleobase metabolism
Lipid, fatty acid and isoprenoid metabolism				
PAAG_08277	nitroreductase family protein	1110,38	#	regulation of lipid, fatty acid and isoprenoid metabolism
Secondary metabolism				
PAAG_07321	pyridoxine biosynthesis protein pyroA	912,35	-2,09	biosynthesis of vitamins, cofactors, and prosthetic groups
Energy				
Glycolysis and gluconeogenesis				
PAAG_08468	glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase	50703,93	-0,29	glycolysis and gluconeogenesis
PAAG_02869	phosphoglycerate kinase	1861,62	-0,30	glycolysis and gluconeogenesis
PAAG_00403	alcohol dehydrogenase	6679,8	-0,50	glycolysis and gluconeogenesis
PAAG_02050	pyruvate decarboxylase	2382,02	-0,57	glycolysis and gluconeogenesis
PAAG_08295	pyruvate dehydrogenase acetyl transferring E1 component alpha subunit	395,52	-0,86	glycolysis and gluconeogenesis
PAAG_01534	pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta	2469,4	-0,95	glycolysis and gluconeogenesis
PAAG_06380	pyruvate kinase	279,4	-1,06	glycolysis and gluconeogenesis
Tricarboxylic -acid pathway				

	PAAG_00417	succinyl-CoA ligase subunit alpha	669,93	-0,31	tricarboxylic-acid pathway (citrate cycle, Krebs cycle, TCA cycle)
	PAAG_01463	succinyl-CoA ligase subunit beta	535,92	-0,31	tricarboxylic-acid pathway (citrate cycle, Krebs cycle, TCA cycle)
	PAAG_00588	fumarate hydratase mitochondrial	563,21	-0,48	tricarboxylic-acid pathway (citrate cycle, Krebs cycle, TCA cycle)
	PAAG_08075	citrate synthase mitochondrial	1565,5	-0,74	tricarboxylic-acid pathway (citrate cycle, Krebs cycle, TCA cycle)
	PAAG_03330	dihydrolipoyl dehydrogenase	391,5	-1,01	tricarboxylic-acid pathway (citrate cycle, Krebs cycle, TCA cycle)
Cell cycle and DNA processing					
	PAAG_07339	S-phase Kinase-associated protein	2743,66	-0,60	cell cycle
	PAAG_04949	hypothetical protein	672,64	-0,36	nucleotide excision repair, DNA repair
	PAAG_00783	serine threonine protein phosphatase PP1	297,87	#	DNA conformation modification (e.g. chromatin)
	PAAG_00007	carboxy-terminal kinesin 2	221,74	#	mitotic cell cycle and cell cycle control
	PAAG_02396	actin	214,78	#	cytokinesis (cell division)/septum formation and hydrolysis
Transcription					
	PAAG_07785	116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component	51,08	#	mRNA synthesis
	PAAG_04637	pre mRNA splicing factor rse1	203,9	#	splicing
Protein Synthesis					
	PAAG_06569	60S ribosomal protein L43	3064,52	#	ribosome biogenesis
	PAAG_11125	60S ribosomal protein L5	2250,71	-0,31	ribosomal proteins
	PAAG_07707	60S ribosomal protein L10a	884,83	-0,34	ribosomal proteins
	PAAG_05946	40S ribosomal protein S27	2058,4	#	ribosomal proteins
	PAAG_01050	cytosolic large ribosomal subunit protein L30	5664,29	#	ribosomal proteins
	PAAG_05704	40S ribosomal protein	2785,47	#	ribosomal proteins
	PAAG_08634	40S ribosomal protein S12	1102,82	#	ribosomal proteins
	PAAG_02921	translation elongation factor Tu	438,89	-0,89	translational
	PAAG_11075	eukaryotic translation initiation factor 5A	228,99	#	translational
	PAAG_00594	elongation factor 2	745,66	-0,52	translational elongation
	PAAG_01777	alanyl tRNA synthetase	1136,81	-0,35	aminoacyl-tRNA-synthetases
	PAAG_08702	serine tRNA ligase	414,21	#	aminoacyl-tRNA-synthetases
Protein fate					
	PAAG_08059	hsp60 like protein	47575,89	-0,37	protein folding and stabilization
	PAAG_02823	small glutamine tetratricopeptide repeat-containing protein	882,98	#	protein folding and stabilization
	PAAG_00109	mitochondrial intermembrane space translocase subunit Tim	694,78	#	protein targeting, sorting and translocation
	PAAG_03038	ubiquitin-like modifier SUMO	1696,43	#	protein modification
	PAAG_05129	serine threonine protein phosphatase PP2A catalytic subunit	1066,05	#	modification by phosphorylation, dephosphorylation, autophosphorylation
Binding					
	PAAG_00244	polyadenylate binding protein cytoplasmic and nuclear	293,61	#	RNA binding
	PAAG_06811	heat shock protein ST11	1393,99	-1,12	RNA binding
	PAAG_06237	urease accessory protein UreG	518,98	#	metal binding
	PAAG_03717	myosin regulatory light chain cdc4	486,01	-0,59	calcium binding

	PAAG_07175	hypothetical protein	464,69	#	GTP binding
	PAAG_07634	GTP binding protein rhoA	1740,58	#	GTP binding
	PAAG_02820	GTP binding protein YchF	532,85	#	GTP binding
Transport					
	PAAG_07285	V type proton ATPase catalytic subunit A	530,48	#	cation transport
	PAAG_06224	carnitine O-acetyltransferase	457,89	-0,36	peroxisomal transport
Cellular communication					
	PAAG_02973	diploid state maintenance protein chpA	2482,18	#	cellular signalling
Cell rescue, defense and virulence					
	PAAG_02364	thioredoxin 117 aa	4436,76	-1,02	detoxification
Biogenesis of cellular components					
	PAAG_03931	glutathione S-transferase Gst 3	390,5	#	Cell wall
Hypothetical protein					
	PAAG_06752	hypothetical protein	3603,24	-0,36	-
	PAAG_00666	hypothetical protein	896,69	-0,39	-
	PAAG_08058	hypothetical protein/cofilin	1399,98	-0,49	Actin-binding
	PAAG_08005	hypothetical protein	771,05	-0,63	-
	PAAG_05019	hypothetical protein	2029,33	-0,65	-
	PAAG_03152	CobW domain-containing protein	342,66	-1,08	-
	PAAG_01347	actin cytoskeleton protein (VIP1)	293,99	-1,16	nucleic acid binding
	PAAG_06955	hypothetical protein	1227,68	#	s-adenosylmethionine-dependent methyltransferase activity
	PAAG_08179	hypothetical protein	608,57	#	zinc ion binding
	PAAG_03624	Arp2/3 complex subunit Arc16	218,82	#	-
	PAAG_07875	hypothetical protein	1973,71	#	-
	PAAG_01108	hypothetical protein	247,57	#	-

^aIdentification of differentially regulated proteins from *Paracoccidioides* genome database (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html) using the ProteinLynx Global Server (PLGS) version 2.4 (Waters Corporation. Manchester. UK);

^a Identificação de proteínas diferencialmente regulados a partir de base de dados do genoma *Paracoccidioides* (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html) utilizando o ProteinLynx Global Server (PLGS) versão 2.4 (Waters Corporation. Manchester. UK);

^b Anotação das proteínas da base de dados do genoma de *Paracoccidioides* ou por homologia da base de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>);

^c Média de peptídeos correspondentes e pontuação para cada proteína obtida a partir de dados de MS usando o ProteinLynx Global Server (PLGS);

^d Perfis de expressão de proteínas em log₂ (Níveis de alteração), obtido a partir de ProteinLynx Global Server (PLGS) análise normalizada com padrão interno.

^e Processo biológico de proteínas diferencialmente expressas a partir de MIPS

(http://pedant.helmholtz-muenchen.de/pedant3htmlview/pedant3view?Method=analysis&Db=p3_r48325_Par_bras_i_Pb01) e base de dados Uniprot (<http://www.uniprot.org/>).

*: Identificadas na condição de privação de cobre (BCS).

6.0. Discussão

Como observado nas análises de crescimento em placa em nosso estudo, o fungo obteve um bom crescimento nas diluições (10^5 e 10^4), na diluição posterior (10^3) houve uma diminuição do crescimento nas colônias do *Paracoccidioides* sp. nas concentrações de excesso de cobre (50 e $100\mu\text{M}$). As condições de controle e BCS (sem cobre) obteve um crescimento melhor. As concentrações de excesso de cobre tiveram sua viabilidade reduzida, principalmente a de $100\mu\text{M}$. Na viabilidade as concentrações não mostraram diferenças significativas, mostrando que apesar da diminuição do crescimento nas placas as células em sua maioria mantinham-se estáveis.

Em um trabalho com *Saccharomyces cerevisiae* que foi realizado a identificação de genes envolvidos na resposta tóxica de cobre e ferro, com a realização de mutantes, foi visto que houve uma alteração significativa no crescimento após a exposição a concentrações tóxicas de cobre e ferro e também a identificação de genes envolvidos na resposta aos metais tóxicos porém essenciais. Utilizando de bancos de dados, os autores viram que as respostas celulares da levedura incluem mecanismos homeostáticos como também mecanismos de reparação e proteção (William J JO *et al.*, 2007).

No mesmo estudo em *S. cerevisiae* foi realizado uma análise de crescimento do fungo quanto a sua sensibilidade á deleções de genes relacionados ao triptofano quando em excesso do metal cobre. Uma dessas análises foi realizada em placas de crescimento, com o meio normal (YPD) com 4 estirpes mutantes de genes do triptofano, e o meio com a suplementação de 10mM de sulfato de cobre. Foi observado, quando comparado ao controle, uma deficiência nas estirpes mutantes quando expostas ao excesso de cobre, até mesmo na estirpe selvagem houve uma pequena diminuição do crescimento quando exposto a essa concentração alta do metal, visto a relação do triptofano com proteínas correlacionadas com o cobre (William J JO *et al.*, 2007).

Como mostrado nos resultados as células de *Paracoccidioides* sp apresentaram melanização em resposta ao excesso de cobre. Em um estudo com diferentes estirpes de *Cryptococcus neoformans*, estirpes ambientais e estirpes clínicas, em diferentes concentrações de cobre ($5\mu\text{M}$, $20\mu\text{M}$, $100\mu\text{M}$ e $200\mu\text{M}$) foi observado o crescimento e a presença ou não de melanização, classificado em níveis diferentes sendo que o crescimento foi realizado em placas com o meio L-Dopa agar, com a adição dessas concentrações de cobre. A estirpe clínica ATCC90112 e a ICB 161 não excederam o nível 3 de melanização (0 ao 5), quando cresceram no maior nível de cobre, $200\mu\text{M}$. Porém as outras estirpes tiveram um maior nível de

melanização, como a estirpe VPBet, que obteve um nível 4 na concentração de 5 μ M de cobre e um nível 5 na concentração de 200 μ M. A estirpe ambiental C1 obteve nível 4 quando crescida em 20 μ M de cobre e nível 5 também em 200 μ M de sulfato de cobre, já as estirper HNR41 e B02 apresentaram nível 3 de melanização em 100 e 200 μ M de sulfato de cobre (Mauch, RM *et al.*, 2013). Esses resultados mostram a relação do cobre com a melanização das células fúngicas, visto que os estudos das placas do excesso de cobre em *Paracoccidioides* sp. mostrou pigmentações escuras. A melanina tem importância na virulência do microrganismo e proteção contra estresses ambientais, como altas temperaturas, raios solares, radiações, UV e componentes tóxicos, como metais pesados (Nosanchuk JD & Casadevall A, 2003; Mironenko NV *et al.*, 2000; Rosas AL & Casadevall A, 1997).

Os resultados obtidos da qRT-PCR mostraram o comportamento de genes envolvidos na homeostase de cobre em excesso do metal na célula. O Ctr3 é um transportador transmembranar de alta afinidade de cobre, responsável por captar o cobre do ambiente. No excesso de cobre em *Paracoccidioides* sp. levedura, o Ctr3 teve sua expressão reduzida, pelo fato da alta quantidade de cobre disponível. Em um trabalho com *Paracoccidioides* sp. foi realizado a análise de expressão do Ctr3 em micélio, levedura e na infecção em macrófagos (Dantas *et al.*, 2009). Notando que a expressão de Ctr3 nas células leveduriformes em condições normais mostrou-se estabilizado, com o transportador ativo porém não muito elevado, já no micélio em condições normais o Ctr3 mostrou-se com a expressão menor que a levedura. Em macrófagos infectados foi visto uma elevação da expressão do transportador, quando comparado com a levedura e principalmente com o micélio em condições normais. Também foi realizado a análise da expressão do Ctr3 em células leveduriformes derivadas de infecção em fígado e baço. A análise foi realizada nas células leveduriformes normais, mostrando uma expressão de 1 vez e nas células de levedura derivadas da infecção em fígado de 15 dias, que mostrou uma elevação na expressão para 2,5 vezes e o de baço aumentou para 3 vezes, mostrando assim a relação do Ctr3 na importância para o estabelecimento da infecção, também como a importância do cobre nesses processos (Dantas *et al.*, 2009).

Em um estudo de transportador de cobre em *S. cerevisiae*, foi realizado as análises de expressão do Ctr1 que como o Ctr3 também é um transportador de alta afinidade e com o Ctr2, que é um transportador de baixa afinidade de cobre (Liu *et al.*, 2012). No estudo em questão foram analisados os níveis de expressão dos transportadores também por qRT-PCR, utilizado nesse caso o cloreto de cobre para a suplementação, BCS (quelante de cobre) para a amostra sem o cobre e o controle, sem a adição nem remoção de nenhum componente. Foram

adicionados as amostras de cobre 100µM do cloreto e para as amostras sem privadas de cobre adicionado 40 µM de BCS, posteriormente realizado as análises, onde tanto o Ctr1 quanto o Ctr2 mostraram-se reprimidos nas condições de excesso de cobre, já nas condições de depleção ambos mostraram-se induzidos, o Ctr1 mais que o Ctr2, já que ele é o de alta afinidade (Liu *et al.*, 2012). Mostrando que os transportadores da família Ctr são mais ativos em privação do cobre e em excesso não há a necessidade da ativação dos transportadores.

Os resultados do outro gene analisado, ATX1 de uma chaperona de cobre, responsável por se ligar ao cobre e guiar em seus destinos celulares, mostraram-se induzidos no excesso de cobre, quando comparado com o controle, visto que o Atx1 tem a função de se ligar ao cobre dentro da célula, após a captura do cobre pelos transportadores, Atx1 age como distribuidor do cobre. Em um estudo realizado no fungo *Paracoccidioides brasiliensis* com genes envolvidos na homeostase de cobre, foi realizado a qRT-PCR para avaliar a expressão de ATX1 em condições normais, de ausência de cobre, ausência de ferro e ausência de ambos os metais. Mostrando os resultados que o Atx1 em condição normal estava expresso exercendo sua função, porém quando realizado em condição de privação de cobre e a ausência de cobre e ferro houve uma diminuição na expressão da chaperona, isso não ocorreu na ausência apenas do ferro, mostrando assim a importância de Atx1 para a homeostase de cobre e corroborando com nossos resultados.

Nas análises proteômicas obtidas, nos gráficos de funcionalidade, das proteínas induzidas, mostraram uma quantidade maior de proteínas relacionadas com o metabolismo, na condição 100µM/CT proteínas induzidas 43% das proteínas identificadas está representada no metabolismo. No trabalho realizado no gênero *Paracoccidioides*, foi analisado metaloproteínas de cobre, ferro e zinco, sendo que no *Pb* 01 na análise preditiva de cobre, no gráfico funcional mostra a maior parte das proteínas relacionadas com o metabolismo. Outras funcionalidades que estavam representadas eram o transporte de íons, transcrição, energia e defesa celular (Tristão *et al.*, 2015), corroborando com a análise de funcionalidade do excesso de cobre no *Paracoccidioides lutzii*, onde obteve muitas proteínas relacionadas com o metabolismo, como também de energia, transcrição e algumas também relacionadas a defesa celular. Ainda no trabalho de Tristão *et al.*, 2015, foi realizado a análise da quantidade de metaloproteínas em cada espécie de *Paracoccidioides*, sendo que no *Paracoccidioides lutzii* foi encontrado a maior quantidade de metaloproteínas, com 54 proteínas, o total de metaloproteínas encontrado nas espécies utilizada foi de 547.

Nas tabelas de classificação das proteínas identificadas no estudo em questão, nas condições de excesso de cobre, na análise de 100µM/CT, nas proteínas induzidas observa-se que foram classificadas proteínas relacionadas com o metabolismo de aminoácidos, metabolismo de nitrogênio, metabolismo de carbono e as vias metabólicas que tem enzimas e proteínas identificadas como induzidas são as vias do glioxilato, via ácido cítrico e via das pentoses, não foram encontradas todas as enzimas das vias, porém a regulação destas pode estar acontecendo pelo fato do fungo necessitar de energia no estresse que está passando e pelo fato de ser identificado as enzimas chaves das vias que podem também deixar seus precursores para outras vias.

Em um estudo proteômico com a bactéria *Acidithiobacillus ferrooxidans* em excesso de cobre, na análise proteômica, o microrganismo regula várias metabólicas para gerar energia para causar com esse estresse celular causado pelo metal tóxico. *A. ferrooxidans* contém várias enzimas da via do ácido tricarboxílico (TCA), faltando o α -cetoglutarato desidrogenase, porém o piruvato pode ser utilizado como uma fonte para reoxidar o NADH e para a formação de citrato e α -cetoglutarato. Foram identificados várias proteínas na produção e conversão de energia como citrato sintase II, piruvato desidrogenase, que fazem parte ou alimentam o ciclo do TCA apresentaram níveis aumentados em *A. ferrooxidans* na presença de excesso de cobre (Almárcegui, RJ *et al.*, 2013). Outros resultados similares foram apresentados em *Ferroplasma acidarmanus* e *Exiguobacterium* sp. sob estresse de arsênico (Belfiore, C *et al.*, 2013). Em *A. ferrooxidans* na análise de funcionalidade das proteínas das células em contato com excesso de cobre, foi visto que grande parte das proteínas está relacionado com metabolismo 56%, dentro do metabolismo 23% pertencia ao transporte e metabolismo de aminoácidos e 13% com transporte de íons inorgânicos, está parte também corroborando com os resultados anteriores, pois no excesso de cobre em *Paracoccidioides* sp. a maior parte era relacionada com o metabolismo, muitas fazendo parte do metabolismo de aminoácidos.

No mesmo estudo de (Almárcegui, RJ *et al.*, 2013) na análise proteômica foram identificados proteínas relacionadas com o complexo do citocromo, este sendo componente da cadeia respiratória aeróbica, sendo muito encontrado em *Escherichia coli* em condições de baixo arejamento. Portanto são utilizados por microrganismos para continuar a respiração em condições de baixo oxigênio. Sendo evidente que é vantajoso a utilização de citocromo oxidases para a sobrevivência dos microrganismos. Assim o *A. ferrooxidans* utiliza também uma oxidase devido a diminuição da respiração pelo excesso de cobre (Cook GM & Poole RK, 2000; Junemann S, 1997; VanOrsdel CE *et al.*, 2013).

Em níveis elevados de cobre, *A. ferrooxidans* apresentou níveis altos de uma proteína, a fosfoglucomutase. Esta enzima é responsável por gerar glicose-6P para glicose-1P, podendo gerar energia para formar o açúcar fosforilado ou ir para a via das pentoses para gerar ribose e reduzir o NADPH (Almárcegui, RJ *et al.*, 2013). Corroborando com os resultados obtidos, pois no 100µM/BCS, a fosfoglucomutase e a ribose-5-fosfato isomerase está presente nas proteínas induzidas no excesso de cobre.

No trabalho com a identificação preditiva das proteínas do gênero *Paracoccidioides* spp., foi encontrado na análise das proteínas relacionadas com o cobre, proteínas relacionadas com o transporte de íons e com a síntese de melanina foram as mais evidentes, com 6 transportadores de cobre e 3 lacases que estão envolvidas na síntese de melanina. Apenas duas proteínas relacionadas com a resposta ao estresse, sendo que a superóxido dismutase é dependente de cobre (Tristão *et al.*, 2015). Nos resultados obtidos no excesso de cobre no presente trabalho houveram algumas proteínas que estão relacionadas a síntese de melanina, como também algumas com a função de resposta ao estresse.

A análise das metaloproteínas do gênero *Paracoccidioides* spp., revelou as principais moléculas de aquisição e distribuição do cobre. As moléculas transportadoras de cobre ATPases são importantes na detoxificação e tráfego da molécula de cobre. Outros fatores importantes na homeostase são os transportadores de alta afinidade e as chaperonas (Festa & Thiele, 2012), sendo que na análise proteômica das células do *Paracoccidioides* sp. em excesso de cobre, nas proteínas induzidas houve a identificação de algumas chaperonas.

Um estudo de *S. cerevisiae* onde estavam sendo analisados genes envolvidos com a homeostase de cobre e a resposta ao excesso de cobre, foram identificados os genes e a classificação destes. Identificando genes relacionados com o transporte celular que estavam altamente expressos, níveis de genes com funções vacuolares também estavam aumentados, também com processos endossomais, biossíntese de aminoácidos, particularmente a biossíntese de triptofano, genes relacionados a homeostase e reparos aos danos do DNA, todos induzidos (Liu *et al.*, 2012). Assim como em excesso de cobre em *Paracoccidioides* sp., a síntese de aminoácidos, incluindo o triptofano, como proteínas relacionadas com a homeostase e reparo de danos do DNA estavam com a expressão aumentada.

Também foram realizados estudos de excesso de cobre em outros organismos, como um estudo realizado em raízes de arroz exposto ao cobre, e posteriormente realizado a análise proteômica, primeiramente utilizando o IMAC, depois de separadas as proteínas relacionadas com o cobre foram identificadas por MALDI-TOF/TOF MS. Foram identificados proteínas

envolvidas na defesa antioxidativa, como peroxidases, L-ascorbato peroxidase, glutathione S-transferase e quinone-oxidoreductase. Também foi identificadas proteínas relacionadas com o metabolismo de carboidratos, como NADPH-dependente, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, manose 6-fosfato. Essas proteínas identificadas estão relacionadas com algumas vias metabólicas, a manose 6-fosfato sendo intermediária da pentose fosfato, ou participando do ciclo do ácido cítrico, ou da via da glicólise, já o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, participa da via da glicólise. Também foram identificadas proteínas relacionadas ao metabolismo de alguns aminoácidos (Yufeng Song *et al.*, 2014). A quinone-oxidoreductase foi identificada nas proteínas de excesso em *Paracoccidioides* sp. e está relacionada com defesa antioxidante da célula como também pode participar da via de biossíntese de melanina, notando também que no *Paracoccidioides* sp. houve algumas proteínas relacionadas com as vias do glioxilato, ácido cítrico e via das pentoses.

7.0. Considerações finais

Com os resultados obtidos nesse estudo, da análise do comportamento de crescimento, expressão gênica e proteômica do fungo *Paracoccidioides* sp. exposto ao excesso do metal cobre, primeiramente se tratando de um metal que em excesso pode se tornar tóxico a célula, o fungo obteve uma boa resistência, crescimento e viabilidade celular até a concentração de 100µM de sulfato de cobre, mostrando na análise de viabilidade celular que continuou viável mesmo exposto ao cobre por muitas horas. Mostrou também na análise em placa que obteve um crescimento satisfatório, como também teve uma coloração marrom das células, levantando a hipótese que na presença de muito cobre, a célula consiga ou tem a necessidade de sintetizar melanina, pois em alguns estudos mostra a forte relação do cobre com a melanina e da importância da melanina na virulência e na defesa celular. Mostramos a importância da homeostase celular através de transportadores e chaperonas, que em excesso do metal tem a capacidade de regular a expressão dessas biomoléculas de acordo com a condição que se encontra e com a necessidade que tem de algum nutriente. Como foi visto a expressão do Ctr3 em excesso do micronutriente cobre foi reduzida, por se ter muito cobre disponível, não tendo a necessidade de ativar um transportador transmembranar, também a fim de não intoxicar a célula, já o Atx1 estava aumentado, talvez se tratando de ser uma chaperona intracelular.

Com a condição em que a célula do fungo se encontra, com excesso de cobre, foi realizado a análise das proteínas, visto que o fungo procura meios de defesa celular, podendo ser proteínas relacionadas ao estresse, como proteínas relacionadas a melanina, como visto também em outros organismos que buscam estratégias semelhantes. Houve em alguns casos um aumento no metabolismo de aminoácidos, tanto com síntese quanto degradação, o que pode ser uma estratégia do fungo de obter meios de resistência a condição de estresse. Algumas vias metabólicas foram expressas na condição de excesso, para buscar energia para a sobrevivência celular em meio ao estresse causado pelo cobre, foram identificados algumas enzimas, que são fundamentais para as vias metabólicas, alguns intermediários também que participam dessas vias, ciclo do ácido cítrico (TCA), pentose fosfato, ciclo do glioxilato, todos uma estratégia de obtenção de energia para manter os processos biológicos.

Com esse estudo, pode-se dizer que o excesso de cobre causa um estresse no fungo, que busca estratégias de homeostase do metal, proteção celular e também busca formas para a respiração celular e obtenção de energia. Existe uma gama de proteínas que dependem do cobre para o devido funcionamento, o cobre é um metal de extrema importância, porém tem que ser mantido nos níveis corretos, para não causar nenhum estresse á célula. Necessita-se de uma

maior investigação sobre as respostas da célula ao excesso de cobre para entendermos melhor essa relação, de importância para o ciclo celular e da necessidade do controle desse metal para não interferir no ciclo celular. A pigmentação marrom que apareceu no fungo nas placas com cobre tem-se a hipótese de produção de melanina, porém necessita de maiores análises e estudo para entendermos melhor este acontecimento.

8.0. Referências bibliográficas

Almarcegui RJ, Navarro C, Paradela A, Aalvar JP, Von Bernath D, Jerez CA New copper resistance determinants in the extremophile *Acisithiobacillus ferrooxidans*: a quantitative proteomic analysis. *J Proteome*. 2013.

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

Bagagli E, Sano A, Coelho KI, Alquati S, Miyaji M, De Camargo ZP, Gomes GM, Franco M, Montenegro MR. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus noveminctus*) captured in a endemic area of paracoccidioidomycosis. *AM. J. Trop. Med. Hyg* v. 58, p. 505 – 512. 1998.

Banci L, Cantini F & Ciofi-Baffoni S. Cellular copper distribution a: mechanistic systems biology approach. *Cell Mol Life Sci*, p 2563-89. 2010.

Banci, L., Bertini, I., Chasapis, C.T., Rosato, A. & Tenori, L. Interaction of the two soluble metal-binding domains of yeast Ccc2 with copper(I)-Atx1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 364, 645–649. 2007.

Belfiore C, Ordoñez OF, Farías ME (2013) Proteomic approach of adaptive response to arsenic stress in *Exiguobacterium* sp. S17, an extremophile strain isolated from a high-altitude Andean Lake stromatolite. *Extremophiles* 17:421–431

Bertini, I., Gray, H.B., Stiefel, E. & Valentine, J.S. *Biological Inorganic Chemistry* Sausalito, California, USA. 2007.

Bisinelli JC, Ferreira MLS. Doenças infecciosas: paracoccidioidomicose (blastomicose sul-americana). In: Tommasi AF. *Diagnóstico em patologia bucal*. 3ª ed. São Paulo: Pancast, p. 202-9. 2002.

Bookout, A.L., Jeong, Y., Downes, M., Yu, R.T., Evans, R.M., and Mangelsdorf, D.J. *Cell* 126, p. 789–799. 2006.

Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev*, v. 6, p. 89-117. 1993.

Carrero LL, Niño-Vega G, Teixeira MM et al. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. *Fungal Genet Biol*, v. 45, p. 605–612. 2008.

C. Askwith *et al.*, *Cell* 76, p. 403. 1994.

Cobine, P.A., Pierrel, F., and Winge, D.R. Copper trafficking to the mitochondrion and assembly of copper metalloenzymes. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1763, p. 759–772. 2006.

Cook, G. M.; Poole, R. K. Oxidase and periplasmic cytochrome assembly in *Escherichia coli* K-12: CydDC and CcmAB are not required for haem-membrane association. *Microbiology*, v. 146, p. 527–536. 2000.

Cox, G.M. *et al.* Superoxide dismutase influences the virulence of *Cryptococcus neoformans* by affecting growth within macrophages. *Infect. Immun.* V. 71, p. 173–180 2003.

Dantas SFIM, Rezende TCVR, Bailão AM, Taborda CP, Santos RS, Castro KP, Soares CMA. Identification and characterization of antigenic proteins potentially expressed during the infectious process of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes and Infection*. 2009.

De Feo, C.J., Aller, S.G., and Unger, V.M. A structural perspective on copper uptake in eukaryotes. *Biometals*, v. 20, p. 705–716. 2007.

De Freitas, J., Wintz, H., Kim, J. H., Poynton, H., Fox, T., and Vulpe, C. Yeast, a model organism for iron and copper metabolism studies. *Biometals*, v. 16(1), p. 185–197. 2003.

Doherty, C.P. Host-pathogen interactions: the role of iron. *J. Nutr.* 137, p. 1341–1344 2007.

D. S. Yuan *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 2632. 1995.

Fan, W., Kraus, P.R., Boily, M.J. & Heitman, J. *Cryptococcus neoformans* gene expression during murine macrophage infection. *Eukaryot. Cell* v. 4, p. 1420–1433. 2005.

Feldmesser, M., Kress, Y., Novikoff, P. & Casadevall, A. *Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. *Infect. Immun.* v. 68, p. 4225–4237. 2000.

Festa R. A., Thiele D. J. Copper at the front line of the host-pathogen battle. *PLoS*. 2012.

FILLER, S. G.; SHEPPARD, D. C. Fungal invasion of normally non-phagocytic host cells. *PLoS Pathog*, v. 2, n. 12, p. e129. 2006.

Franco M, Lacaz C.S, Restrepo A, Del Negro G. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton: CRC Press, p 409. 1994.

Geromanos SJ, Vissers JP, Silva JC, Dorschel CA, Li GZ, Gorenstein MV, Bateman RH, Langridge JJ. The detection, correlation, and comparison of peptide precursor and product ions from data independent LC-MS with data dependant LC-MS/MS. *Proteomics* v. 9, p. 1683-1695. 2009.

Gómez BL, Nosanchuk JD, Díez S, Youngchim S, Aisen P, Cano LE, Restrepo A, Casadevall A, Hamilton AJ. Detection of melanin-like particles in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* in vitro and during infection. *Infect Immun*. 2001.

Heitman, J., Filler, S.G., Edwards, J.E.J. & Mitchell, A.P. *Molecular Principles of Fungal Pathogenesis*. American Society for Microbiology, Washington, DC. 2006.

Hooper, L.V. *et al.* Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science* v. 291, p. 881–884. 2001.

Huffnagle, G.B. *et al.* Down-regulation of the afferent phase of T cell-mediated pulmonary inflammation and immunity by a high melanin-producing strain of *Cryptococcus neoformans*. *J. Immunol.* v. 155, p. 3507–3516. 1995.

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

IX International Meeting on Paracoccidioidomycosis. Aguas de Lindoia, S. Paulo, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, p. 4–13. 2005.

Jünemann, S. Cytochrome bd terminal oxidase. *Biochim. Biophys. Acta*, p. 107–127. 1997.

Jung, W.H., Sham, A., White, R. & Kronstad, J.W. Iron regulation of the major virulence factors in the AIDS-associated pathogen *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Biol.* 4, e410 2006.

Kim B-E, Nevitt T na Thiele DJ. Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. *Nat ChemBiol* v 4, p. 176-185. 2008.

Lacaz C.S, Porto E, Martins J.E. Paracoccidioidomycosis : *Micologia Médica*, 8 ed, p 248-261. 1991.

Laird NM, Horvath S, Xu X. Implementing a unified approach to family-based tests of association. *Genet Epidemiol.* P. 36-42. 2000.

Lallioti V, Muruais G, Tsuchiya Y, Pulido D & Sandoval IV Molecular mechanisms of copper homeostasis. *Front Biosci.* v. 14, p. 4878–4903. 2009.

Lee, J.L., Peña, M.M.O., Nose, Y., and Thiele, D.J. Biochemical characterization of the human copper transporter Ctr1. *J. Biol. Chem.* v. 277, p. 4380–4387. 2002.

Li GZ, Vissers JP, Silva JC, Golick D, Gorenstein MV, Geromanos SJ. Database searching and accounting of multiplexed precursor and product ion spectra from the data independent analysis of simple and complex peptide mixtures. *Proteomics* v. 9, p. 1696-1719. 2009.

Liu Z, Tyo KE, Martinez JL, Petranovic D, Nielsen J. Different expression systems for production of recombinant proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioengv.* 5, p. 1259-68. 2012.

Lima SL, Casaletti L, Bailão AM, Vasconcelos ATR, Fernandes GR, Soares CMA. Transcriptional and proteomic responses to carbon starvation in *Paracoccidioides*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 2014.

Lin, X. & Heitman, J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annu. Rev. Microbiol.* v. 60, p. 69–105. 2006.

Linder M. and C.A. Goode. *Biochemistry of Copper*. New York: Plenum Press. 1991.

Lihua Liu, Jin Qi, Zemin Yang, Lianghong Peng, Chenghua Li. Low-affinity copper transporter CTR2 is regulated by copper-sensing transcription factor Mac1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical research communications*, China. 2012.

Lippard, S.J. & Berg, J.M. *Principles of Bioinorganic Chemistry*. University Science Books, Mill Valley, California, USA. 1994.

Londero A.T. Paracoccidioidomicose: Patogenia, formas clínicas, manifestações pulmonares e diagnóstico. *J. Pneumol, Bazil.* 1986.

Lutsenko, S., and Petris, M.J. Function and regulation of the mammalian copper-transporting ATPases: Insights from biochemical and cell biological approaches. *J. Membr. Biol.* v. 191, p. 1–12. 2003.

Madsen, E. & Gitlin, J.D. Copper and iron disorders of the brain. *Annu. Rev. Neurosci.* v. 30, p. 317–337. 2007.

Marques SA. Paracoccidioidomicose. *An Bras Dermatol.* v.73, p. 455–69. 1998.

Martinez R. Paracoccidioidomicose. In: Sidrim JJC, Rocha MFG. *Micologia médica à luz de autores contemporâneos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 204-21. 2004.

Matute DR, McEwen JG, Puccia R et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol Biol Evol* v. 23, p. 65–73. 2006.

Mauch RM, Cunha VO, Dias ALT. The copper interference with the melanogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* v. 55, p. 117 – 20. 2013.

Mendes-Giannini MJ, Soares CP, da Silva JL, Andreotti PF. Interaction of pathogenic fungi with host cells: molecular and cellular approaches. *FEMS Immunol Med Microbiol*, v. 45, p. 383-394. 2005.

Mironenko NV, Alekhina IA, Zhdanova NN, Bulat SA. Intraspecific variation in gamma-radiation resistance and genomic structure in the filamentous fungus *Alternaria alternata*: a case study of strains inhabiting Chernobyl reactor No. 4. *Ecotoxicol Environ Saf* . 2000.

Murad A, Souza G, J G, Rech E. Characterisation and quantitation expression analysis of recombinant proteins in plant complex mixtures using nanoUPLC mass spectrometry. *Protocol Exchange*, p. 1-17. 2011.

Murad AM, Rech EL. NanoUPLC-MSE proteomic data assessment of soybean seeds using the Uniprot database. *BMC Biotechnol*. v. 12, p. 82. 2012.

Nielsen, K. *et al.* *Cryptococcus neoformans* {alpha} strains preferentially disseminate to the central nervous system during coinfection. *Infect. Immun.* v. 73, p. 4922–4933 2005.

Noverr, M.C., Williamson, P.R., Fajardo, R.S. & Huffnagle, G.B. CNLAC1 is required for extrapulmonary dissemination of *Cryptococcus neoformans* but not pulmonar persistence. *Infect. Immun.* v. 72, p. 1693–1699. 2004.

Nosanchuk JD, Casadevall A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cell Microbiol*. 2003.

Nosanchuk JD, Casadevall A. Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006.

Peña MMO, Lee J, Thiele DJ. A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution. *J Nutr*. v. 130, p. 1251–1260. 2000.

Pizzatti L, Panis C, Lemos G, Rocha M, Cecchini R, et al. Label-free MSE proteomic analysis of chronic myeloid leukemia bone marrow plasma: disclosing new insights from therapy resistance. *Proteomics* v. 12, p. 2618–2631. 2012.

Prentice, A.M., Ghattas, H. & Cox, S.E. Host-pathogen interactions: can micronutrientes tip the balance? *J. Nutr.* v. 137, p. 1334–1337. 2007.

Pufahl, R.A. *et al.* Metal ion chaperone function of the soluble Cu(I) receptor Atx1. *Science* v. 278, p. 853–856 .1997.

Rees EM, Lee J, Thiele DJ. Mobilization of intracellular copper stores by the *ctr2* vacuolar copper transporter. *J Biol Chem.* 2004.

Rees EM and Thiele DJ. From aging to virulence: forging connections through the study of copper homeostasis in eukaryotic microorganisms. *Curr Opin Microbiol* v. 7, p. 175-84. 2004.

Rees, E.M. and Thiele, D.J. Identification of a vacuole-associated metalloreductase and its role in *CTR2*-mediated intracellular copper mobilization. *J. Biol. Chem.* 2007.

Restrepo, A. Infections agentes and pathogenesis. Murphy J.W; Friedman, H; Bendinelli, M ed. Fungal infections and imune responses, New York, Plenum Press, cap. 10, p 251-276. 1993.

Restrepo, A. Paracoccidioidomycosis. Pp. 328–345 *In* W. E. Dismukes, P. G. Pappas, and J. D. Sobel, eds. Clinical mycology. Oxford University Press, Oxford. 2003.

Restrepo A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: A puzzle still unsolved. *Sabouraudia.* 1985.

Restrepo A. Treatment of tropical mycoses. *J Am Acad Dermatol.* 1994.

Restrepo A, Jimenez BE. Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase in a chemically defined culture medium. *J Clin Microbiol.* v. 12, p. 279–281. 1980.

Restrepo A, Salazar ME, Cano LE, Stover EP, Feldman D, Stevens DA. Estrogens inhibit myceliumto-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis . *Infect Immun.* v. 46, p. 346-53. 1984.

Restrepo A, Trujillo M, Gomes I. Inapparent lung involvement in patients with the subacute juvenile type of paracoccidioidomycosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* v. 31, p. 18-22. 1989.

- Richini-Pereira V.B., Bosco S.M., Griese J., Theodoro R.C., Macoris S.A., Silva R.J., Barrozo L., Tavares P.M., Zancopé-Oliveira R.M. & Bagagli E. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed wild animals. *Med. Mycol.* v. 46, p. 35-40. 2008.
- Rivitti EA, Aoki V. Deep fungal infections in tropical countries. *Clin Dermatol*, v. , p. 17:171–90. 1999.
- Rooney, P. J. e Klein, B. S. Linking fungal morphogenesis with virulence. *Cell Microbiol*, v. 4, p. 127-137. 2002.
- Rosas AL, Casadevall A. Melanization affects susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to heat and cold. *FEMS Microbiol Lett.* 1997.
- R. Stearman *et al.*, *Science* 271, 1552. 1996.
- San-Blas, G. & San-Blas, F. (1982). Variability of cell wall composition in *Paracoccidioides brasiliensis*: a study of two strains. *Sabowaudia*, v. 20, p. 31-40. 1982.
- Schaible, U.E. & Kaufmann, S.H. Iron and microbial infection. *Nat. Rev. Microbiol.* v. 2, p. 946–953. 2004.
- Shikanai-Yasuda MA, Telles Filho F de Q, Mendes RP, et al. Consenso em Paracoccidioidomycosis. *Ver Soc Bras Med Trop*, v. 39, p. 297–310. 2006.
- Steenbergen JN, Casadevall A. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Microbes Infect.* 2003.
- Teixeira MM, Theodoro RC, de Carvalho MJ, Fernandes L, Paes HC, Hahn RC, Mendoza L, Bagagli E, San-Blas G & Felipe MS. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol Phylogenet Evol* v. 2, p. 273–283. 2009.
- Teixeira MM, Theodoro RC, Nino-Veja G, Bagagli E, Maria SSF. *Paracoccidioides* species complex: Ecology, phylogeny, sexual reproduction, and virulence. *Plos Pathogens* v. 10. 2014.
- Tristão GB, Assunção LP, Santos LPA, Borges CL, Silva-Bailão MG, Soares CMA, Cavallaro G, Bailão AM. Predicting copper-, iron-, and zinc-binding proteins in pathogenic species of the *Paracoccidioides* genus. *Frontiers in Microbiology.* 2015.
- Van Ho A., Ward D. M., Kaplan J. Transition metal transport in yeast. *Annu. Rev. Microbiol.* v. 56, p. 237–261. 2002.

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

Walton, F.J., Idnurm, A. & Heitman, J. Novel gene functions required for melanization of the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Microbiol.* v. 57, p. 1381–1396 2005.

Wanke B, Londero AT. Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection. In: Franco MF, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G (eds) Paracoccidioidomycosis. CRC Press, Boca Raton, p.109-120. 1994.

William J. Jo, Alex Loguinov, Michelle Chang, Henri Wintz, Corey Nislow, Adam P. Arkin, Guri Giaever, Chris D. Vulpe. Identification of Genes Involved in the Toxic Response of *Saccharomyces cerevisiae* against Iron and Copper Overload by Parallel Analysis of Deletion Mutants. *Toxicological Science.* 2007.

Yufeng Song, Hongxiao Zhang, Chen Chen, Guiping Wang, Kai Zhuang, Jin Cui, Zhenguo Shen. Proteomic analysis of copper-binding proteins in excess copper-stressed rice roots by immobilized metal affinity chromatography and two-dimensional electrophoresis. *Biometals.* 2014.