



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

***Alterações metabólicas resultantes da fosforilação de Isocitrato
Liase em *Paracoccidioides lutzii****

KARLA CHRISTINA SOUSA SILVA

GOIÂNIA

2015

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
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: Karla Christina Sousa Silva

Título do trabalho: Alterações metabólicas resultantes da fosforilação de isocitrato liase em *Paracoccidioides lutzii*

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

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)²

Karla Christina Sousa Silva

Ciente e de acordo:

[Assinatura]
Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 14/01/2020

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.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² A assinatura deve ser escaneada.

KARLA CHRISTINA SOUSA SILVA

**Alterações metabólicas resultantes da fosforilação de Isocitrato
Liase em *Paracoccidioides lutzii***

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

Orientador: Prof. Dr. Sinji Borges Ferreira
Tauhata

GOIÂNIA

2015

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

Sousa Silva, Karla Christina

Alterações metabólicas resultantes da fosforilação de Isocitrato Liase
em *Paracoccidioides lutzii* [manuscrito] / Karla Christina Sousa Silva. -
2015.

XLVI, 46 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Sinji Borges Ferreira Tauhata.

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

Bibliografia. Anexos.

1. Fosforilação. 2. Ubiquitinação. 3. Isocitrato liase. 4.
Paracoccidioides lutzii. I. Borges Ferreira Tauhata, Sinji, orient. II.
Título.

CDU 577.2



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

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Nº 026

Aos oito dias do mês de abril do ano de dois mil e quinze, às nove horas, no Anfiteatro do Instituto de Ciências Biológicas II da UFG, reuniram-se os componentes da banca examinadora: **Prof. Dr. Alexandre Melo Bailão, Prof. Dr. Wesley de Almeida Brito e Prof. Dr. Sinji Borges Ferreira Tauhata** para, em sessão pública presidida pelo primeiro examinador citado, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: **"Alterações metabólicas resultantes da fosforilação de isocitrato liase em Paracoccidioides lutzii"**, em nível de mestrado, área de concentração em **Genética e Biologia Molecular**, de autoria de **Karla Christina Sousa Silva**, discente do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo presidente, que fez a apresentação formal dos membros da banca. A palavra, a seguir, foi concedida à autora da dissertação que, em cerca de 35 minutos, procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu a examinada, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da dissertação. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº 955/26 de fevereiro de 2010 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, a dissertação foi aprovada, considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Federal de Goiás. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega da versão definitiva da dissertação na secretaria do programa, com as devidas correções sugeridas pela banca examinadora, no prazo de trinta dias a contar da data da defesa. Cumpridas as formalidades de pauta, às 11 horas e 50 minutos, encerrou-se a sessão de defesa



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

e, para constar, eu, Gleizilene Braz Pereira dos Santos, Assistente em
Administração da Universidade Federal de Goiás, lavrei a presente ata que,
após lida e aprovada, será assinada pelos membros da banca examinadora em
três vias de igual teor.

Assinatura manuscrita em azul de Alexandre Melo Bailão.

Prof. Dr. Alexandre Melo Bailão

Presidente da Banca

ICB/UFG

Assinatura manuscrita em azul de Wesley de Almeida Brito.

Prof. Dr. Wesley de Almeida Brito

ICB/UFG

Assinatura manuscrita em azul de Sinji Borges Ferreira Tauhata.

Prof. Dr. Sinji Borges Ferreira Tauhata

ICB/UFG

Universidade Federal de Goiás

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluna: Karla Christina Sousa Silva

Membros:

Dr. Sinji Borges Ferreira Tauhata – Universidade Federal de Goiás

Dr. Alexandre de Melo Bailão – Universidade Federal de Goiás

Dr. Wesley de Almeida Brito – Universidade Estadual de Goiás

Dr. Guilherme Rocha Lino de Souza – Universidade Federal de Goiás

Dra. Fabrícia Paula de Faria – Universidade Federal de Goiás

Data: 08/04/2015

“Minha mente é minha arma. Meu irmão tem sua espada, Rei Robert tem seu martelo e eu tenho minha mente... e uma mente precisa de livros como uma espada precisa de uma pedra de amolar para mantê-la afiada. Por isso eu leio tanto.”

AGRADECIMENTOS

Tenho muitos a quem devo minha gratidão, tanto que tenho receio de citá-los por medo de ser injusta com alguém. Mas claro que ao menos o “básico” tentarei cobrir. Também tentarei chorar menos do quanto chorei assistindo *Frozen* ou a morte do Oberyn ou ao series finale de *Fringe*...mas acho que não vai dar rs.

Sou profundamente grata a minha família por todo apoio que recebi nesta jornada (neste caso não citarei muitos nomes para não ser eventualmente crucificada). Ao meu ver, família é composta por aquelas pessoas que te encham, incomodam, fazem raiva em você e te julgam quando você menos precisa...mas também são os primeiros a se levantarem, posicionarem e se sacrificarem se necessário quando você mais precisa. Então acho que minha família tá fazendo isso di-rei-ti-nho e merecem meu reconhecimento e dedicação por isso. Principalmente o véio Luiz e a véia Maria (meus avós) que tem sido tão compreensivos com minha ausência, vocês são os melhores do mundo e meu espelho de determinação, garra e paciência, afinal tudo tem seu tempo. Amo vocês. Não poderia esquecer também daqueles que fizeram deste caminho extenuante uma caminhada divertida ou no mínimo bizarra que acaba sendo legal no final, meus queridos LABmates, RUmates, CCmates, TIAmates, PasseiodasWatersmates, viciados em Game of Thrones...enfim, meus não colegas, meus amigos do LBM. Principalmente à Amanda que praticamente me adotou na bancada, ajudou-me não apenas dentro do laboratório, mas acalentou meu coraçãozinho em tantos momentos de crise que tive. Valeu, sua linda. Manu, você tem sorte, sua mãe é o máximo. Ao Godinho pela “parceiragem” dentro e fora do LBM, sóbrio ou nem tanto, em coisa séria ou na zoeira, com grana ou só com 5 contos mesmo hahaha. À Dila por suricatear meus dias, deixando-os suricatamente ensuricatados. Como aquele dia em que suricatóu na janela do meu carro e ficou suricantando *Chandelier* afastando todos os demais seres vivos que compartilhavam a via. Seja sempre esse suricato suricateador suricateante que você é, sua Suricata! À minha obesa favorita, a Dani. Pelos bombons ingeridos com grande pesar, mas sempre companheira mesmo que sem ingerir as calorias da refeição proposta, estava ali firme e forte conosco. Valeu, pelo apoio, gorda! Ao Noja que se não fosse por ele talvez hoje ainda estaria enchendo caixas de ponteiros da maneira errada hahaha pela companhia na bancada ou na sala de estudos, dividindo a paçoca sagrada de cada dia. Ao nosso mais novo agregado, o Kassyo. Pelo apoio, pelas moedas que não chegam (“Valar Morghulis” pro infeliz que sacaneou a gente), pelas fofocas, pelos artigos traficados pelos comunistas, pelas partidas de ping-pong depois do expediente e pela aposta da dieta que nunca concretizamos...você é lindo! Aqui farei um adendo para agradecer a ele quem foi não apenas namorado, mas amigo, *brother* e muitas vezes meu ponto de equilíbrio em momentos adversos...sou muito grata pelo seu apoio, Samuel. Obrigada. Sinto também que devo agradecer ao grupo de pesquisa formado pelo LBM que me recebeu e me deu a oportunidade de me desenvolver academicamente realizando uma das metas que eu havia estabelecido para minha vida, o mestrado e futuramente, quem sabe, o doutorado.

Dentro deste contexto, quero agradecer ao meu orientador, o Sinji que ao contrário de muitos por aí não foi apenas um orientador. Foi meu professor, orientador, amigo, troll, conselheiro e guru espiritual nestes dois anos de jornada. Obrigada, professor. Eu o tenho como uma referência a qual quero me espelhar nesta jornada acadêmica que pretendo trilhar. Claro, não posso me esquecer da minha diva, amada, idolatrada, salve salve Lu Casaletti que além de me salvar em inúmeros momentos, foi minha psicóloga e conselheira em meio ao caos que estive vivendo. Enfim, não quero exceder uma página, nem buscar mais papel higiênico pra assoar meu nariz ou acabar me desidratando na frente do PC. No final das contas, quero agradecer de forma geral a todos que ao meu lado permaneceram, farei o mesmo por vocês. Obrigada.

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	10
1.1 Histórico.....	10
1.2 Morfologia de <i>Paracoccidioides lutzii</i>	11
1.3 Paracoccidioidomicose	12
1.4 Ciclo do glioxilato	16
1.5 Fosforilação	18
2. Justificativa.....	21
3. OBJETIVOS.....	22
3.1 Objetivo geral	22
3.2 Objetivos específicos	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
4.1 Cultivo do fungo	22
4.2 Extração de proteínas.....	23
4.3 Transformação e expressão heteróloga de Isocitrato Liase	23
4.4 Purificação da Isocitrato Liase.....	24
4.5 Troca de tampão.....	25
4.6 Fosforilação in vitro de extratos proteicos.....	25
4.7 Ensaio de interações moleculares (pull down)	26
4.8 Digestão trípica	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
6. CONCLUSÕES	38
7. PERSPECTIVAS	39
8. REFERÊNCIAS	40
ANEXOS	45

RESUMO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica endêmica da América Latina causada pelas espécies englobadas no gênero *Paracoccidioides*. Esta micose atinge principalmente moradores rurais do sexo masculino em idade economicamente ativa. A PCM pode causar sequelas severas, podendo ser altamente incapacitante e esta doença figura entre uma das doenças negligenciadas por levantamentos da Organização Mundial da Saúde (OMS). Quando em um ambiente hostil, com privação de fontes de carbono (6C), os fungos tendem a utilizar estratégias alternativas para auxiliar no metabolismo energético. Uma destas estratégias é a utilização do ciclo do glioxilato que consiste em 5 etapas, sendo 3 delas comuns ao ciclo do ácido tricarboxílico e 2 exclusivas do ciclo que são catalisadas pela isocitrato liase (ICL) e malato sintase. Existem relatos na literatura que sugerem que a fosforilação de ICL seja um possível mecanismo de regulação da enzima. A fosforilação é uma modificação pós-traducional ubíqua e conhecida por modular a atividade/ação de inúmeras moléculas dos mais diversos organismos. Neste trabalho, por meio da realização de ensaios de interações moleculares (*pull down*) utilizando ICL de *Paracoccidioides lutzii* em seu estado fosforilado e não fosforilado. Encontramos evidências que sugerem o acionamento da biossíntese de purinas como uma estratégia acessória para a geração de energia no organismo. Detectamos que, aparentemente, a fosforilação serve para marcar a ICL para ser fosforilada e conseqüentemente degradada. Esta observação pode abrir um novo campo de investigação para elaboração de novos fármacos voltados para o tratamento de PCM com o emprego de inibidores de fosfatases.

Palavras chave: Fosforilação, ubiquitinação, isocitrato liase, *Paracoccidioides lutzii*

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis endemic from Latin America caused by the species encompassed in *Paracoccidioides* genus. This mycosis affects mainly economically active men, who live in rural areas. PCM may cause severe wounds to individuals and is highly incapacitating. This disease is considered a neglected disease by World Health Organization (WHO). When in a hostile environment, like deprivation of carbon sources (6C), fungi tend to use alternative strategies to assist the energetic metabolism. One strategy is using the glyoxylate cycle, which consists in 5 steps, 3 of them being common to the tricarboxylic acid cycle and the other 2 steps are catalyzed by exclusive enzymes from the glyoxylate cycle: isocitrate lyase (ICL) and malate synthase. There are reports in the literature suggesting that phosphorylation of ICL of is a possible mechanism of enzyme regulation. Phosphorylation is a post-translational ubiquitous ubiquitous and known to modulate the activity / action of many molecules of diverse organisms. In this work, through the use of molecular interactions assays (pull down) using ICL of *Paracoccidioides lutzii* in its phosphorylated state and non-phosphorylated. We found evidence, which suggest that the purine biosynthesis pathway is being used as an alternative way to produce energy to the organism and a high involvement of ICL with amino acids biosynthesis on its non-phosphorylated state. Apparently, phosphorylation works marking ICL to become degraded. This observation may open a new research field through the elaboration of new drugs for PCM treatment using phosphatase inhibitors.

Key words: Phosphorylation, ubiquitination, isocitrate lyase, *Paracoccidioides lutzii*

1. INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

As espécies do gênero *Paracoccidioides* são os agentes etiológicos da paracoccidioidomicose (PCM). Esta patologia foi relatada pela primeira vez na literatura por Wernicke e Posadas em um paciente em 1890 na Argentina. Inicialmente os médicos consideraram que o caso se tratava de uma “*psorospermiosis* infectante generalizada”, uma vez que psorospermiosis era uma denominação utilizada no século XIX equivalente a coccídeos. Todavia, alguns anos depois Adolpho Lutz ao entrar em contato com o paciente, suspeitou que não se tratava de coccídeos, pois o organismo analisado não apresentava formas de desenvolvimento típicas destes organismos. Assim, em 1908, Adolpho Lutz conclui que esta doença não havia sido previamente descrita e sugeriu que seja chamada de hifoblastose americana. Em 1912, Afonso Splendore isolou o fungo pela primeira vez e o classificou como *Zymonema brasiliensis*, esta nomenclatura permaneceu até 1930, ano em que o gênero *Paracoccidioides* foi criado (TEIXEIRA, 2008).

A literatura não dispõe da descrição da fase sexual de *Paracoccidioides spp*, entretanto já foram encontradas evidências moleculares e morfológicas que apontam para a existência do ciclo sexual no gênero (TEIXEIRA et al., 2013). A ausência desta descrição por muito tempo inviabilizou uma classificação mais exata do gênero, todavia o surgimento e consequente utilização de técnicas moleculares refinadas no estudo de caracteres conservados dos organismos, possibilitaram a realização de uma classificação coerente e precisa. Com o emprego destas técnicas, inicialmente, o gênero *Paracoccidioides spp* foi classificado na família Onygenaceae (Ordem Onygenales, Ascomycota), entretanto mais recentemente Untereiner e colaboradores (2004) sugeriram a partir de análises das subunidades de rRNA e espaçador transcrito interno, a criação de uma nova família dentro da ordem Onygenaceae. Esta nova família, denominada Ajellomycetaceae contém em sua maioria gêneros relacionados a vertebrados dentre eles o *Paracoccidioides*. Os fungos do gênero *Paracoccidioides* eram englobados todos em apenas uma espécie, *Paracoccidioides brasiliensis*, atualmente são referidos como fungos do Complexo *Paracoccidioides* devido ao alto nível de variabilidade genética observada nos membros do grupo (MARQUES, 2013). Estudos conduzidos por Matute e colaboradores (2006) utilizando 65 isolados do gênero *Paracoccidioides* representando seis áreas endêmicas da PCM indicaram a existência de 3 espécies filogenéticas (S1, PS2

e PS3). CARRERO e colaboradores também realizaram análises filogenéticas em 21 isolados de *P. brasiliensis*, observaram que todos os isolados se agruparam nos três grupos filogenéticos descritos anteriormente, exceto o isolado Pb01. Estes estudos resultaram na diferenciação do gênero em duas espécies, *P. brasiliensis*, o qual representa um complexo de 3 espécies filogenéticas e *P. lutzii*, o qual inclui o isolado Pb01, o qual recebeu o nome de *Paracoccidioides lutzii* em homenagem a Adolpho Lutz, por ter sido o primeiro a descrever detalhadamente a doença em 1908 (TEIXEIRA et al., 2009)

1.2 Morfologia de *Paracoccidioides lutzii*

As colônias leveduriformes de *P. lutzii* apresentam coloração creme, enrugadas, sendo geralmente ovaladas ou alongadas, macroscopicamente. Microscopicamente, apresenta múltiplos brotamentos periféricos a célula mãe, como uma roda-de-leme o que é uma característica é utilizada em diagnósticos histopatológicos. A fase miceliana caracteriza-se por produzir colônias brancas, pequenas e irregulares cobertas por um micélio aéreo. Alguns isolados podem apresentar pigmentação marrom, hifa delgada e septada, sendo possível de observar apenas o clamidosporo (**Figura 1**). Em situações de estresse nutricional, o micélio origina vários tipos de propágulos como artroconídios ou conídios de célula-única (BUSTAMANTE-SIMON et al., 1985). Quando propágulos infecciosos (fragmentos de hifas ou conídios) são inalados, estes são depositados nos pulmões e se diferenciam em leveduras devido a alteração da temperatura (36-37°C), estabelecendo assim a doença (BOCCA et al., 2013). A transição entre as fases de micélio e levedura é reprodutível em laboratório.

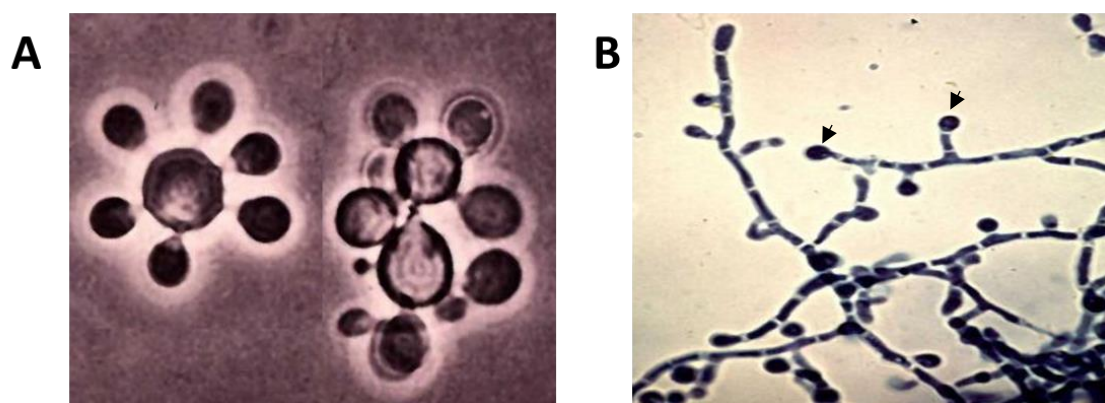


Figura 1. Morfologia apresentada por *Paracoccidioides*. A- Fase leveduriforme apresentando múltiplos brotamentos periféricos à célula-mãe; B- Fase miceliana apresentando hifas delgadas e septadas, com clamidiosporos.

1.3 Paracoccidioidomicose

A PCM é uma doença autóctone que abrange desde o sul do México até o norte da Argentina, sendo mais prevalente no Brasil, Colômbia, Venezuela e Argentina e está classicamente associada com indivíduos da área rural. Apesar de abrangente, a distribuição é heterogênea, havendo áreas de alta e baixa endemicidade (**Figura 2**). Existem relatos fora da área de ocorrência, entretanto, em todos os casos o paciente esteve em algum momento nas regiões endêmicas do fungo (CHIKAMORI et al., 1984; HORRÉ et al., 2002; LINARES; BAKER; LINARES, 1971; MARQUES, 2012; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; VAN DAMME et al., 2006). Todavia, nos últimos anos a doença tem se alastrado; casos positivos para a doença tem sido relatados em indivíduos que não estiveram em áreas rurais (CARNEIRO et al., 2006). A PCM não possui métrica DALY (Disability-Adjusted Life Year: incapacidade-recuperação vida ano) que representa a quantificação de carga da doença a partir de mortalidade e morbidade e tem sido apontada como uma das doenças negligenciadas da América Latina (HOTEZ et al., 2008; MARTINEZ, 2010). Aproximadamente 80% dos casos de PCM na América Latina ocorreram no Brasil, sendo São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás, Rio de Janeiro e Rondônia os estados com maior incidência. Esta doença é mais prevalente em trabalhadores rurais, mais comumente em homens de 30-60 anos de idade.

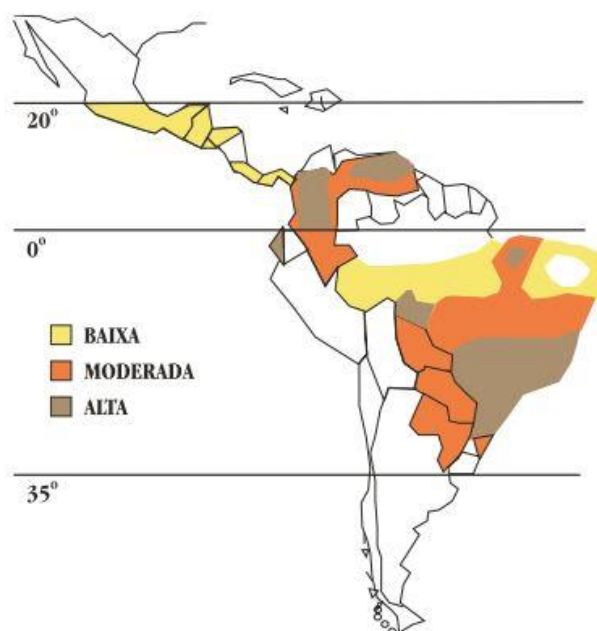


Figura 2. Mapa de distribuição da Paracoccidioidomicose na América Latina. Retirado de SHIKANAI-YASUDA et al., 2006.

O risco de desenvolver a doença varia de acordo com os hábitos do indivíduo infectado, como por exemplo, em indivíduos fumantes o risco aumenta em 14 vezes e em indivíduos que consomem pelo menos 50g de álcool por dia, a probabilidade de desenvolver PCM aumente em 3,6 vezes (COLOMBO et al., 2011). Esta micose não é prevalente em pacientes com AIDS. Todavia, nos relatos de pacientes com AIDS que contraíram alguma micose sistêmica, a PCM foi a que mais ocasionou mortes, 51,2% dos pacientes (PRADO et al., 2009). As formas de manifestação da doença apresentam diferentes graus: aguda ou subaguda, geralmente em pacientes jovens com tropismo voltado para órgãos relacionados sistema mononuclear fagocitário, como os linfonodos. A forma crônica, comum em indivíduos adultos do sexo masculino, podendo ser unifocal, atingindo um órgão apenas (geralmente os pulmões) ou multifocal quando há o comprometimento de mais de um órgão, geralmente pulmões e mucosa oral. Esta micose também pode deixar sequelas, como doenças pulmonar obstrutiva, disfonia e lesões na laringe (MARQUES, 2012), mostrados na **figura 3**. Embora, estas sejam as formas mais comuns de manifestação da PCM, existem relatos na literatura de casos de PCM afetando até mesmo o sistema nervoso central (PEDROSO; VILELA, 2009).

Nos primeiros casos relatados, a PCM, então histoblastose americana, os pacientes recebiam o mesmo tratamento administrado a pacientes acometidos por sífilis que consistia em injeções mercuriais, raios-X e iodeto de sódio. Em casos mais leves o tratamento mostrava relativa eficiência, entretanto em casos graves não parecia surtir efeito algum (LUTZ, 1945). Atualmente a PCM é tratável e a maioria dos fármacos disponíveis apresentam eficácia considerável, entretanto estes fármacos necessitam de ser administradas por um longo período para surtir o efeito desejado e também podem causar efeitos colaterais. O primeiro fármaco disponibilizada para tratar a doença foi a sulfonamida. Este fármaco apresenta boa tolerabilidade, contudo demora de 3-5 anos para surtir o efeito desejado ao paciente, apresenta baixa taxa de cura e alto índice de reincidência. O tratamento baseado em itraconazol dura de 6-12 meses, taxa de cura de cerca de 90% dos pacientes e o índice de reincidência é de 0-15% dependendo de comorbidades como má nutrição e AIDS nos pacientes tratados. Cetoconazol apresenta um período de tratamento de 6-12 meses, mesma eficácia de itraconazol, todavia causa muitos efeitos colaterais nos pacientes, principalmente em tratamentos a longo prazo. A anfotericina B é utilizada em tratamentos de quadros mais severos de PCM, mas devido seu grande potencial nefrotóxico, este fármaco é proibida de ser empregada nos

tratamentos em vários países, exceto no Brasil (AMEEN; TALHARI; TALHARI, 2010; DERAY, 2002; SHIKANAI-YASUDA; BERNARD; HIGAKI, 2002).

Surge então a preocupação em buscar novas abordagens para o tratamento de paracoccidiodomicose. São interessantes alternativas que sejam mais eficientes, de modo a não expor o paciente a fármacos por um prazo prolongado, evitando efeitos colaterais decorrentes do tratamento. A ICL é uma excelente opção para estudos, pelo fato de ser ausente em mamíferos, podendo ser alvo de terapia direcionada, seja ela uma nova alternativa ou complementar aos tratamentos existentes.

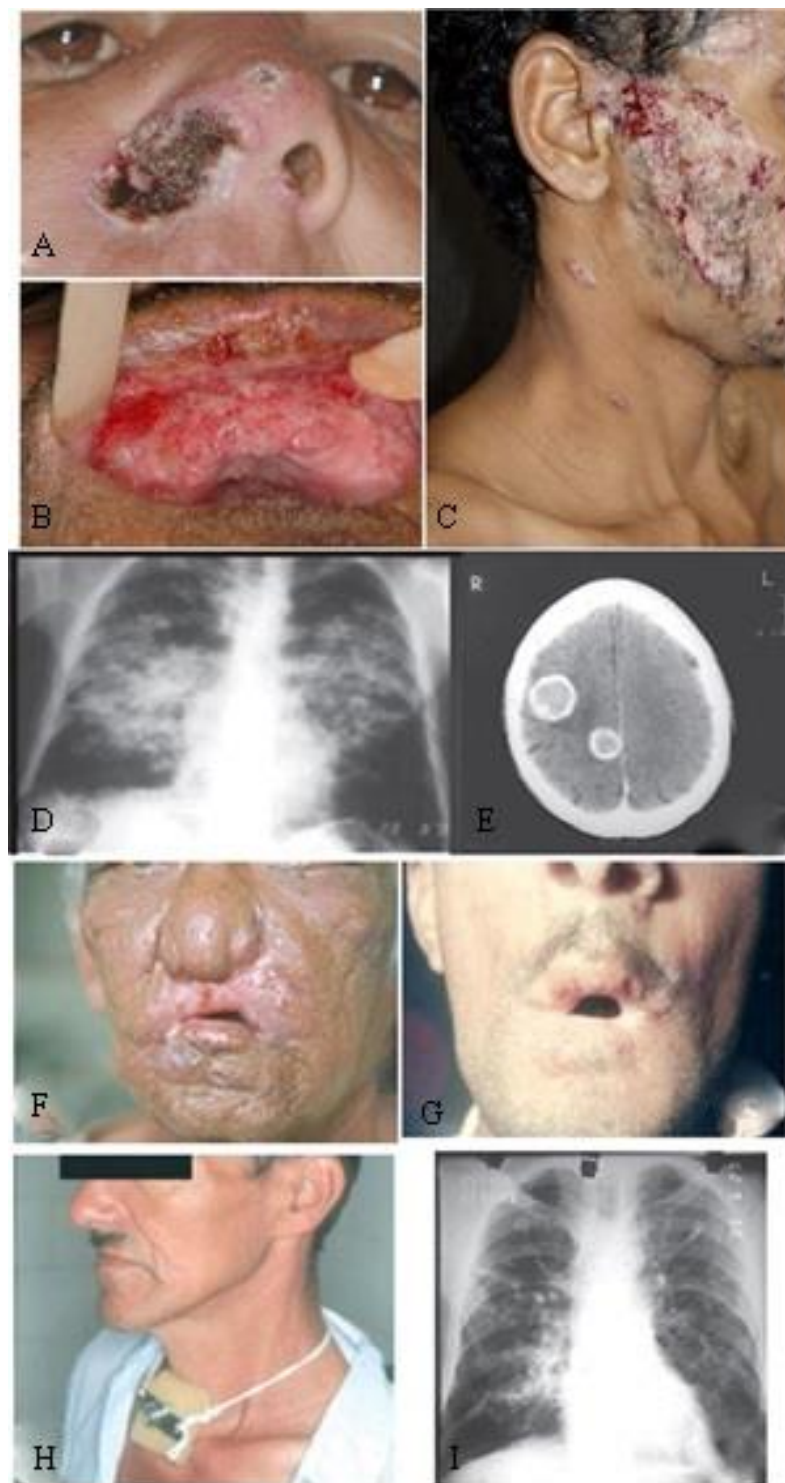


Figura 3. Lesões causadas pela PCM. A) úlcera necrótica com infiltração na borda; B) lesão ulcerativa e infiltrativa com múltiplos pontos de hemorragia e crostas na gengiva superior e lábio; C) Extensa lesão ulcerativa na face com infiltrações na borda e pontos de hemorragia. Este paciente ainda apresenta adenopatia inflamatória e lesões nodulares na região cervical (não mostrado na imagem); D) Radiografia convencional mostrando o padrão típico de dispersão do fungo nos pulmões; E) Radiografia de paciente acometido pela PCM no sistema nervoso central; F e G) Sequelas decorrentes de PCM, são mostrados casos de microstomia resultantes de lesões peri-orais; H) Traqueostomia realizada devido a estenose da traqueia; I) Fibrose pulmonar. (MARQUES, 2012; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006)

1.4 Ciclo do glioxilato

Em condições normais *Paracoccidioides spp* são capazes de usar fontes convencionais de carboidratos em seu metabolismo, inclusive amido, armazenar glicogênio e trealose. Estas moléculas são importantes reservas energéticas, relevantes para a adaptação metabólica e proteção contra estresse e mecanismos de infecção. *Paracoccidioides spp* convertem glicose-6-fosfato ou frutose-6-fosfato pela via glicolítica. Sob condições aeróbicas, o piruvato é oxidado a CO₂ através da via do ácido tricarboxílico. Tanto em micélio como em levedura, o fungo apresenta tanto a via glicolítica como a gliconeogênese. As vias clássicas de biossíntese e degradação de lipídeos, incluindo vias relacionadas a corpos cetônicos e produção de esteróides estão aparentemente completas no organismo. Por meio de análises transcriptômicas foi constatado que o fungo é capaz de realizar 78 reações enzimáticas relacionadas a via, cobrindo 76% do metabolismo de ácidos graxos. *Paracoccidioides spp* são capazes de sintetizar todos os aminoácidos, exceto asparagina. A síntese de purinas e pirimidinas ocorre com na maioria dos organismos, iniciada com aminoácidos, ribose-5-fosfato, CO₂ e NH₃. Análises transcriptômicas detectaram a presença de sete das 15 enzimas conhecidas envolvidas na síntese *de novo* de purinas. Apesar de não conter todas as enzimas, as que foram identificadas estão relacionadas a regulação da síntese de purinas no organismo (ARRAES et al., 2005).

Uma das estratégias metabólicas que o fungo recorre para prolongar sua permanência no organismo hospedeiro é pelo do acionamento do ciclo do glioxilato. O ciclo do glioxilato é uma via anaplerótica que consiste em 5 reações, sendo 3 delas presentes no ciclo do ácido tricarboxílico e as outras 2 são catalisadas por enzimas exclusivas do ciclo, isocitrato liase e malato sintase. Por meio deste ciclo, organismos são capazes de produzir succinato e outros intermediários de 4 carbonos do ciclo do ácido tricarboxílico utilizando o acetato (2 carbonos) como fonte primária de carbonos. A cada volta do ciclo são consumidas duas moléculas de acetil CoA e produzida uma molécula de succinato. Este succinato pode ser convertido a fumarato, malato e oxaloacetato, este último poderá ser convertido a fosfoenolpiruvato pela fosfoenolpiruvato carboxicinase (PEP-carboxicinase) e consequentemente poderá dar início a gliconeogênese (**figura 4**) (NELSON; COX, 2014). Desta forma, o ciclo do glioxilato pode ser utilizado como uma via alternativa de obtenção de energia para o organismo. Em bactérias, como é o caso de

Mycobacterium tuberculosis, a isocitrato liase é considerada um fator de resistência do organismo. Uma vez deletado o gene para ICL, foi observado que a resistência e virulência de *M. tuberculosis* em indivíduos imunocompetentes foram atenuados sem afetar o crescimento bacteriano durante a fase aguda da infecção (MCKINNEY et al., 2000). Existem evidências de que este ciclo também seja relevante para a virulência fúngica em organismos hospedeiros. Quando submetidos a mutação deletéria do gene de *icl*, *Candida albicans* teve sua virulência consideravelmente reduzida (LORENZ; FINK, 2001). Estudos em *Paracoccidioides brasiliensis* revelaram que quando submetido ao microambiente interno de macrófagos, é induzida a expressão de genes do ciclo do glioxilato e de vias afins, como da gliconeogênese (DERENGOWSKI et al., 2008). As enzimas chave do ciclo do glioxilato possuem suas respectivas atividades reguladas por eventos de fosforilação (CRUZ et al., 2011; DA SILVA NETO et al., 2009), fazendo delas excelentes alvos de estudos para elaborar novas abordagens de tratamentos que sejam mais eficientes e menos prejudiciais aos pacientes.

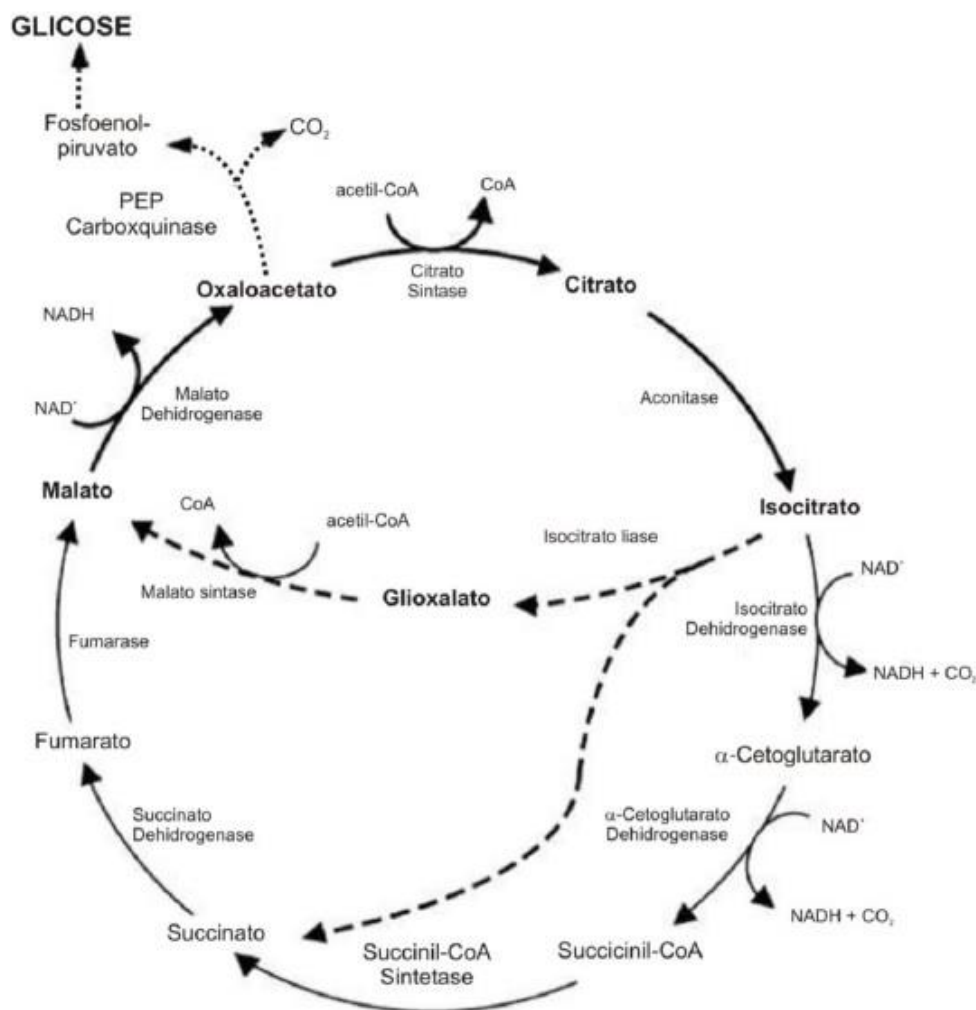


Figura 4. Ciclo do glioxilato. As linhas cheias indicam o ciclo do ácido tribarboxílico. As linhas tracejadas mostram o desvio realizado pelo ciclo do glioxilato (LORENZ; FINK, 2002).

1.5 Fosforilação

A fosforilação é um mecanismo ubíquo de regulação presente em organismos superiores e inferiores, atuando em resposta a sinais extracelulares, promove mecanismos de ativação e inativação de vários processos, como vias metabólicas, cascatas de ativação, transporte de membrana, transcrição de genes, ativação de proteínas motoras, apoptose e diferenciação celular (JOHNSON; LEWIS, 2001; MANNING et al., 2002). Os primeiros indícios de fosforilação foram descritos para a enzima glicogênio fosforilase b (GPb) no fenômeno de conversão para sua forma ativada, glicogênio fosforilase a (GPa). Neste estudo, foi constatada uma maior eficiência na conversão de GPb a GPa quando havia a adição de ATPs no extrato utilizado, sugerindo a ocorrência de uma fosforilação

direta da GPb (FISCHER; KREBS, 1955). Anos mais tarde com a purificação da PKA (proteína quinase dependente de cAMP) percebeu-se que a fosforilação era um fenômeno muito mais comum e atuante no ambiente celular do que se imaginava (WALSH; PERKINS; KREBS, 1968). No século XXI, após o sequenciamento do genoma humano e surgimento das “ômicas” (genômica, proteômica), surgiu também os estudos do quinoma (*kinome*) que foca seus esforços em identificar as proteínas quinases codificadas pelo genoma. São apontados na literatura 518 proteínas quinase, cerca de um terço das proteínas codificadas pelo genoma humano, sem levar em consideração as proteínas resultantes de *splicing* alternativo (MANNING et al., 2002)

A fosforilação é uma modificação pós-traducional reversível que consiste na adição de um radical fosfato à estrutura da molécula alvo. Este tipo de reação é catalisado pelas enzimas quinases e o processo inverso, a defosforilação, pelas enzimas fosfatases. O ATP é o doador de fosfatos em essencialmente todas as reações de proteínas quinases (o GTP substitui o ATP em algumas reações), sendo o grupamento fosfato terminal (γ - PO_3^{2-}) transferido para resíduos específicos de aminoácidos. A introdução de um diânion fosfato tetraédrico a uma ou mais cadeias laterais de uma proteína cria oportunidade para pareamento local de cargas e pontes de hidrogênio que podem resultar em uma reorganização dramática no microambiente local da proteína que conduzem a um rearranjo conformacional, como demonstrado na **figura 5** (WALSH, 2006). Classicamente, os aminoácidos passíveis de fosforilação mais enfatizados são tirosina, treonina e serina, todos apresentam hidroxila em sua cadeia lateral (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2008). A frequência de fosforilação entre estes aminoácidos varia, em humanos o aminoácido mais fosforilado é a serina (86,4%, aproximadamente) e a tirosina a menos fosforilada (1,8%, aproximadamente) (OLSEN et al., 2006). Entretanto, histidina, lisina, arginina, ácido aspártico, ácido glutâmico e cisteína também podem ser fosforilados a fim de desempenhar funções diversas que vão desde a fosforilação de histonas auxiliando no controle do ciclo celular, participações em certas patologias humanas tais como processos inflamatórios e câncer até a sinalização molecular de procariotos e eucariotos inferiores e auxiliar no controle do ciclo circadiano (BALHORN et al., 1975; KEE; MUIR, 2012; PUTTICK; BAKER; DELBAERE, 2008). As proteínas quinase eucarióticas (EPKs) são constituídas por dois lobos (C-terminal e N-terminal, sendo este onde se localiza o sítio de ligação do ATP) que formam uma fenda entre si. Esta fenda será o local onde o ATP se posicionará deixando o grupamento γ - PO_3^{2-} exposto de modo que possibilite a troca de fosfato com a molécula alvo. A abertura

elas a fosforilação. Devido a sua ampla atuação na ativação e inativação de moléculas, a fosforilação é geralmente vista com um interruptor molecular. Para que a fosforilação e a defosforilação de enzimas desempenhem função regulatória, estes processos também devem ser regulados. As proteínas quinases são geralmente reguladas por mensageiros ou efetores específicos como proteínas quinases dependentes de cAMP, cGMP, cálcio e RNA dupla fita. As fosfoproteínas fosfatases são reguladas pela interação proteína-proteína e em casos de proteínas com múltiplos sítios de fosforilação, é possível que a fosforilação de um sítio regule a defosforilação de outro (KREBS; BEAVO, 1979). Há ocasiões nas quais a fosforilação pode levar a diminuição da afinidade de uma molécula pelo seu respectivo substrato, levando-a a interagir com outros substratos e consequentemente resultando em um efeito diferente do esperado inicialmente. Esta mudança de parceiros de ligação é essencial em eventos de diferenciação celular e regulação de eventos celulares.

2. Justificativa

A fosforilação é um mecanismo rápido, reversível e que comprovadamente atua como ditador da função da proteína na célula (MYERS, 2009; SASIKUMAR; PEREZ; KINZY, 2013). Assim, ICL pode ser alvos de fosforilações que modularia a atividade enzimática ou estaria ditando sua função celular, uma vez que bactérias e fungos como *Paracoccidioides* apresentam um grande número de proteínas quinases integrantes de várias vias de sinalização celular (COSTA et al., 2007; FERNANDES et al., 2005; HOWELL; LEW, 2012).

Ao investigar o impacto da fosforilação sobre ICL, enzima do metabolismo energético de *Paracoccidioides lutzii*, este estudo tem um grande potencial para se determinar os mecanismos de regulação da enzima. Assim, poderemos ter um entendimento global da função desta enzimas e proteínas acessórias. Com isso será possível detectar possíveis alvos moleculares e desenhar estratégias para o desenvolvimento de novas metodologias e menos impactantes e mais modernas para o tratamento de pacientes com PCM. Como a função conhecida dessas proteínas são conservadas em várias espécies de microrganismos, também é possível estender os conhecimentos obtidos para outras micoses sistêmicas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Tendo em vista a importância do ciclo do glioxilato em fungos patogênicos e a relevância da fosforilação na regulação de vias metabólicas, o presente trabalho teve por objetivo investigar o impacto da fosforilação sobre uma das enzimas chave do ciclo do glioxilato: isocitrato liase. A partir deste conhecimento pretendemos traçar as possíveis redes de interações desta enzima e possíveis papéis desempenhados por ela em seus diferentes estados de fosforilação.

3.2 Objetivos específicos

- Extração de proteínas citoplasmáticas da fase leveduriformes de *Paracoccidioides lutzii*;
- Realização e padronização de ensaios de fosforilação de isocitrato liase proveniente de expressão heteróloga;
- Realização de ensaios de interações moleculares (*pull down*);
- Identificação das proteínas obtidas dos ensaios na presença e ausência de ATP por meio da técnica de UPLC-MS^E;
- Realização análises *in silico* a fim de caracterizar as proteínas identificadas nas análises;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cultivo do fungo

O fungo *Paracoccidioides lutzii* (Pb01) foi cultivado em meio Fava Netto (1% p/v peptona, 0.5% p/v extrato de levedura, 0.3% p/v proteose peptona, 0.5% p/v extrato de carne, 0.5% p/v NaCl, 4% v/v glicose, 1% p/v ágar; pH 7,2) com a adição de 1:1000 de gentamicina. Os fungos foram mantidos em estufa a 37°C. Para a realização do inóculo foram adicionadas duas alças do fungo em 200 ml de meio Fava Netto líquido. Durante a

incubação, os inóculos foram mantidos sob agitação a 37°C por 72h. Os repiques de manutenção das linhagens foram realizados semanalmente.

4.2 Extração de proteínas

Após o período de 72h, as células foram transferidas para tubos cônicos de 50ml e centrifugadas por 10 minutos a 3000 rpm a 4°C. Após descartar o meio de cultura, as células foram submetidas a duas lavagens com tampão fosfato-salino 1x (PBS 1x). Terminada a etapa de lavagens, o precipitado foi ressuspensionado com 5ml de solução de bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3) a 50mM pH 8,0 e distribuído em tubos de extração com capacidade máxima de 2 ml com pérolas de vidro (*glass beads*). Os tubos foram então colocados no *bead beater* e realizados 5 ciclos de 30 segundos, mantendo os tubos no gelo entre o ciclo e outro. O sobrenadante foi transferido para microtubos de 1,5ml limpos e centrifugados por 15 minutos a 14000 rpm a 4°C. Esta etapa foi repetida até que não houvesse mais a formação de precipitado no fundo dos tubos. Para o armazenamento, as proteínas extraídas foram mantidas em gelo a 4°C por no máximo duas semanas a fim de mantê-las com menor nível possível de alterações estruturais e funcionais. Os passos realizados para a obtenção de materiais para os experimentos estão esquematizados na **figura 5**.

4.3 Transformação e expressão heteróloga de Isocitrato Liase

O cDNA de *Pbicl* utilizado para expressão heteróloga é derivado da biblioteca de cDNA proveniente da transição de micélio para levedura (BASTOS et al., 2007). O inserto foi clonado em um plasmídeo pET-32a(+) entre os sítios de restrição BamHI e XhoI, contendo *his-tag* em sua sequência. Células de *Escherichia coli* da linhagem BL-21 utilizadas para a expressão heterólogas foram transformadas por meio de eletroporação com o plasmídeo contendo *PbICL*. Para a indução de *E. coli* (BL-21, Novagen) inicialmente, foi feito um pré-inóculo por meio da raspagem de uma colônia isolada de placas contendo as bactérias previamente transformadas. Esta colônia isolada foi adicionada a 10 ml de meio LB líquido com 4% glicose e 1:1000 de ampicilina. O pré inóculo foi mantido a 37°C *overnight* sob agitação. Posteriormente, foi feito o inóculo propriamente dito mantendo as mesmas proporções do pré-inóculo em um volume de 300 ml, sendo adicionado neste caso 3 ml do pré-inóculo. Após a adição do pré-inóculo, o

meio de cultura foi deixado a 37°C sob agitação até atingir $DO_{600} = 0,4 - 0,6$. Quando a densidade óptica estivesse compreendida nesta faixa foi adicionado ao inóculo o isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) a concentração final de 1mM. Depois da adição de IPTG, o inóculo foi novamente submetido à agitação a 37°C por 120 minutos. Em seguida as células foram centrifugadas a 3000m rpm por 10 minutos e o precipitado ressuspensionado em PBS 1x. Posteriormente o PBS 1x foi substituído por 1ml de tampão de bicarbonato de amônio 50mM e transferido para microtubos de 1,5ml e armazenados a -20°C. Antes da extração de proteínas heterólogas, o material obtido das induções era transferido a tubos de vidro e incubado com lisozima (12 μ l de lisozima para cada 1ml de extrato celular) por 30 minutos do gelo sob agitação. Ao término da incubação foram realizados 5 ciclos de sonicação, sendo que entre um ciclo e outro as células eram levadas ao vórtex a fim de melhor homogeneizar o extrato. Terminado o quinto ciclo as amostras eram passadas duas vezes em uma seringa de 5ml para otimizar a lise celular e transferidas para tubos de extração de proteínas na presença de *glass beads*. Foram realizados dois ciclos de 30 segundos de homogeneização e posteriormente o extrato foi transferido para microtubos de 1,5ml. As amostras então foram centrifugadas a 14000rpm por 15 minutos a 4°C, este processo era repetido até que não houvesse mais a formação de precipitado. As proteínas foram mantidas por no máximo 48h no gelo a 4°C até o processo de purificação (**figura 7**).

4.4 Purificação da Isocitrato Liase

A resina Ni-NTA His-Bind[®] (Novagen) foi empregada em todos os processos de purificação realizados. Este ensaio cromatográfico foi desenvolvido com o auxílio colunas cromatográficas Poly-Prep Bio-Rad (0,8 x 4 cm, 10 ml) por método gravitacional.

A quantidade de resina empregada por ensaio de purificação foi calculada de acordo com a capacidade da resina especificada pelo fabricante (5-10 mg de proteína por 1ml de resina). Os tampões de purificação utilizados consistiam em:

- Solução de purificação 5x: NaH_2PO_4 250 mM pH 8,0; NaCl 2,5 M e H_2O , ajustar para pH 8,0);
- Imidazol 3 M: 3 M imidazol; NaCl 500 mM; tampão sódio fosfato 20 mM pH 6,0; ajustar para pH 6,0.

A composição dos tampões consistia em:

- Tampão de ligação 10 mM (30 ml de solução de purificação 1x; 100 µl imidazol 3M em pH 6,0; ajustar para pH 8,0),
- Tampão de lavagem 20 mM (50 ml de solução de purificação 1x; 335 µl imidazol 3 M pH em 6,0; ajustar para pH 8,0)
- Tampão de eluição 250 mM (13,75 ml de solução de purificação 1x; 1,25 ml imidazol 3 M em pH 6,0; ajustar para pH 8,0).

Os volumes usados dos tampões de purificação eram calculados obedecendo a seguinte proporção em relação a quantidade de resina (resina = 1x): tampão de ligação 10 mM (5x), tampão de lavagem 20 mM (5x) e tampão de eluição 250 mM (3x). As eluições foram coletadas em frações de 500 µl para viabilizar o processo de enriquecimento das eluições totais obtidas.

4.5 Troca de tampão

A troca de tampão foi realizada com o auxílio de colunas PD MidiTrap G-10 (GE Healthcare Life Sciences). Seguindo as instruções cedidas pelo fabricante, a coluna foi equilibrada com 16ml tampão de interesse (NH_4HCO_3 ou tampão de ligação), posteriormente adicionava-se o volume máximo de 1ml amostra e completava-se até o volume final de 1,7ml e o *flow-through* era dispensado. Para a eluição, foi adicionado 1,2ml de tampão (mesmo tampão utilizado no início do protocolo) e coletada a fração proteica liberada. Esta troca de tampão é realizada, pois quando as amostras são eluídas da resina, elas estão em um tampão com alta concentração de imidazol e esta característica pode prejudicar os passos posteriores à purificação e *pull down*.

4.6 Fosforilação *in vitro* de extratos proteicos

A fosforilação *in vitro* de ICL foi realizada por meio da exposição da enzima ao extrato proteico citoplasmático do fungo na presença do tampão de quinase (50 mM Tris-HCl (pH 7,4); 50 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 ; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 2 mM ATP não radioativo) utilizar estas proporções de reagentes descritas para 10-50µg de proteínas no lisado celular. Após a adição de todos os elementos, a reação deve ocorrer por 30 minutos em temperatura ambiente. Para interromper a reação utiliza-se tampão de amostra para SDS-PAGE em concentração 3x. Nos ensaios de *pull down* não houve a interrupção da

reação, este processo foi realizado para as frações que foram aplicadas no gel de poliacrilamida.

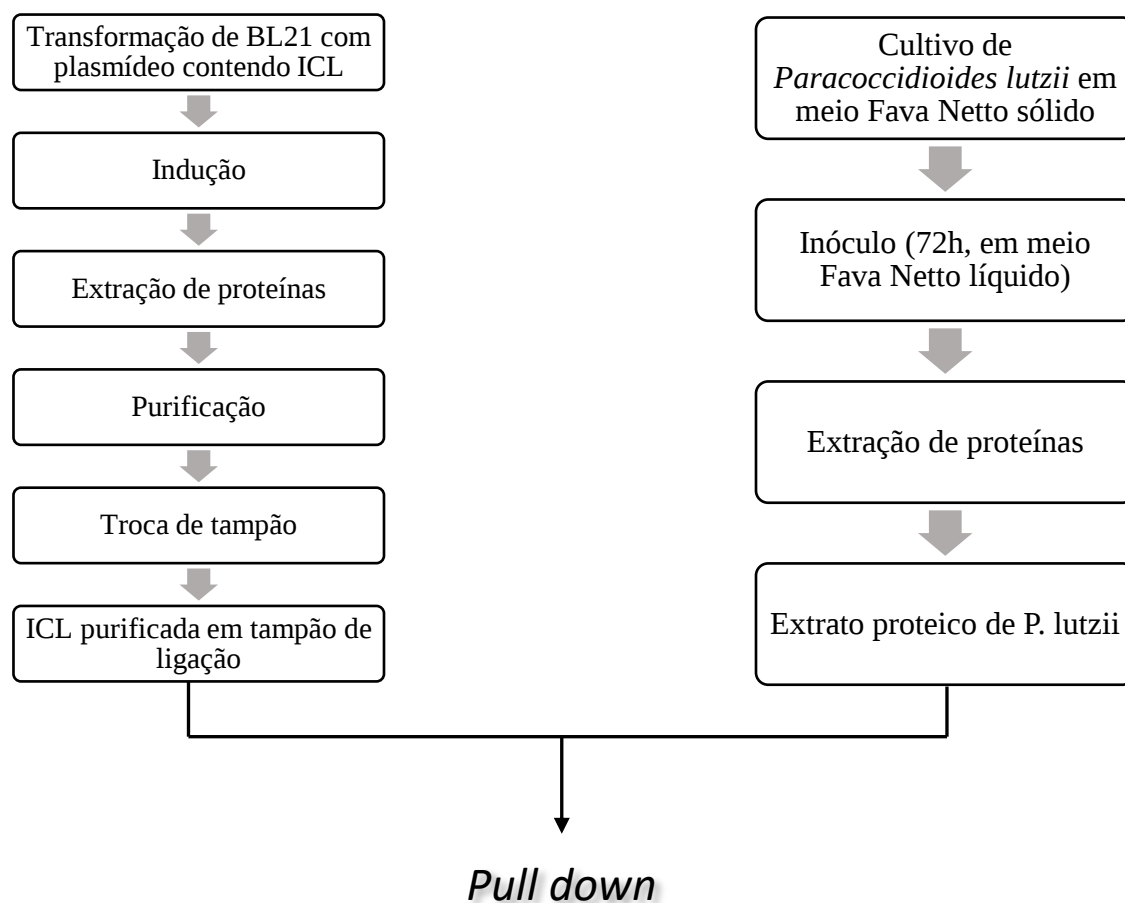


Figura 7. Esquema representativo da metodologia utilizada. São mostrados os passos experimentais realizados desde a extração proteica até a realização do *pull down*.

4.7 Ensaio de interações moleculares (*pull down*)

O *pull down* foi realizado com auxílio de microtubos de 2ml de capacidade, colunas cromatográficas e 1,5 ml de resina Ni-NTA His-Bind[®] Resin (Novagen). Foram realizados seis ensaios de *pull down* nas seguintes condições: extrato bruto de proteínas citoplasmáticas de *P. lutzii* na presença do tampão de lavagem (controle); ICL não fosforilada + extrato bruto de proteínas citoplasmáticas de *P. lutzii* e ICL fosforilada + extrato bruto de *P. lutzii*. Para o *pull down* a ICL foi incubada por 1h apenas com a resina e posteriormente, com a adição do extrato proteico de *P. lutzii*, foi realizada uma nova

incubação com a duração de 2h. Depois deste período, seguiram as etapas padrões de purificação de proteínas, lavagem e eluição (**Figura 8**).

4.8 Digestão tríptica

A digestão tríptica das eluições obtidas foram realizadas obedecendo o protocolo de digestão e preparação de amostra para LC-MS^E, usando sistema 2D nanoACQUITY. Foram digeridos 60µg de proteínas provenientes das eluições de cada *pull down*. Para cada digestão foram feitos os seguintes passos: as amostras foram colocadas em tubos de 1,5ml; foram adicionados 10µl de NH₄HCO₃ pH 8,5 à amostra; 30µl de solução 0,2% de Rapigest SF e levadas ao vórtex e posteriormente ao termobloco em um período de incubação de 15 minutos a 80°C. As amostras foram retiradas do termobloco, centrifugadas e adicionados 2,5µl de DTT 100mM e levadas ao vórtex. Posteriormente as amostras foram levadas novamente ao termobloco a temperatura de 60°C por 30 minutos. Depois do período determinado as amostras resfriaram a temperatura ambiente e então centrifugadas. Adicionou-se 2,5µl de iodoacetamida 300mM às amostras e foram então levadas ao vórtex. As amostras foram deixadas repousar por 30 minutos ao abrigo da luz. Posteriormente, foram adicionados 12µl de tripsina (Promega), então as amostras foram levadas ao vórtex e depois colocadas no termobloco em um período de incubação de 16h a 37°C. Terminada a digestão, foram adicionados à amostra 10µl de ácido trifluoracético (TFA) e levada ao vórtex a à incubação a 37°C por 90 minutos. Então, as proteínas foram centrifugadas por 30 minutos a 14000 rpm, retirado o sobrenadante e colocado em um tubo limpo e levado para secar no *speed vacuum*.

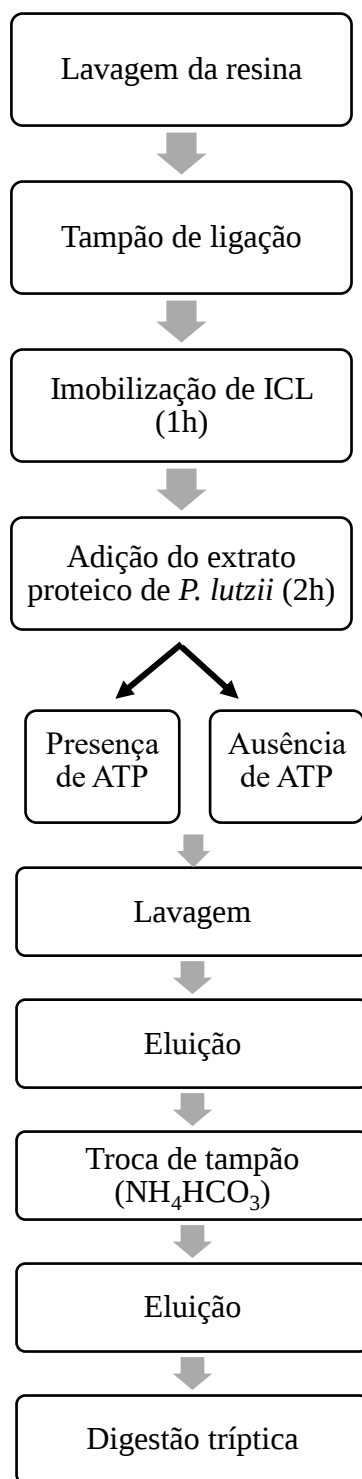


Figura 8. Passos experimentais realizados no procedimento de *pull down*.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na discussão, consideraremos apenas as proteínas metabólicas exclusivas de cada tratamento. Os dados gerados pelas análises de espectrometria de massas foram confrontados com o banco de dados do Uniprot (<http://www.uniprot.org/>) e Pedant (<http://pedant.gsf.de>) a fim de confirmar as identificações obtidas, eliminar a possibilidade de proteínas hipotéticas e delimitar as funções das proteínas encontradas. A partir das análises foi obtido o total de 79 proteínas, sendo 30 delas exclusivas do tratamento sem ATP, 5 exclusivas do tratamento com ATP e 44 comuns a ambos tratamentos (**Figura 9 e 10**). As proteínas identificadas encontram-se na **tabela 2**.

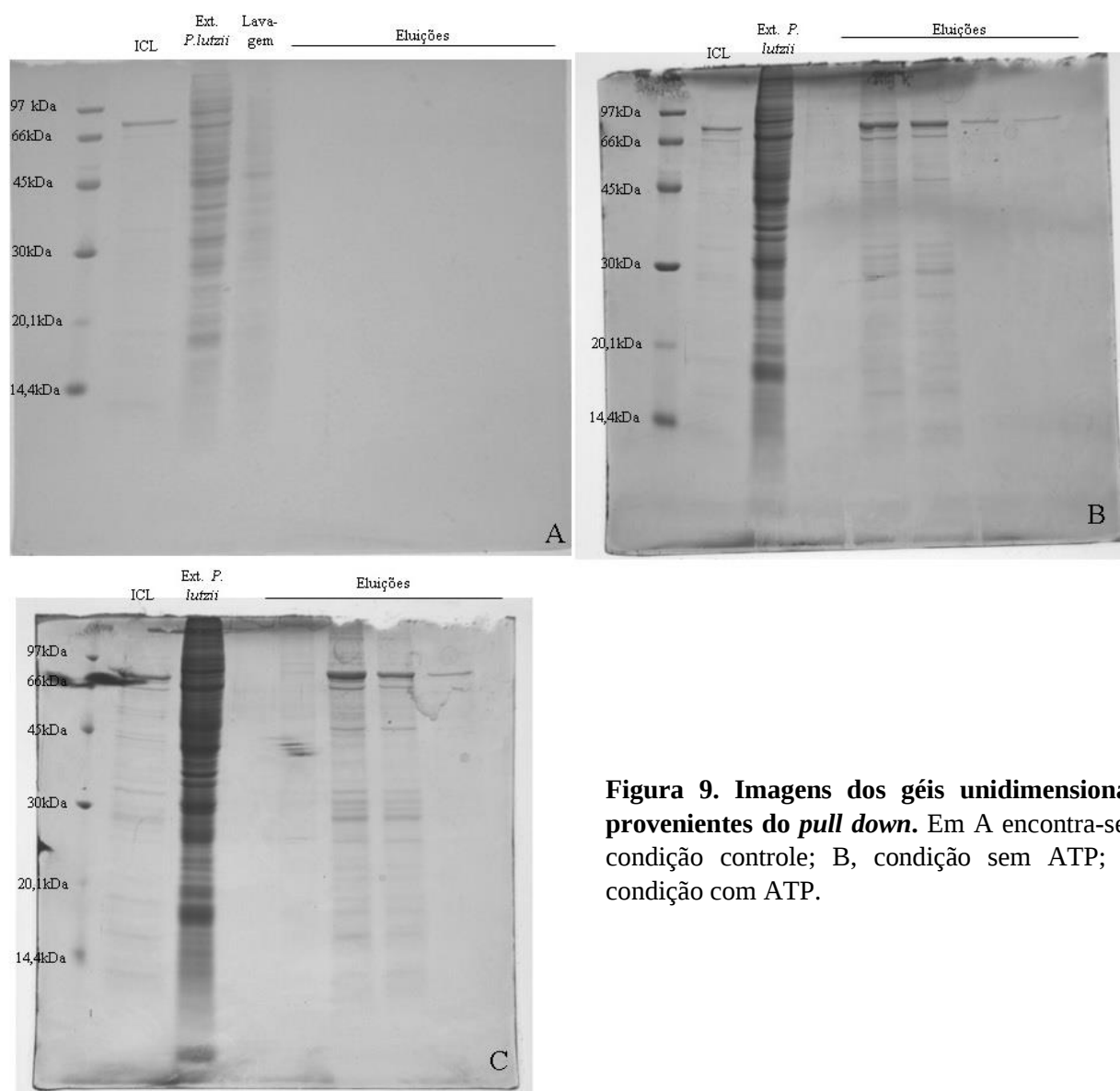


Figura 9. Imagens dos géis unidimensionais provenientes do pull down. Em A encontra-se a condição controle; B, condição sem ATP; C, condição com ATP.

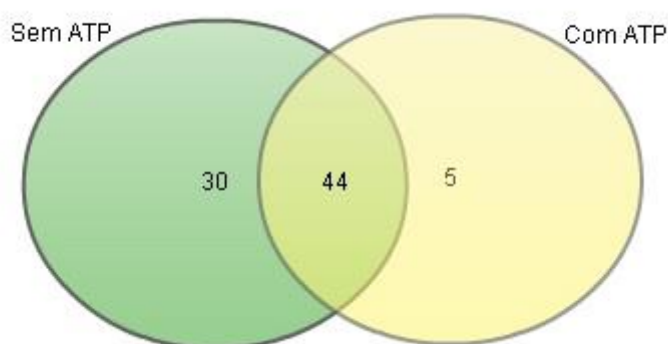


Figura 10. Diagrama de Venn representando as proteínas obtidas nos ensaios de *pull down*.

Os resultados gerados de peptídeos por NanoUPLC-MS^E via Protein Lynx Global Server (PGLS) (**Anexo I**). Foram identificados 1398 e YYY Y peptídeos nos ensaios na ausência e presença de ATP, respectivamente; 54% e 62% destes peptídeos foram obtidos por correspondência de peptídeos na primeira passagem; 11% e 8% foram obtidos na segunda passagem. Um total de 11% e 8% foram identificados por perdas de clivagem da tripsina, enquanto a fragmentação na fonte teve níveis de 14% e 12%; estes valores estão dentro dos padrões esperados para Synapt G1 data. xx% e yy% dos peptídeos foram identificados com erro inferior a 5 ppm (partes por milhão), do ensaio na ausência e presença de ATP respectivamente. Estes dados estão próximos dos descritos por MURAD & RECH (2012), indicando que estes dados tem qualidade para serem trabalhados.

As proteínas identificadas foram classificadas funcionalmente de acordo com Catálogo MIPS Funcional (FunCatDB) (**Figura 11**). Sendo que das 10 proteínas metabólicas descritas, 8 estão relacionadas ao metabolismo de aminoácidos; destas 8, 2 são exclusivas do tratamento na presença de ATP e o restante na ausência de ATP. É interessante salientar que no tratamento de sem ATP foram identificadas 8 enzimas relacionadas à síntese proteica enquanto nenhuma foi relatada para esta função no tratamento com ATP, indicando que em seu estado não fosforilado a ICL tende ser atuante no metabolismo de aminoácidos e possivelmente no metabolismo de nitrogênio em *P. lutzii* também.

Tabela 2. Proteínas provenientes do pull down na presença e ausência de ATP identificadas por UPLC-MS^E. As proteínas marcadas com (*) são provenientes do ensaio na **presença de ATP**.

Nº de acesso	Nome da Proteína	Score	Funcat value	Descrição da função
Metabolismo				
PAAG_04444	Transketolase	487,83	01.01	Metabolismo de aminoácidos
PAAG_07114	Argininosuccinate synthase	350,77	01.01	Metabolismo de aminoácidos
PAAG_00850	Glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase	1029,98	01.01.03	Metabolismo do grupo glutamato, assimilação de amônia
PAAG_01002	NAD-specific glutamate dehydrogenase	271,97	01.01.03.02	Metabolismo de glutamato
PAAG_00856	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit, mitochondrial	755,41	01.01.03.02.01	Biossíntese do glutamato
PAAG_02633	Ribose-phosphate pyrophosphokinase*	194,9	01.01.09.08.01	Biossíntese de triptofano
PAAG_08313	L-PSP endoribonuclease family protein (Hmf1)*	307,84	01.01.11.02.01	Biossíntese de isoleucina
PAAG_06996	G-protein complex beta subunit CpcB	302,29	01.01.13	Regulação do metabolismo de aminoácidos
PAAG_05518	Cell division cycle protein	324,27	01.04	Metabolismo de fosfato
PAAG_08003	Heat shock 70 kDa protein 2	204,6	01.04	Metabolismo de fosfato
PAAG_08348	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I	1001,15	01.04	Metabolismo de fosfato
PAAG_01178	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	354,61	01.05	Metabolismo de carboidratos e compostos-C
PAAG_08174	Mannose-1-phosphate guanylttransferase subunit beta-A	355,22	01.05	Metabolismo de carboidratos e compostos-C
Controle do ciclo celular e processamento de DNA				
PAAG_03031	Tubulin beta chain	931,03	10.03.01	Controle do ciclo celular e mitose

Transcrição				
PAAG_12568	Translational activator GCN1	378,85	11	Transcrição
PAAG_03649	WD repeat-containing protein	346,31	11.02.03.04.03	Repressão da transcrição
PAAG_03816	40S ribosomal protein S4	531,13	11.04.01	Processamento de rRNA
Síntese proteica				
PAAG_00347	60S ribosomal protein L9-B	587,79	12.01	Biogênese de ribossomos
PAAG_05337	40S ribosomal protein S22	849,92	12.01	Biogênese de ribossomos
PAAG_08847	60S ribosomal protein L28	281,63	12.01	Biogênese de ribossomos
PAAG_05484	40S ribosomal protein S5	1217,35	12.01	Biogênese de ribossomos
PAAG_03828	40S ribosomal protein S9	2539,5	12.01	Biogênese de ribossomos
PAAG_08955	40S ribosomal protein S1	1010,04	12.01	Biogênese de ribossomos
PAAG_01834	60S ribosomal protein L16	1176,59	12.01	Biogênese de ribossomos
PAAG_01435	40S ribosomal protein S16	717,48	12.01	Biogênese de ribossomos
PAAG_01330	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G	2868,54	12.04	Tradução
PAAG_01425	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L	1085,98	12.04.01	Iniciação da tradução
Destino proteico				
PAAG_05092	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase*	79,6	14.07.05	Ubiquitinação/deubiquitinação
Proteína com função de ligação				
PAAG_02765	Iron-sulfur cluster assembly associated protein Nar1*	116,1	16.01	Proteína de ligação
Não classificadas				
PAAG_02004	Hypothetic protein *	317,71	-	-
PAAG_11343	Serine/threonine –protein kinase AtPK1/AtPK6	166,68	-	-

PAAG_08076	Hypothetic protein	310,84	-	-
PAAG_06520	Hypothetic protein	247,94	-	-
PAAG_12263	PCI domain-containing protein	589,32	-	-

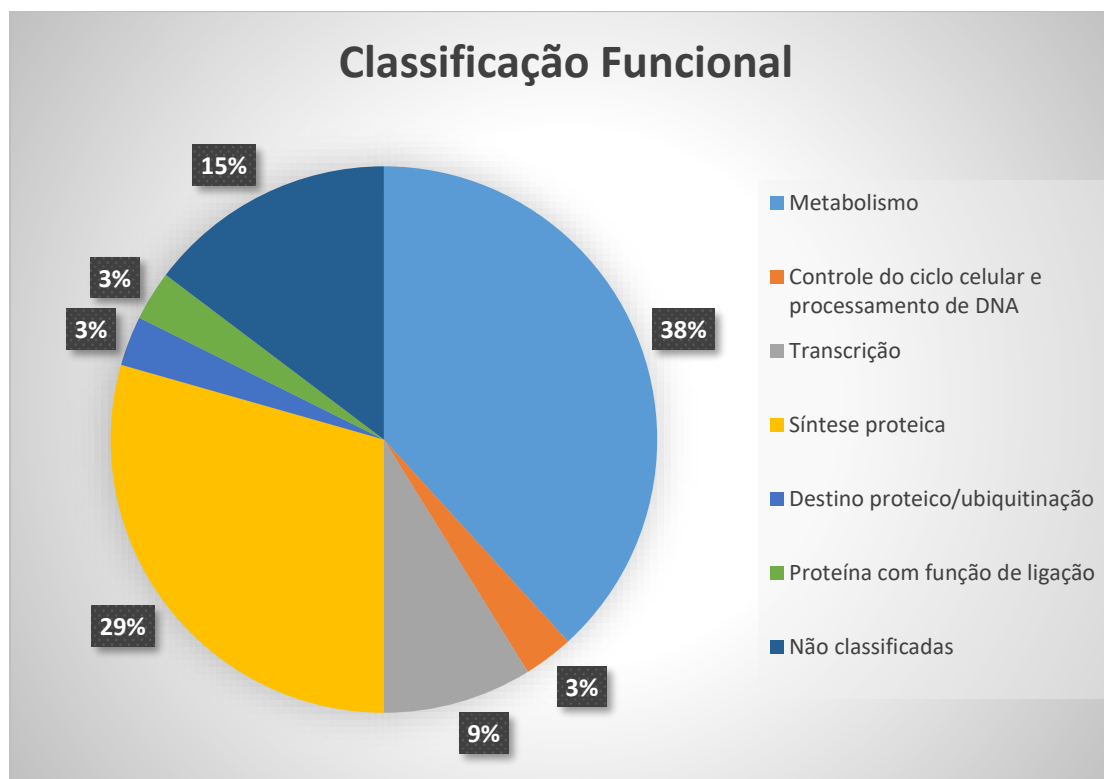


Figura 11. Categorias funcionais das proteínas totais identificadas nos ensaios de interações moleculares na presença e ausência de ATP com extrato proteico de *P. lutzii* da fase leveduriforme. As proteínas identificadas foram agrupadas em categorias funcionais de acordo com o banco de dados denominado Catálogo MIPS Funcional (FunCatDB).

A via das pentoses fosfato tem por finalidade gerar nucleotídeos para manutenção do material genético celular e também fornecer NADPH para reduções biossintéticas ou contrapor efeitos deletérios de radicais de oxigênio além de ser empregado na síntese de ácidos graxos, colesterol e hormônios esteroides. Entretanto, esta via metabólica não se restringe a estas funções, estando também envolvida no metabolismo energético de células de reprodução rápida por meio de síntese de ATP, NADH, FADH₂ e coenzima A (NELSON; COX, 2014). Durante as análises realizadas foram identificadas três enzimas envolvidas na via das pentoses-fosfato. A glicose-6-fosfato desidrogenase, a qual é responsável pela terceira reação da etapa oxidativa da via convertendo 6-fosfogluconato a D-ribulose-5-fosfato com a redução de NADP⁺ a NADPH + H⁺. Outra enzima identificada foi a transcetolase, responsável pela formação de sedoeptulose-7-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato a partir de xilulose-5-fosfato e ribose-5-fosfato. Posteriormente na via, a transcetolase também atuará na formação de frutose-1,6- bifosfato que por sua vez pode ser utilizada na gliconeogênese (NELSON; COX, 2014). Por último, ribose fosfato pirofosfoquinase atua na conversão de D-ribose-5-fosfato na presença de ATP a 5-fosfo- α -D-ribose-1-difosfato (PRPP) + AMP (SCHROMBURG; DORTE, 1997). O PRPP é um intermediário tanto da biossíntese de purinas como de aminoácidos, analisando os possíveis desdobramentos da via, notamos que em determinado momento ela pode resultar na produção de glioxilato por meio da degradação de xantossina-fosfato a xantina pela purina-nucleosídeo fosforilase. As reações subsequentes levam à formação urato, alantoína e alantoato, este último pela ação da alantoicase dá origem à ureia e glioxilato. Estando a ICL fosforilada e sinalizada para degradação, o acionamento da via de biossíntese de purinas para a produção de glioxilato seria uma opção para a manutenção do ciclo. Desta maneira não haveria formação de succinato, todavia a entrada do glioxilato no ciclo resultaria na produção de oxaloacetato e consequentemente não haveria a interrupção da gliconeogênese.

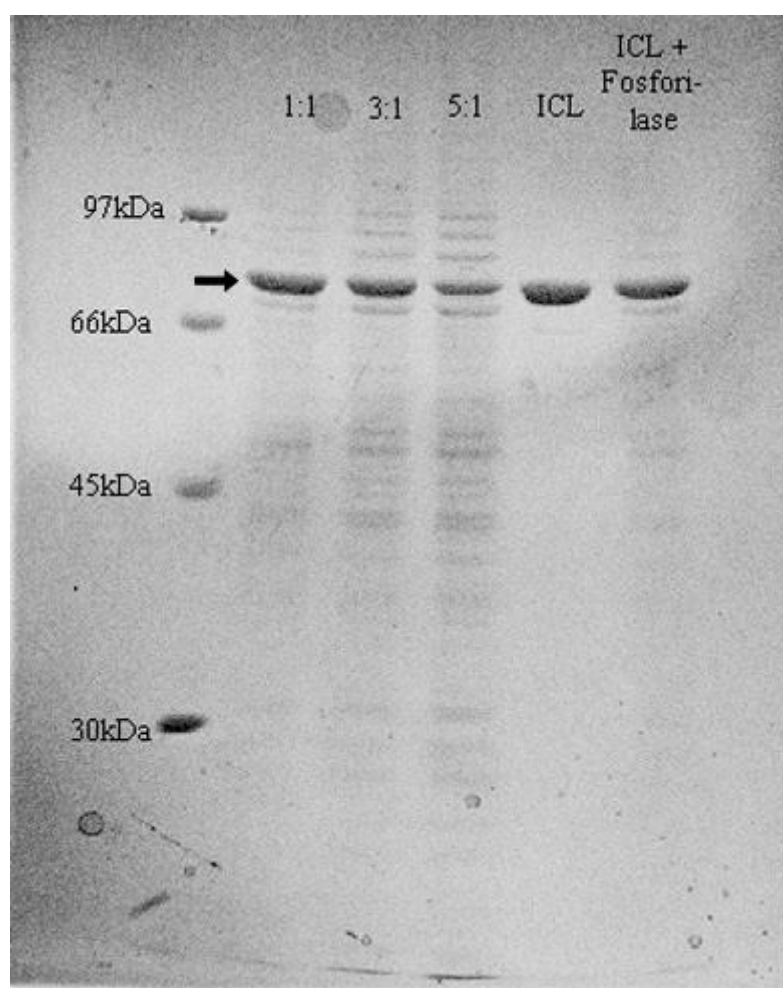
A presença destas enzimas em ambos ensaios sugere que a via das pentoses-fosfato é acionada como uma forma de complementar o metabolismo energético das células em um contexto no qual a principal fonte energética, os carboidratos, está indisponível. Neste caso as células aparentemente mobilizam a via das pentoses fosfato como forma de gerar coenzimas reduzidas e intermediários da gliconeogênese como glicose-6-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato.

O envolvimento da ICL em vias relacionadas a biossíntese de nucleotídeos sugere que esta enzima não seja ativa apenas no citosol, principalmente em seu estado fosforilado. Estudos de caracterização da fração proteômica nuclear e mitocondrial desenvolvidos em *P. lutzii* relataram a presença de ICL em ambas organelas (OLIVEIRA, 2014; CASALETTI et al, 2014), reforçando esta possível relação da enzima com vias metabólicas nucleares como o metabolismo de purinas e pirimidinas.

Das proteínas metabólicas encontradas nos ensaios, 5 delas estão ligadas a biossíntese de aminoácidos, sendo 2 do ensaio com ATP e 3 do ensaio sem ATP. O que indica uma possível função relevante da ICL na biossíntese de aminoácidos e/ou ciclo do nitrogênio, principalmente quando a enzima se encontra no estado fosforilado.

A fosforilação tem sido reportada na literatura como fundamental para a regulação da atividade de ICL em fungos leveduriformes. López-Boado e colaboradores (1987) realizaram inativação de ICL por meio de um processo chamado inativação catabólica. Leveduras de *Saccharomyces cerevisiae* foram transferidas de um meio de cultura contendo etanol como fonte de carbono para outro meio com glicose como fonte de carbonos. A exposição a glicose fez com que os níveis de cAMP aumentassem no citosol levando a inativação de ICL, os autores então sugeriram a possibilidade de estar ocorrendo a fosforilação desta enzima. Posteriormente, ao retornarem *S. cerevisiae* ao meio com etanol como fonte de carbonos detectaram permanente inativação de ICL após 45 minutos de exposição da enzima a glicose, possivelmente indicando que a inativação sofrida pela enzima era irreversível, podendo ser resultante da degradação da enzima. Em *Paracoccidioides lutzii* foi observado que em glicose a ICL está presente em grandes quantidades nas células, todavia apresenta atividade extremamente reduzida. Uma vez expostas à fosfatase (CIAP), *PbICL* apresentou aumento oito vezes sua atividade enzimática, demonstrando que a fosforilação interfere negativamente e sua atividade enzimática (CRUZ et al., 2011). Dentre as proteínas identificadas no ensaio na presença de ATP deste trabalho, encontra-se a ubiquitina carboxi-terminal hidrolase, enzima atuante nos processos de deubiquitinação que apresenta sua capacidade de hidrolisar pequenas amidas e ésteres na porção carboxi-terminal de ubiquitinas (WILKINSON, 1997). A ubiquitinação consiste na adição de ubiquitinas (pequenos polipeptídios de aproximadamente 76 aminoácidos) às proteínas que estão destinadas a degradação pelo sistema proteassoma 26S, enquanto a deubiquitinação consiste basicamente na liberação de monômeros de ubiquitina de proteínas ou de remanescentes de substratos do

proteassoma 26S (RECHSTEINER, 1988). A fosforilação e a ubiquitinação são modificações pós-traducionais que dialogam constantemente em eventos moleculares. Tendo em vista que a fosforilação pode regular tanto negativamente quanto positivamente os processos de ubiquitinação (HUNTER, 2007), sugerimos que no caso da ICL a fosforilação atue como um sinal para que a enzima seja ubiquitinada e consequentemente degradada. Isto explicaria a inativação irreversível posteriores aos eventos de fosforilação que aparentemente ocorreram na estrutura de ICL. A **figura 12** mostra o resultado de um ensaio de fosforilação que com o aumento da concentração de extrato de *P. lutzii* existe uma diminuição na quantidade de ICL disponível no ensaio.



Considerando a possibilidade de que a alteração do estado não fosforilado para o estado fosforilado de ICL esteja ocasionando a ubiquitinação da enzima e consequentemente sua degradação, podemos afirmar que esta foi a alteração observada

em trabalhos anteriores que ocasionou a inativação irreversível da atividade enzimática de ICL após possíveis eventos de fosforilação observados em cada trabalho, respectivamente (CRUZ et al., 2011; LÓPEZ-BOADO et al., 1987). Esta constatação aliada ao fato de que a ICL desempenha um papel vital na virulência de *P. lutzii* abrem uma possibilidade até então inexplorada, o emprego de inibidores de fosfatases no tratamento de PCM. Esta é uma abordagem que já vem sendo utilizada em tratamentos de doenças neurológicas, metabólicas, respiratórias e diabetes tipo 2. No tratamento de câncer os inibidores de fosfatase são letais para uma grande quantidade de células cancerígenas (JOHNSON; ERMOLIEFF; JIROUSEK, 2002; MCCLUSKEY; SIM; SAKOFF, 2002).

6. CONCLUSÕES

Constatamos que no estado não fosforilado, a ICL encontra-se intimamente ligada à síntese de proteínas por interagir com diversas proteínas envolvidas na síntese de aminoácidos. Foi também observado o possível acionamento da via das pentoses-fosfato como estratégia para potencializar a geração de energia do fungo no organismo hospedeiro, uma vez que este é um ambiente hostil com limitações nutricionais, esta seria uma estratégia viável para a permanência do patógeno.

Através dos dados obtidos sugerimos que possivelmente a fosforilação seja um sinal para a ubiquitinação com a finalidade de destinar a ICL à degradação. Caso seja este mesmo o efeito da fosforilação sobre a ICL, estará aberta a possibilidade de uma nova abordagem para o tratamento de PCM por meio de inibidores de fosfatases.

7. PERSPECTIVAS

A fim de obter dados comprobatórios da ubiquitinação de ICL sinalizada pela fosforilação da enzima, realizaremos:

- Definir qual (is) quinase (s) responsável (is) pela fosforilação de ICL;
- Ensaios de ubiquitinação com a ICL em seus diferentes estados de fosforilação;
- Ensaios de atividade enzimática após o ensaio de ubiquitinação de ICL;
- *Western blot* do material obtido do ensaio de ubiquitinação;
- Mapear o sítio de fosforilação de ICL;
- Elaborar estratégias para investigar a relação da ICL com proteínas relacionadas à biossíntese de aminoácidos;
- Investigar qual (is) fosfatase (s) atua (m) sobre ICL e seus respectivos inibidores;

8. REFERÊNCIAS

- AMEEN, M.; TALHARI, C.; TALHARI, S. Advances in paracoccidioidomycosis. **Clinical and experimental dermatology**, v. 35, n. 6, p. 576–80, ago. 2010.
- ARRAES, F. B. M. et al. General metabolism of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 4, n. 2, p. 290–308, jan. 2005.
- BALHORN, R. et al. Phosphorylation of the lysine-rich histones throughout the cell cycle. **Biochemistry**, v. 14, n. 11, p. 2504–11, 3 jun. 1975.
- BASTOS, K. P. et al. The transcriptome analysis of early morphogenesis in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium reveals novel and induced genes potentially associated to the dimorphic process. **BMC microbiology**, v. 7, p. 29, jan. 2007.
- BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Bioquímica**. 6th. ed. São Paulo: Guanabara-Koogan, 2008.
- BOCCA, A. L. et al. Paracoccidioidomycosis: eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. **Future microbiology**, v. 8, p. 1177–91, set. 2013.
- BUSTAMANTE-SIMON, B. et al. Characteristics of the conidia produced by the mycelial form of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Medical mycology**, v. 23, n. 6, p. 407–414, 1985.
- CARNEIRO, R. DA C. et al. **Juvenile paracoccidioidomycosis in urban area : report of two cases** *Journal of Infectious Diseases*, The, 2006.
- CARRERO, L. L. et al. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. **Fungal Genetics and Biology**, v. 45, p. 605–612, 2008.
- CHIKAMORI, T. et al. Paracoccidioidomycosis in Japan Report of Case. **Revista Instituto Medicina Tropical São Paulo**, v. 26, n. 5, p. 267–271, 1984.
- COLOMBO, A. L. et al. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. **Medical mycology : official publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 49, n. 8, p. 785–98, nov. 2011.
- COSTA, M. et al. Transcriptome profiling of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast-phase cells recovered from infected mice brings new insights into fungal response upon host interaction. **Microbiology (Reading, England)**, v. 153, n. Pt 12, p. 4194–207, dez. 2007.
- CRUZ, A. DA S. et al. Phosphorylation is the major mechanism regulating isocitrate lyase activity in *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells. **The FEBS journal**, v. 278, p. 2318–2332, 2011.
- DA SILVA NETO, B. R. et al. The malate synthase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a linked surface protein that behaves as an anchorless adhesin. **BMC microbiology**, v. 9, p. 272, jan. 2009.

DERAY, G. Amphotericin B nephrotoxicity. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 49 Suppl 1, p. 37–41, mar. 2002.

DERENGOWSKI, L. S. et al. Upregulation of glyoxylate cycle genes upon *Paracoccidioides brasiliensis* internalization by murine macrophages and in vitro nutritional stress condition. **Medical mycology**, v. 46, n. 2, p. 125–34, mar. 2008.

EGLÉN, R.; REISINE, T. Drug discovery and the human kinome: recent trends. **Pharmacology & therapeutics**, v. 130, n. 2, p. 144–56, maio 2011.

FERNANDES, L. et al. Cell signaling pathways in *Paracoccidioides brasiliensis*--inferred from comparisons with other fungi. **Genetics and molecular research [electronic resource] : GMR.**, v. 4, n. 2, p. 216–231, 2005.

FISCHER, E. H.; KREBS, E. G. Conversion of phosphorylase b to phosphorylase a in muscle extracts. **Journal of Biological Chemistry**, v. 216, p. 121–132, 1955.

GEROMANOS, S. J. et al. 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, n. 6, p. 1683–95, mar. 2009.

HORRÉ, R. et al. A case of imported paracoccidioidomycosis in a German legionnaire. **Medical mycology**, v. 40, n. 2, p. 213–216, 2002.

HOTEZ, P. J. et al. The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: A review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 9, 2008.

HOWELL, A. S.; LEW, D. J. Morphogenesis and the cell cycle. **Genetics**, v. 190, n. 1, p. 51–77, 2012.

HUNTER, T. The Age of Crosstalk: Phosphorylation, Ubiquitination, and Beyond. **Molecular Cell**, v. 28, p. 730–738, 2007.

JOHNSON, L. N. The regulation of protein phosphorylation. **Biochemical Society transactions**, v. 37, n. Pt 4, p. 627–41, ago. 2009.

JOHNSON, L. N.; LEWIS, R. J. Structural Basis for Control by Phosphorylation. **Chemical Reviews**, v. 101, n. 8, p. 2209–2242, ago. 2001.

JOHNSON, T. O.; ERMOLIEFF, J.; JIROUSEK, M. R. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors for diabetes. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 1, n. 9, p. 696–709, 2002.

KEE, J.-M.; MUIR, T. W. Chasing phosphohistidine, an elusive sibling in the phosphoamino acid family. **ACS chemical biology**, v. 7, n. 1, p. 44–51, 20 jan. 2012.

KOMANDER, D. The emerging complexity of protein ubiquitination. **Biochemical Society transactions**, v. 37, p. 937–953, 2009.

KREBS, E. G.; BEAVO, J. A. Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes. **Annual review of biochemistry**, v. 48, p. 923–59, 1979.

- LI, G. Z. et al. Database searching and accounting of multiplexed precursor and product ion spectra from the data independent analysis of simple and complex peptide mixtures. **Proteomics**, v. 9, n. 6, p. 1696–1719, 2009.
- LINARES, G.; BAKER, R. D.; LINARES, L. Paracoccidioidomycosis in the United States (South American Blastomycosis). **Archives of otolaryngology**, v. 93, p. 514–518, 1971.
- LÓPEZ-BOADO, Y. S. et al. Catabolite inactivation of isocitrate lyase from *Saccharomyces cerevisiae*. **Archives of Microbiology**, v. 147, p. 231–234, 1987.
- LORENZ, M. C.; FINK, G. R. The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. **Nature**, v. 412, n. 6842, p. 83–6, 5 jul. 2001.
- LORENZ, M. C.; FINK, G. R. Life and Death in a Macrophage : Role of the Glyoxylate Cycle in Virulence. v. 1, n. 5, p. 657–662, 2002.
- LUTZ, A. Uma micose pseudococcídica localizada na boca e observada no Brasil . Contribuição ao conhecimento das. In: **Adolpho Lutz - Obra Completa**. [s.l: s.n.]. p. 483–494.
- MANNING, G. et al. The protein kinase complement of the human genome. **Science (New York, N.Y.)**, v. 298, n. 5600, p. 1912–34, 6 dez. 2002.
- MARQUES, S. A. Paracoccidioidomycosis. **Clinics in dermatology**, v. 30, n. 6, p. 610–5, 2012.
- MARQUES, S. A. Paracoccidioidomycosis: epidemiological, clinical, diagnostic and treatment up-dating. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 88, n. 5, p. 700–11, 2013.
- MARTINEZ, R. Paracoccidioidomycosis : the dimension of the problem of a neglected disease Paracoccidioidomicose : a dimensão do problema de uma doença negligenciada. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 4, p. 2010, 2010.
- MATUTE, D. R. et al. Microsatellite analysis of three phylogenetic species of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 6, p. 2153–7, jun. 2006.
- MCCLUSKEY, A.; SIM, A. T. R.; SAKOFF, J. A. Serine - Threonine Protein Phosphatase Inhibitors: Development of Potential Therapeutic Strategies. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 6, p. 1151–1175, 2002.
- MCKINNEY, J. D. et al. Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. **Nature**, v. 406, p. 735–738, 2000.
- MURAD, A. M.; RECH, E. L. NanoUPLC-MSE proteomic data assessment of soybean seeds using the Uniprot database. **BMC biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 82, 2012.
- MYERS, M. G. Cell biology. Moonlighting in mitochondria. **Science**, v. 323, n. 5915, p. 723–724, 2009.
- NELSON, D.; COX, M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6th. ed. São Paulo: Artmed, 2014.

OLIVEIRA, L. N. **Caracterização proteômica da fração nuclear da forma leveduriforme de espécies de Paracoccidioides**. 99p. Dissertação de Mestrado. Goiânia. Universidade Federal de Goiás, 2014.

OLSEN, J. V et al. Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. **Cell**, v. 127, n. 3, p. 635–48, 3 nov. 2006.

PEDROSO, V.; VILELA, M. Paracoccidioidomicose com comprometimento do sistema nervoso central: revisão sistemática da literatura. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 6, p. 691–697, 2009.

PRADO, M. et al. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 3, p. 513–21, maio 2009.

PUTTICK, J.; BAKER, E. N.; DELBAERE, L. T. J. Histidine phosphorylation in biological systems. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1784, n. 1, p. 100–5, jan. 2008.

RECHSTEINER, M. (ED.). **Ubiquitin**. 1st. ed. New York: Springer Science + Business Media, 1988.

SASIKUMAR, A. N.; PEREZ, W. B.; KINZY, T. G. The many roles of the eukaryotic elongation factor 1 complex. **Wiley interdisciplinary reviews. RNA**, v. 3, n. 4, p. 543–55, 2013.

SCHROMBURG, D.; DORTE, S. **Enzyme Handbook 14**. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1997.

SCHWARTZ, P. A.; MURRAY, B. W. Protein kinase biochemistry and drug discovery. **Bioorganic chemistry**, v. 39, n. 5-6, p. 192–210, dez. 2011.

SHIKANAI-YASUDA, M. et al. Guideliness in paracoccidioidomycosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 297–310, 2006.

SHIKANAI-YASUDA, M.; BERNARD, G.; HIGAKI, Y. Randomized trial with itraconazole, ketoconazole and sulfadiazine in paracoccidioidomycosis. **Medical mycology : official publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 40, p. 411–17, 2002.

TAYLOR, S. S. et al. Evolution of the eukaryotic protein kinases as dynamic molecular switches. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 367, n. 1602, p. 2517–28, 19 set. 2012.

TEIXEIRA, M. D. M. **Tipagem molecular e evolução do gênero Paracoccidioides Tipagem molecular e evolução do gênero Paracoccidioides**. 178p. Tese de Doutorado. Brasília. Universidade de Brasília, 2008.

TEIXEIRA, M. D. M. et al. Molecular and morphological data support the existence of a sexual cycle in species of the genus Paracoccidioides. **Eukaryotic Cell**, v. 12, n. 3, p. 380–389, 2013.

TEIXEIRA, M. M. et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the Paracoccidioides genus. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 52, n. 2, p. 273–83, ago. 2009.

UNTEREINER, W. A. et al. The Ajellomycetaceae , a new family of vertebrate-associated Onygenales. **The Mycological Society of America**, v. 96, n. 4, p. 812–821, 2004.

VAN DAMME, P. A. et al. A case of imported paracoccidioidomycosis: an awkward infection in The Netherlands. **Medical mycology**, v. 44, n. 1, p. 13–18, 2006.

WALSH, C. **Post Translational Modification of Proteins: Expanding Nature's Inventory**. 1st. ed. Greenwood Village: Robert and Company Publishers, 2006.

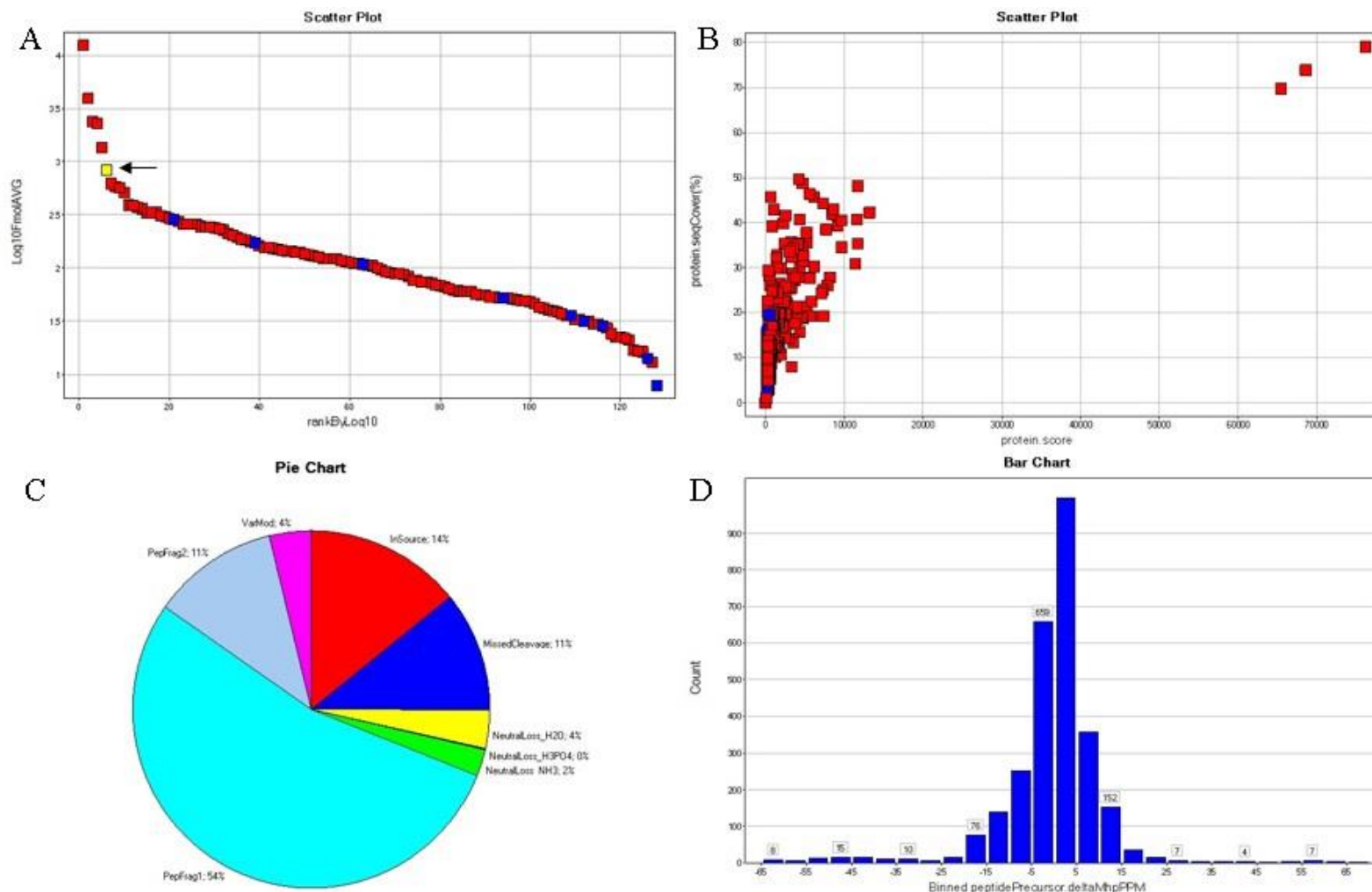
WALSH, D. A.; PERKINS, J. P.; KREBS, E. G. An adenosine 3'-5'-Monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle. **The Journal of biological chemistry**, v. 243, p. 3763–3765, 1968.

WILKINSON, K. D. Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 11, p. 1245–1256, 1997.

WILKINSON, K. D. Ubiquitination and deubiquitination: targeting of proteins for degradation by the proteasome. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 11, p. 141–148, 2000.

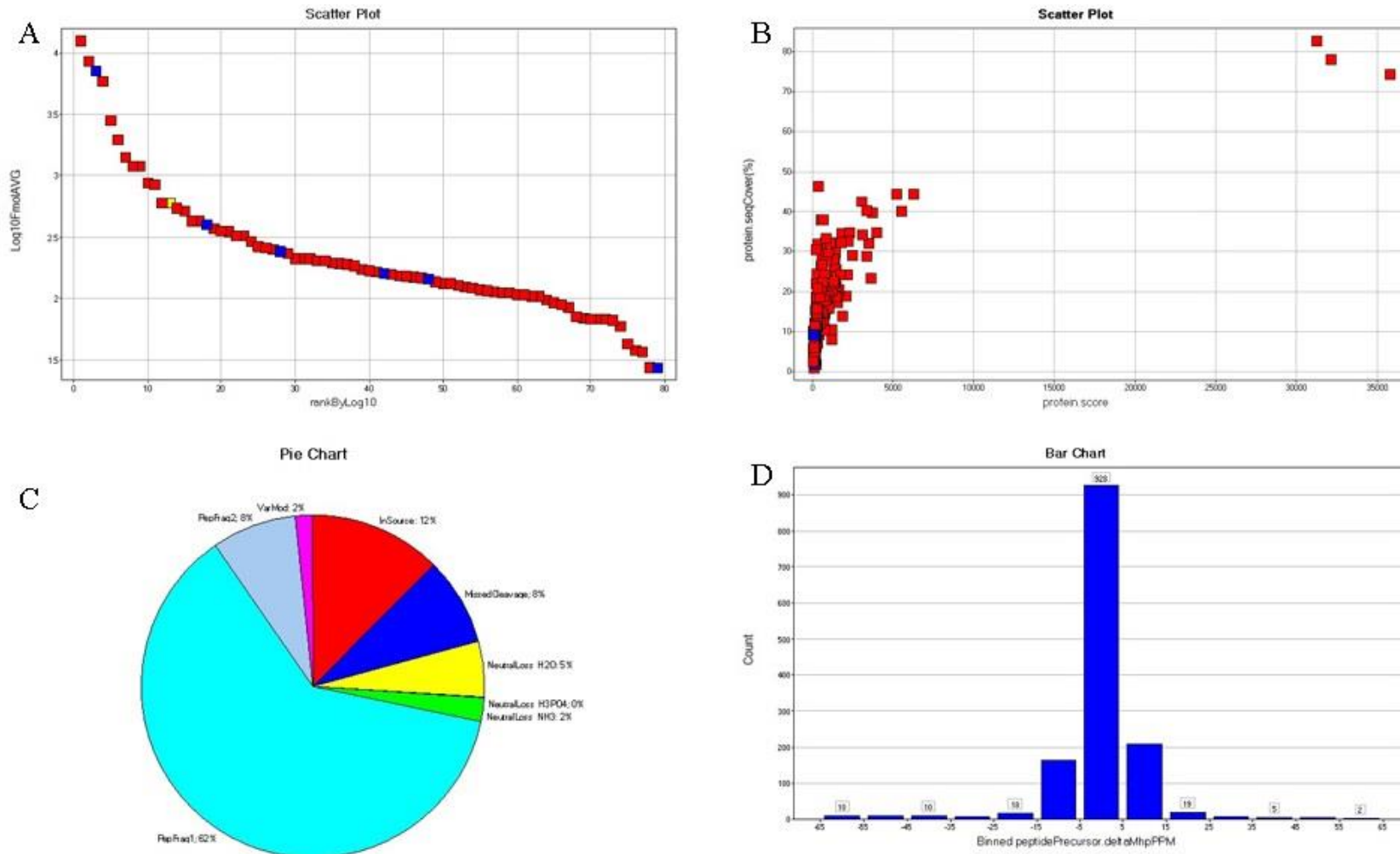
ANEXOS

Gráficos de qualidade do ensaio sem ATP



A- Faixa de detecção dinâmica das proteínas de acordo com sua abundância e peso molecular. Proteínas identificadas de forma regular (**vermelho**) e reversa (**azuis**) e PHB - seta; **B-** Gráfico de cobertura de sequência das proteínas. **C-** Tipo de detecção dos peptídeos. Os gráficos de pizza mostram as porcentagens do tipo de detecção dos peptídeos no ensaio sem ATP. **PepFrag1** e **PepFrag2** indica o tipo de identificação utilizando o banco dados do *Paracoccidoides* 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 de ionização; **MissedCleavage**, perda de clivagem pela tripsina; **NeutralLoss H2O**, **NH3** e **H3PO4**, correspondente às perdas de precursores de água, amônia e ácido fosfórico, respectivamente. **D-** Análise de precisão na detecção de massa. Os gráficos mostram acurácia na detecção das massas dos peptídeos no ensaio sem ATP.

Gráficos de qualidade do ensaio com ATP



A- Faixa de detecção dinâmica das proteínas de acordo com sua abundância e peso molecular. Proteínas identificadas de forma regular (**vermelho**) e reversa (**azuis**) e PHB - seta; **B-** Gráfico de cobertura de sequência das proteínas. **C-** Tipo de detecção dos peptídeos. Os gráficos de pizza mostram as porcentagens do tipo de detecção dos peptídeos nos ensaios com ATP. **PepFrag1** e **PepFrag2** indica o tipo de identificação utilizando o banco dados do *Paracoccidoides* 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 de ionização; **MissedCleavage**, perda de clivagem pela tripsina; **NeutralLoss H2O**, **NH3** e **H3PO4**, correspondente às perdas de precursores de água, amônia e ácido fosfórico, respectivamente. **D-** Análise de precisão na detecção de massa. Os gráficos mostram acurácia na detecção das massas dos peptídeos nos ensaios com ATP.