



Universidade de Brasília  
Faculdade de Medicina  
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

---

**Remodelamento metabólico de *Paracoccidioides lutzii*  
durante a privação de cobre determinado por análises  
proteômicas**

---

## Tese de Doutorado

Aluna: Laura Maria Barbosa Gonçalves  
Orientadora: Dra. Célia Maria de Almeida Soares

**BRASÍLIA – 2015**

Laura Maria Barbosa Gonçalves

**Remodelamento metabólico de *Paracoccidioides lutzii*  
durante a privação de cobre determinado por análises  
proteômicas**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Patologia Molecular da Universidade de Brasília como  
requisito para obtenção do título de Doutor em  
Patologia Molecular**

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

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade de Brasília.

Gonçalves, Laura Maria Barbosa

Remodelamento metabólico de *Paracoccidioides lutzii* durante a privação de cobre determinado por análises proteômicas/ Laura Maria Barbosa Gonçalves. - - 2015.

xiii, 125 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) - Universidade de Brasília, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, 2013.

Inclui bibliografia.

1. Paracoccidioides lutzii. 2. Privação de cobre. 3. Análise Proteômica. I. Soares, Célia Maria de Almeida. II.

Título.

**TRABALHO REALIZADO NO LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR DO DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS.**

**APOIO FINANCEIRO: CAPES/ CNPq/ FAPEG/FINEP**

## **BANCA EXAMINADORA**

### **TITULARES**

Profa. Dra. Célia Maria de Almeida Soares, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.

Prof. Dr. Carlos André O. Ricart, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília.

Prof. Dr. Aldo Henrique Fonseca Pacheco Tavares, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília.

Profa. Dra. Lilian Cristiane Baeza, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.

### **SUPLENTE**

Prof. Dra. Simoneide Souza Silva, Conselho de Ensino, Pesquisa e Extensão, Universidade de Brasília.

*A ciência é incapaz de resolver os mistérios finais da natureza, porque na verdade fazemos parte do mistério que tentamos resolver.*

**Max Planck (1858-1947)**

*“Todo o futuro da nossa espécie, todo o governo das sociedades, toda a prosperidade moral e material das nações dependem da ciência, como a vida do homem depende do ar. Ora, a ciência é toda observação, toda exatidão, toda verificação experimental. Perceber os fenômenos, discernir as relações, comparar as analogias e as dessemelhanças, classificar as realidades, e induzir as leis, eis a ciência”*

**RUI BARBOSA**

Dedico este trabalho com muito carinho;  
Aos meus amados pais, que são a base do meu caminho,  
obrigado por toda a paciência e incentivo,  
À meus irmãos queridos pela amizade e carinho,  
Ao meu querido esposo, por todo apoio e compressão ao longo  
desta caminhada.  
Enfim, a todos que contribuíram para a elaboração deste trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, meu supremo Senhor que me fez conquistar um sonho, superar as adversidades e como a bíblia diz, isso nos torna “mais que vencedores”...

A minha querida família, em especial a todos os meus tios, pelo carinho apoio e dedicação em todos os momentos de minha vida.

Aos meus amados pais, Maria e Reinaldo pelos ensinamentos de vida, por toda a compreensão, carinho e paciência em me escutar, aconselhar e dar incentivo em tudo o que fiz desde o jardim da infância. Pela dedicação em todos os momentos da vida e pelo amor, carinho e cuidado sempre dedicado a mim ...

Aos meus irmãos Rui e Nidia, pelo carinho, amizade e companheirismo.

Ao meu esposo Merivaldo, pelo amor dedicado a mim, pelos cuidados e paciência nesta etapa tão importante de nossas vidas, pela cumplicidade e por absolutamente todos os momentos que vivemos juntos, quando crescemos profissionalmente e amadurecemos sempre juntos, para começarmos uma nova etapa de nossas vidas... Muito melhor...

A Universidade de Brasília por me acolher e contribuir em minha formação junto à pesquisa e a docência, área que escolhi para atuar profissionalmente...

A professora Dra. Célia Maria de Almeida Soares, minha orientadora, pela confiança e paciência e pela oportunidade em desenvolver esse trabalho.

A minha amiga Tereza Cristina, sempre disposta a ajudar, obrigado pelos grandes ensinamentos nos experimentos desenvolvidos nesse trabalho. Obrigado pela preocupação e atenção, solidariedade e carinho.

Ao laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Goiás por me acolher no desenvolvimento deste trabalho .

A todos os colegas da BioMol, Mariele, Juliana, Luiz Paulo, Leleandro, Gabriel, André , Livia , Joyce, Carla, Edilânia, Igor, Thaty, Felipe, Paula, Paulo Henrique, Diandra, Amanda, Lucas Nojosa, Luciana, Patrícia, Mirele, Elisa. Aos amigos Leandro Nascimento, Sheyla, Lucas Oliveira, Vanessa, Daniele, Alessandro, Fabiana, Lilian, Mirian (sucesso!!!), Marta, sempre muito prestativos em me ajudar, auxiliar, em especial pelas boas conversas, risadas e pela agradável convivência.

Aos professores de Brasília que contribuíram no meu trabalho ou participaram da minha avaliação em algum momento do doutorado tais como Aldo Henrique, Octávio Franco, Sebátien Charneau. Ao professor Bergmann Ribeiro que, no posto de coordenador da Pós-Graduação, esteve disposto a me ajudar sempre que precisei. Ao atual coordenador Carlos André Ricart pelo compromisso em fazer um ótimo trabalho. Ao pessoal da secretaria, Jaqueline, Alessandro, Daniela que sempre me ajudaram. Só tenho a agradecer!

Aos Profs. Alexandre, Clayton , Juliana, Maristela e Silvia. Pela disposição em sempre ajudar. Muito obrigada.

Aos membros da Banca que aceitaram o convite para contribuir com nosso trabalho.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular.

Aos agentes financiadores do trabalho.

Em geral agradeço a todos que com grandes e pequenas parcelas de colaboração, em todos os sentidos fizeram parte deste trabalho.

Muito obrigado!!!

# Sumário

<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS</b> .....	xi
<b>RESUMO</b> .....	xv
<b>Abstract</b> .....	xvi
<b>1.INTRODUÇÃO</b> .....	17
1.1 FUNGO PATOGÊNICO <i>PARACOCCIDIOIDES</i> SPP. ....	17
1.2 PARACOCCIDIOIDOMICOSE – PCM .....	21
1.3 O MICRONUTRIENTE COBRE .....	25
1.4 HOMEOSTASE DO COBRE.....	27
1.5 PROTEÔMICA .....	35
1.6 ANÁLISE PROTEÔMICA DE FUNGOS PATOGÊNICOS HUMANOS.....	37
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	40
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	42
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	43
4.1 ISOLADO E MANUTENÇÃO DE <i>PARACOCCIDIOIDES</i> .....	43
4.2 CULTIVO DO FUNGO EM CONDIÇÕES DE PRIVAÇÃO DE COBRE.....	43
4.3 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS CITOPLASMÁTICAS E PREPARAÇÃO DO EXTRATO PROTEICO ...	43
4.4 VIABILIDADE CELULAR SOB CONDIÇÕES DE PRIVAÇÃO DE COBRE.....	44
4.5 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL DE PROTEÍNAS (2-DE) E COLORAÇÃO DOS GÉIS .....	44
4.6 AQUISIÇÃO E ANÁLISE DAS IMAGENS .....	46
4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	48
4.8 DIGESTÃO DAS PROTEÍNAS PARA ESPECTROMETRIA DE MASSA TIPO MALDI .....	48
4.9 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS POR PMF E POR MS/MS E PESQUISA EM BANCO DE DADOS.....	49
4.10 PREPARAÇÃO E DIGESTÃO DAS AMOSTRAS PROTEICAS PARA NANO-ESI-UPLC-MS <sup>E</sup> ....	50

4.11	PROCESSAMENTO DOS DADOS E IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS .....	50
4.12	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES EM CONDIÇÕES DE PRIVAÇÃO DE COBRE , SÍNTESE DE CDNA E ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR QRT-PCR EM TEMPO REAL .....	51
4.13	ANÁLISES POR WESTERN BLOTTING.....	52
<b>5.0</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>54</b>
5.1	VIABILIDADE CELULAR DE <i>PARACOCCIDIOIDES LUTZII</i> .....	54
5.2	ANÁLISE DE EXPRESSÃO DO GENE CTR3, ENVOLVIDO NO METABOLISMO DE COBRE, EM <i>P. LUTZII</i> DURANTE RESTRIÇÃO DE COBRE. ....	55
5.3	ANÁLISES PROTEÔMICAS DE <i>P. LUTZII</i> POR ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (2-DE) .....	56
5.4	IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS ATRAVÉS DE ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (2-DE). .	59
5.5	ANÁLISE PROTEÔMICA ATRAVÉS DE NANOUPLC-MS <sup>E</sup> .....	71
5.6	IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE <i>P. LUTZII</i> ATRAVÉS DO NANO-ESI-UPLC-MS <sup>E</sup> .....	73
5.7	ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE AS ANÁLISES PROTEÔMICAS DE <i>P. LUTZII</i> POR ELETROFORESE BIDIMENSIONAL E NANO-ESI-UPLC-MS <sup>E</sup> .....	78
5.8	CORRELAÇÃO ENTRE OS DADOS PROTEÔMICOS E TRANSCRICIONAIS.....	94
5.9	ANÁLISES POR WESTERN BLOTTING .....	94
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>96</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>103</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

2D	gel bidimensional
2-DE	Eletroforese bidimensional
ACN	acetonitrila
ANOVA	análise de variância
ATP	adenosina trifosfato
ATX1	chaperona de cobre
BCS	batocuproinadisulfonato sódico
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato
BSA	albumina sérica
CAO	cobre amino oxidase
CCC2	transportador de cobre do aparato de Golgi
CaCl <sub>2</sub>	cloreto de cálcio
cDNA	DNA complementar
CEA10	linhagem selvagem de <i>Aspergillus fumigatus</i>
CHAPS	3-[(3-Colamidopropil)dimetilamônio]-1 propanosulfonato
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono
CoA	Coenzima A
CRP	proteína responsiva ao cobre
CTR3	transportador de cobre de alta afinidade
CU	íon cobre
Cu <sup>+</sup>	íon cobre reduzido
Cu <sup>+2</sup>	íon cobre oxidado
<i>Cuf</i> 1	fator de transcrição cobre-dependente
CuSO <sub>4</sub>	Sulfato de cobre
cDNA	DNA complementar
cDNA RDA	Análise de Diferença Representacional de cDNA
DNA	ácido desoxirribonucléico
DTT	ditiotretitol
EBP	proteína de ligação ao estradiol
EROs	espécies reativas de oxigênio

Fe	íon ferro
FRE	ferro redutase
FMD	formamidase
gi	identificadores gerais de informação do banco de dados GenBank
GABA	<i>shunt</i> rota aminobutirato
GAPDH	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GPI	glicosilfosfatidilinositol
HCl	ácido clorídrico
HSP	proteína de resposta ao choque térmico
IDV	valores de densidade integrada
IFN	intérferon
IPG	gradiente de pH imobilizado
ITS	sequência espaçadora interna
kDa	kilodáton
Log 2	logaritmo na base 2
M	molar
mmHg	milímetros de mercúrio
MALDI	ionização à laser assistida por matriz
MALDI-QTOF	fonte tipo MALDI com dois analisadores híbridos tipo quadrupolo(Q) e tempo de voo (TOF)
MIPS	centro de informação de sequências protéicas de Munique $\mu\text{g}$ – micrograma
MudPIT	Multidimensional Protein Identification Technology
MMcM	meio mínimo Mc Veigh Morton
MS	espectrometria de massas
m/z	razão massa-carga
NaCl	cloreto de sodio
NaOH	hidroxido de sódio
NAD <sup>+</sup>	nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido

NanoUPLC-MS <sup>E</sup>	cromatografia líquida de ultra performance acoplada à espectrometria de massas com método de aquisição alternativo (entre duas energias de colisão)
NBT	nitroazul tetrazólio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	tampão bicarbonato de amônio
NO	óxido nítrico
O <sub>2</sub>	oxigênio
PA	persulfato de amonia
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
pb	pares de bases
<i>Pb</i>	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<i>Pb01</i>	isolado 01 de <i>Paracoccidioides lutzii</i>
<i>Pb03</i>	isolado 03 de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<i>Pb18</i>	isolado 18 de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
PBS	solução de tampão fosfato
PCM	paracoccidioidomicose
PCR	reação em cadeia da polimerase
PFAM	banco de dados de famílias de proteínas
PMF	peptide mass fingerprinting (perfil de digestão trípica)
Pmp1	proteína da matriz peroxissomal
<i>pI</i>	ponto isoelétrico
p/v	peso por volume
pH	potencial hidrogeniônico
PHB	proteína fosforilase B
PMSF	fenilmetilsulfonilfluoreto
ppm	partes por milhão
PS2	espécie filogenética 2
PS3	espécie filogenética 3
Q	quadrupolo
q.s.p	quantidade suficiente para
RNA	ácido ribonucléico

ROS	espécies reativas de oxigênio
rpm	rotações por minuto
RT-PCR	reação em cadeia da polimerase precedida por transcrição reversa
SOD	superóxido dismutase
SDS	dodecil sulfato de sódio ao elemento responsivo esteroi
SDS-PAGE	gel de poliacrilamida em condições desnaturantes
TIFF	Tag Image File Format
TBS-T	solução salina tamponada com TRIS
TCA	ciclo do ácido tricarbóxico
TFA	ácido trifluoracético
TRIS	tris(hidroxiometil) aminometano
TOF	tempo de vôo
UV	ultravioleta
v/v	volume por volume

## RESUMO

*Paracoccidioides spp.* é um fungo termodimórfico, agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM). Durante o processo de infecção *Paracoccidioides spp.* encontra ambientes com diferentes disponibilidades de micronutrientes essenciais como cobre, por exemplo. A obtenção de micronutrientes no hospedeiro é mecanismo crucial de estratégia adaptativa deste patógeno. Neste sentido, a identificação de proteínas relacionadas com captação/homeostase de metais traços, durante a infecção é importante para se obter um melhor entendimento dos mecanismos que compõem a resposta adaptativa do fungo. No presente estudo a técnica de eletroforese bidimensional (2-DE) e Nano-ESI-UPLC-MS<sup>E</sup> foi utilizada como ferramenta proteômica a fim de investigar o perfil de expressão de proteínas da forma de levedura de *P. lutzii* após 24 e 48h de privação de cobre. Foram identificadas 68 proteínas/isoformas por eletroforese 2-DE, sendo 42 com expressão aumentada e 26 com expressão diminuída em condições de depleção de cobre. Através do Nano-ESI-UPLC-MS<sup>E</sup> um total de 366 proteínas foram identificadas, sendo 232 induzidas e 134 reprimidas. As proteínas de *P. lutzii* que se apresentaram diferencialmente reguladas estão envolvidas em processos celulares que incluem metabolismo, energia, síntese de proteínas, defesa e virulência. As proteínas envolvidas no metabolismo de aminoácidos e que apresentaram expressão aumentada, são aquelas relacionadas à degradação de aminoácidos. Estas proteínas provavelmente foram induzidas para proporcionar precursores ao ciclo do ácido tricarboxílico (TCA). O aumento da expressão de enzimas da via glicolítica também foi observado. Isto provavelmente ocorreu como forma de gerar ATP e intermediários metabólicos necessários para a manutenção do fungo sob condições de privação de cobre. Os dados gerados evidenciaram ainda uma indução em enzimas da via glicolítica, ciclo do TCA, via das pentoses fosfato, ciclo do metilcitrato e metabolismo dos lipídeos. Em condições de privação de cobre o metabolismo aeróbio é favorecido, o que provavelmente justifica o aumento da expressão de enzimas destas vias. Em conclusão, os dados do presente estudo indicam que a remodelação metabólica observada em condições de privação de cobre possivelmente é um mecanismo de sobrevivência do patógeno no ambiente hostil do hospedeiro.

Palavras Chaves: *Paracoccidioides*, Privação de cobre, Análise proteômica.

## ABSTRACT

*Paracoccidioides spp.* is a thermomorphous fungus, etiological agent of paracoccidioidomycosis (PCM). During the infection process, *Paracoccidioides spp.* faces environments with different availability of essential micronutrients such as copper, for example. The micronutrient obtainment in the host is a crucial mechanism of adaptive strategy for this host. Hence, the identification of proteins related to uptake/homeostasis of trace metals during infection is important for a better understanding of the mechanisms that make up the fungus adaptive response. In the present study, the bidimensional electrophoresis (2-DE) and Nano-ESI-UPLC-MS<sup>E</sup> were used as proteomic tools in order to investigate the protein expression profile of *P. lutzii* in yeast form after 24 and 48h of copper deprivation. 68 proteins/isoforms were identified by 2-D analysis, which 42 were upregulated and 26 down regulated in copper depletion conditions. Through Nano-ESI-UPLC-MS<sup>E</sup> technique, 366 proteins were identified, 232 of them were induced and 134 repressed. *P. lutzii* proteins differentially regulated are involved in cellular processes including metabolism, energy, protein synthesis, defense and virulence. Proteins involved in the amino acid metabolism and showed an increased expression are related to amino acid degradation. These proteins were probably induced to provide precursors for tricarboxylic acid cycle (TAC). The increased expression of glycolytic pathway enzymes was observed. This probably happened as a way to generate ATP and metabolic intermediaries necessary for up keeping the fungus under copper deprivation conditions. The generated data pointed the induction of glycolytic pathway, tricarboxylic acid pathway, pentose phosphate pathway, methyl citrate pathway and lipid metabolism enzymes. The copper deprivation conditions favors the aerobic metabolism, which probably explains the increased expression of enzymes from the cited pathways. In conclusion, the presenting data indicate that the metabolic remodeling observed under copper deprivation conditions is possibly a survival mechanism of the pathogen under the host hostile environment.

Key words: *Paracoccidioides*, copper deprivation, proteomic analysis.

# 1.INTRODUÇÃO

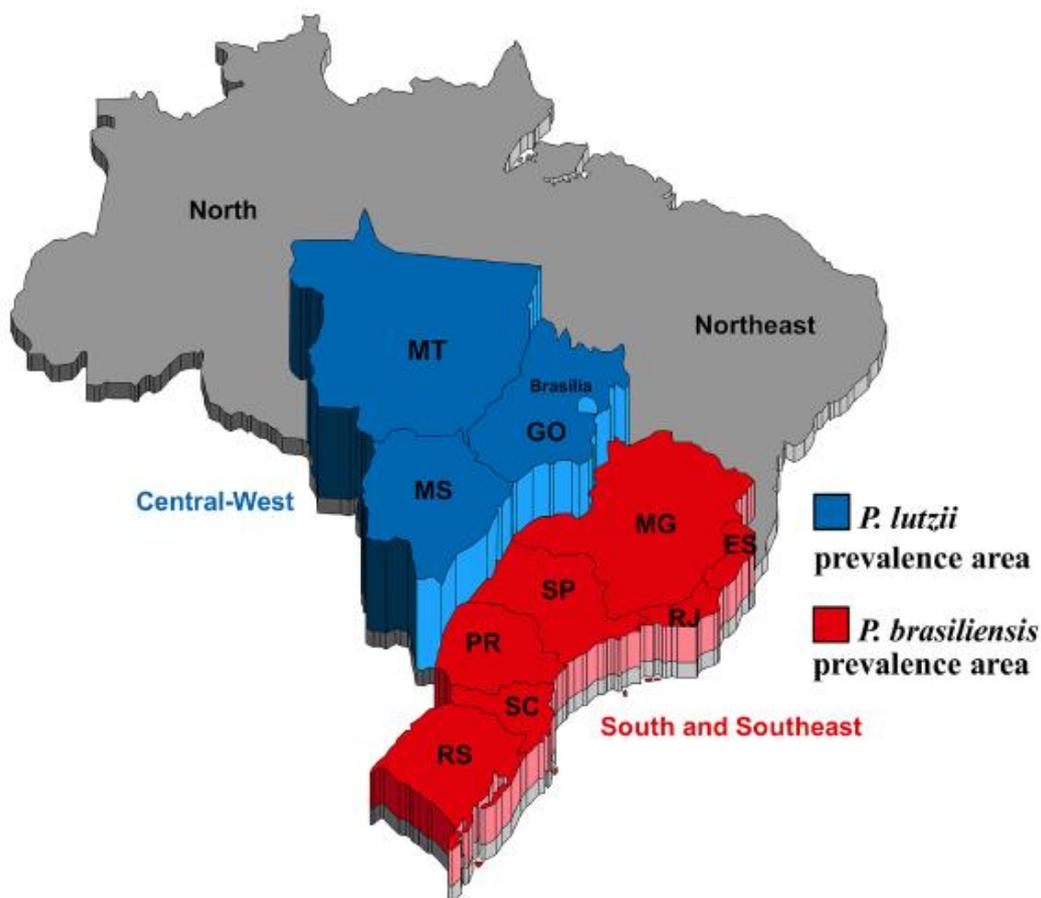
## 1.1 FUNGO PATOGÊNICO *PARACOCIDIROIDES SPP.*

As infecções fúngicas vêm despertando atenção crescente da comunidade científica, devido à grande ineficiência no tratamento das micoses sistêmicas, a forma mais grave destas infecções. No Brasil, as mortes causadas por micoses sistêmicas como paracoccidioidomicose (PCM), criptococose, histoplasmose, candidíase, aspergilose, coccidioidomicose e zigomicose atingiram um número de 3.583 entre 1996-2006 (Prado *et al*, 2009).

*Paracoccidioides spp.*, inicialmente descrito por Adolfo Lutz em 1908 (Lutz, 1908), é o agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), micose sistêmica humana geograficamente distribuída na América Latina (Franco 1987). *Paracoccidioides spp.* representa fungos termodimórficos, capazes de crescer na forma leveduriforme nos tecidos do hospedeiro ou quando cultivado à 37°C, e na forma miceliana em condições saprobióticas ou quando cultivado à temperatura ambiente (18- 23°C) (Bagagli *et al*, 2006; Restrepo, 1985). Sua forma leveduriforme apresenta-se por brotamentos múltiplos evaginados da célula-mãe; neste caso, a célula central é circundada por várias células periféricas. A forma miceliana é caracterizada por filamentos septados com conídios terminais ou intercalares (Restrepo-Moreno, 2003; Queiroz-Telles ,1994).

*Paracoccidioides spp.* foi considerado a única espécie de seu gênero até se propor a existência de três espécies filogenéticas: S1 (espécie 1 com 38 isolados), PS2 (espécie filogenética 2, com 6 isolados) e PS3 (espécie filogenética 3, com 21 isolados). PS3 é um grupo geograficamente restrito a Colômbia; PS2 encontrado predominantemente no Brasil, nos Estados de São Paulo e Minas Gerais e também na Venezuela; S1 está distribuída no Brasil, Argentina, Paraguai, Peru e Venezuela (Matute *et al*, 2006). Análises das relações filogenéticas entre 21 isolados de *Paracoccidioides spp.* possibilitaram a identificação de três grupos filogenéticos já descritos, com exceção do isolado *Pb01* que se apresentou divergente dos outros grupos, sugerindo-se a possibilidade de uma nova espécie no gênero *Paracoccidioides* (Carrero *et al*, 2008). Em 2009, Teixeira e colaboradores avaliaram a concordância genealógica entre 122 isolados de *Paracoccidioides spp.* Estes autores observaram que a divergência não se aplicava somente ao isolado *Pb01*, mas também a outros 16 isolados que foram agrupados em um quarto grupo filogenético, o qual foi denominado “Pb01-like”. Estes autores também sugeriram uma nova especiação filogenética para este

grupo e propuseram a nomenclatura de *Paracoccidioides lutzii*, em homenagem a Adolfo Lutz (Teixeira *et al*, 2009). Considera-se que *P. lutzii* seja endêmico da região Centro-Oeste brasileira, mais especificamente dos Estados de Goiás e Mato Grosso (Teixeira *et al*, 2009) Figura 1. Porém, isolados provenientes de Rondônia foram recentemente classificados como *P. lutzii* baseado em loci genealógicos (Teixeira *et al*, 2013).



**Figura 1.** Mapa das regiões brasileiras, com destaque para a região Centro - Oeste, onde *P. lutzii* predomina e das regiões Sul e Região Sudeste, onde predomina *P. brasiliensis* (Gegembauer *et al*, 2014).

Ainda não há um consenso se S1, PS2, PS3 são variantes geográficas de uma mesma espécie ou se são espécies distintas (Theodoro *et al*, 2012). Análises filogenéticas, sugerem que S1/PS2/PS3, juntamente com *P. lutzii*, são isolados reprodutivamente na natureza (Matute *et al*, 2006; Teixeira *et al*, 2009). O isolamento reprodutivo ou genético é o primeiro passo na divergência de espécies fúngicas (Taylor *et al*, 2000). Dessa forma, a busca por diferenças entre as espécies do gênero *Paracoccidioides* é crescente, visto que isso pode influenciar no diagnóstico e no tratamento da PCM.

O habitat de *Paracoccidioides* spp. não foi determinado com precisão, apesar de grandes esforços para desvendá-lo. Poucos isolamentos feitos a partir de amostras de solo de diferentes locais como Brasil (Shome & Batista, 1963; Montenegro *et al*, 1996; Silva-Vergara *et al*, 1998), Venezuela (Albornoz, 1971) e Argentina (Negroni, 1966), sustentam a hipótese do solo ser o habitat natural do fungo. A presença deste em amostras de solo e mamíferos selvagens foi confirmada através da técnica de Nested-PCR (Nested polymerase chain reaction), baseada nas regiões ITS-5.8S-ITS2 (Richini-Pereira *et al*, 2008; Theodoro *et al*, 2005). Em adição, amplicons de DNA específicos de *Paracoccidioides* foram detectados em amostras de linfonodos mesentéricos, baço, pulmão, glândulas adrenais e rins de porco-da-india (*Cavia aperea*), no pulmão e fígado de porco-espinho (*Sphiggurus spinosus*), nos pulmões de guaxinin (*Procyon cancrivorus*), assim como em vários órgãos de outras espécies de tatus (*Dasyus septemcinctus*), indicando que, em áreas endêmicas, a infecção pelo fungo em animais selvagens, pode ser comum (Richini-Pereira *et al*, 2008).

Os genomas estruturais de três isolados do gênero *Paracoccidioides* (*Pb01*, *Pb03* e *Pb18*) foram finalizados por meio do projeto denominado “Genômica Comparativa de *Coccidioides* e outros Fungos Dimórficos”. Assim, encontram-se depositados, o genoma completo de três diferentes isolados *Pb01*, *Pb03* e *Pb18* (Broad Institute, <http://www.broad.mit.edu/tools/data/seq.html>). O genoma de *Pb01* é composto de 32,94 Mpb, com um total de 9.132 genes. Este isolado apresenta o genoma maior, tanto em número de bases quanto em quantidade de genes, comparado aos outros dois isolados analisados, que apresentaram genomas do tamanho de 29,06 e 29,95 Mb, com número de genes de 7.875 e 8.741 (dados dos isolados *Pb03* e *Pb18*, respectivamente). Os resultados obtidos, além de auxiliar na compreensão das diferenças existentes entre os isolados proporcionarão a caracterização de genes e suas regiões promotoras, e o desenvolvimento de novas ferramentas biomoleculares e genéticas para a elucidação de aspectos da biologia de *Paracoccidioides*.

Os fungos dimórficos são caracterizados pela mudança de uma fase filamentosa multicelular para uma unicelular, quando infectam os tecidos do hospedeiro. Essa é uma propriedade intrínseca de fungos como *H. capsulatum*, *B. dermatitidis*, *Paracoccidioides*, *C. immitis*, *C. posadassi*, *Sporothrix schenckii* e *Penicillium marneffeii* (Rappleye & Goldman, 2006). A patogenicidade dos mesmos parece estar relacionada ao dimorfismo, pelo fato de linhagens incapazes de transitar morfológicamente não serem virulentas (Maresca & Kobayashi, 2000).

A transição morfológica de *Paracoccidioides* da fase miceliana para a fase de levedura, que se constitui em etapa essencial para o sucesso no estabelecimento da infecção é dependente principalmente da temperatura. (Nemecek *et al*, 2006; Rappleye & Goldman, 2006; San-Blas *et al*, 2002).

O hormônio 17- $\beta$ -estradiol está relacionado ao dimorfismo de *Paracoccidioides* conferindo às mulheres proteção contra a PCM. Estudos tem mostrado que, este hormônio inibe a transição de micélio para levedura de maneira dose-dependente, *in vitro* (Restrepo, 1985) e *in vivo* (Sano *et al*, 1999). Foi descrito que a inibição da transição não é devida somente à presença do hormônio, mas sim, à sua interação com a proteína fúngica denominada EBP (*Estradiol Binding Protein*). Acredita-se que o hormônio feminino 17- $\beta$ -estradiol e a EBP do citoplasma fúngico se ligam e, como resultado desta interação, ocorre o bloqueio da transição da fase infectiva para a fase patogênica de *Paracoccidioides* (Shankar *et al*, 2011). O tipo de resposta imunológica desencadeada por cada gênero sexual, está relacionada à proteção de PCM. Ao comparar a resposta imunológica de camundongos machos e fêmeas, infectados com leveduras de *Paracoccidioides* verificou-se uma notável influência sobre o estabelecimento da PCM experimental sendo este fato atribuído, pelo menos em parte, aos hormônios sexuais que interferem na resposta imune desencadeada nos animais. Observou-se também que a paracoccidioidina, um antígeno fúngico, ativa mais as células imunes inatas de fêmeas fazendo com que estas sejam mais resistentes à infecção por *Paracoccidioides* (Pinzan *et al*, 2010). Os resultados confirmam que as mulheres são mais resistentes à PCM porque elas possuem o hormônio 17- $\beta$ -estradiol apresentando possivelmente uma resposta imunológica mais eficaz contra *Paracoccidioides*, motivo pelo qual o acometimento da PCM é predominante em indivíduos do sexo masculino.

Análises transcricionais e proteômicas têm ajudado na compreensão do dimorfismo de *Paracoccidioides* por elucidarem os processos metabólicos regulados pelo fungo durante a transição. Bibliotecas de cDNA das fases de levedura e micélio foram construídas e o transcriptoma de *Paracoccidioides* abrangeu aproximadamente 6.022 genes que representam cerca de 80% do número total estimado para o microrganismo. Os estudos comparativos entre micélio e levedura identificaram um perfil metabólico diferencial exibido nas fases de *Paracoccidioides*. Além disso, nesse transcriptoma identificou-se 48 transcritos de proteínas de resposta a estresse, chamadas de HSPs, sendo que o número destes transcritos foi 38% maior na biblioteca de levedura do que na biblioteca de micélio. Estas proteínas estão

envolvidas em processos como transição dimórfica e imunopatogenicidade do fungo além de algumas com grande potencial para alvos antifúngicos por não possuírem nenhum homólogo no genoma humano como, por exemplo, quitina deacetilase, isocitrato liase e  $\alpha$ -1,3-glicana sintase (Felipe *et al*, 2005). Goldman e colaboradores (2003) identificaram 4.692 sequências transcritas do isolado *Pb18* que foram funcionalmente categorizadas de acordo com a similaridade com genes já conhecidos.

A análise transcricional durante a transição da fase miceliana para leveduriforme de *Paracoccidioides lutzii*, revelou que vários transcritos potencialmente relacionados com a síntese de membrana e parede celulares mostraram-se aumentados durante a diferenciação celular de micélio para a forma leveduriforme, sugerindo que o fungo favorece o remodelamento da membrana e da parede celular nos estágios iniciais da morfogênese. A detecção de genes envolvidos em vias metabólicas como a do glioxilato e transdução de sinal, sugeriram que tais processos são importantes na adaptação do fungo ao ambiente hostil do hospedeiro, durante a transição dimórfica (Bastos *et al*, 2007).

Em relação às análises proteômicas alterações metabólicas são observadas durante as fases de micélio, transição e levedura de *Paracoccidioides lutzii*. Os resultados sugerem que o metabolismo da fase miceliana é mais aeróbico do que a leveduriforme e que o metabolismo de carboidratos, aminoácidos, nitrogênio e da via do glioxilato foram modulados durante a transição. O estudo evidenciou mudanças metabólicas durante o dimorfismo proporcionando mais informações a respeito desta transição dimórfica importante para o estabelecimento da paracoccidioidomicose (Rezende *et al*, 2011).

## **1.2 Paracoccidioidomicose – PCM**

Em 1971, instituiu-se o termo paracoccidioidomicose (PCM) na reunião de micologistas das Américas em Medellin, o qual persiste, até hoje, como nomenclatura oficial (Valle & Costa, 2001). A principal rota de infecção ocorre pela inalação de conídios produzidos pela forma miceliana do fungo, que ao atingirem os pulmões podem transformar-se em células leveduriformes.

A PCM pode afetar qualquer órgão, após disseminação, em particular, a pele, nódulos linfáticos, pulmões, membranas das mucosas oral, nasal e gastrointestinal, e também o sistema nervoso central (Ramos-e-Silva, 2004; De Almeida, 2005). Apresenta-se como uma

doença predominantemente crônica granulomatosa, sendo esta a lesão resultante da reação de hipersensibilidade tardia (DTH) contra antígenos do fungo o que impede a disseminação deste pelo organismo promovendo sua contenção (Romani, 1997). Macrófago é a principal célula presente nos granulomas, com função de liberar substâncias microbidas (radicais superóxidos, óxido nítrico e peróxido de hidrogênio), além da presença de plasmócitos, eosinófilos e fibroblastos (De Brito & Franco, 1994).

A PCM apresenta duas formas clínicas principais: forma aguda ou subaguda (juvenil) e forma crônica (adulta). A forma aguda representa 3 a 5% dos casos descritos, sendo a maioria dos pacientes constituídos por crianças, adolescentes ou adultos jovens. É a forma clínica menos frequente e o período de incubação é de semanas até meses (Barrozo *et al*, 2009). A doença caracteriza-se por um desenvolvimento rápido e por marcante envolvimento de órgãos como baço, fígado, gânglios linfáticos e medula óssea. Apesar de não haver manifestações clínicas ou radiológicas de comprometimento pulmonar, pode-se isolar o fungo do lavado brônquico, evidenciando a participação do pulmão como porta de entrada, mesmo na ausência de alteração radiológica (Restrepo *et al*, 1984).

A PCM é descrita, principalmente, acometendo a população rural, que apresenta baixo nível sócio-econômico, altas taxas percentuais de subnutrição e alcoolismo crônico (Franco, 1987). Esses indivíduos costumam ser trabalhadores rurais que, por sua atividade, permanecem com mais frequência diretamente em contato com a terra e vegetais (Araújo *et al*, 2002). As lesões em mucosa oral são geralmente precedidas ou acompanhadas por lesões pulmonares (Bisinelli *et al*, 2002; Martinez *et al*, 2004). A infância ou a adolescência são os períodos em que infecção geralmente ocorre, e sua evolução depende da virulência do fungo, da quantidade de conídios inalados (esporos) e da integridade do hospedeiro. Após longo período de latência do fungo em um nódulo fibrótico no pulmão, um desequilíbrio na relação entre hospedeiro e parasita pode ocorrer, e o paciente, então, evolui para os sinais e sintomas da doença. Sendo assim, apesar de o contato inicial do homem com o fungo e a infecção ocorrerem, muitas vezes, na infância, as manifestações clínicas da PCM, em geral, são vistas em pacientes adultos (Bisinelli *et al*, 2002).

As micoses sistêmicas estão em décimo lugar entre as doenças parasitárias e infecciosas que causam mais mortes no Brasil. Dados isolados mostraram que a paracoccidiodomicose é a principal doença em causar mortes entre as micoses sistêmicas seguida pela criptococose, candidíase e histoplasmose, representando um importante problema de saúde pública. Os

Estados da região Sudeste e Sul tiveram as maiores taxas de mortalidade, sendo as mais concentradas em São Paulo e Paraná (Prado *et al*, 2009). A paracoccidiodomicose foi fatal até o ano de 1940 quando sulfonamidas foram utilizadas no tratamento. O tratamento com anfotericina B iniciou-se em 1958 e a primeira geração de azóis foi usada com sucesso na terapia em 1980 (Lacaz, 1994).

Os testes sorológicos revelam a existência do micro-organismo antes mesmo dos exames de cultura e histopatológico, e são de amplo uso na confirmação da doença (Blotta *et al*, 1999). A glicoproteína de peso molecular 43 kDa (GP43) é um antígeno exocelular secretado durante a fase de infecção pelo *Paracoccidioides* (Marques *et al*, 2003). A detecção de anticorpos da classe IgM e IgA e a determinação sequencial desses anticorpos para a GP43 pode ser uma ferramenta útil no sorodiagnóstico e avaliação da eficácia do tratamento (Mendes-Giannini *et al*, 1990).

Na PCM é frequente a ocorrência de distúrbios imunorregulatórios, manifestando-se com graus variados, exibindo depressão da imunidade mediada por células, ativação deficiente de leucócitos polimorfonucleares e macrófagos, ativação policlonal de linfócitos B e títulos elevados de anticorpos da classe IgG. (Alcântara, 2002; Calich *et al*, 2008).

Os mecanismos envolvidos na imunodepressão da PCM permanecem ainda não totalmente esclarecidos. Como fatores envolvidos, podem ser citados: a atuação de imunocomplexos circulantes, geração de células T supressoras, redução de linfócitos T CD4+, efeito supressor de substâncias derivadas do fungo, níveis alterados de citocinas, e presença de fatores inibidores séricos (Musatti *et al*, 1976; Franco, 1987; Mota *et al*, 1988; Jimenez-Finkel; Murphy, 1988; Bava *et al*, 1991, Alcântara, 2002, Calich *et al*, 2008).

Com base nos diferentes padrões de citocinas produzidas, os linfócitos TCD4+ podem ser agrupados em diferentes subtipos: células T auxiliares tipo 1 (Th1) produzem predominantemente IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\beta$  e, células Th2 sintetizam IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13. Os fenótipos Th1 e Th2 parecem representar estágios finais na maturação de linfócitos T auxiliares, com estágio precursor denominado de Th0, no qual são produzidas IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 e IFN- $\gamma$  (Mosmann; Coffman, 1989; Clerici & Sherer, 1992, Cox & Liew, 1993, Calich *et al*, 2008).

A imunorregulação na PCM está associada a padrões de resposta imune regulada por células T *Helper* do Tipo Th1, Th2 e células T regulatórias CD4+ CD25+ (Treg) (Fortes *et al*, 2011). Já é conhecido que indivíduos saudáveis que entram em contato com o

*Paracoccidioides* podem resolver a infecção no local do inóculo a partir de uma eficiente resposta imune inata e do desenvolvimento do padrão de resposta Th1, com formação de granulomas organizados (Benard, 2008).

Na PCM, as formas clínicas ocorrem pela incapacidade de desenvolvimento de resposta efetiva Th1, levando à formação deficiente de granulomas organizados. Nesses casos, poderá ocorrer o desvio para outros padrões de respostas imunológicas, como a Th2, resultando em uma ineficiente ação imunológica capaz de conter a propagação da infecção (Pagliari & Sotto, 2003).

Células T regulatórias com fenótipo CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> (Treg) são importantes no controle da resposta imune. A ausência destas células está associada à exacerbação da resposta inflamatória e, conseqüentemente, ao desenvolvimento de doenças autoimunes. Por outro lado, a ativação excessiva pode estar associada à susceptibilidade, aos patógenos (Ferreira *et al*, 2010). Pacientes com PCM crônica apresentam níveis elevados de células com fenótipo característico de células Tregs (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>), tanto no sangue periférico quanto nas lesões, sugerindo que estas células possam controlar a resposta imune local e sistêmica (Ferreira *et al*, 2010).

Várias células desempenham papel central na resistência ao *Paracoccidioides*, dentre elas se destacam as células NK, neutrófilos, monócitos e macrófagos. A participação destas células na reação inflamatória e na atividade fungicida são induzidas pelo fungo e por citocinas produzidas pelas células durante sua interação com os fagócitos (Pagliari *et al*, 2010).

Pagliari *et al*, (2011) e Paião (2012), demonstraram o papel da IL-17 e de citocinas relacionadas às células Th17 na PCM, onde foi observado que as amostras analisadas exibiam grande número de células produtoras dessa citocina. Em lesões orais de PCM, as células mononucleares expressam IL-7 frequentemente nas paredes dos vasos, contribuindo para a lesão tecidual e induzindo a elevada expressão de moléculas de adesão (Pagliari *et al*, 2011).

A resposta Th17 parece ser importante para a contenção da PCM, uma vez que predomina nas formas mais brandas e localizadas, exercendo um papel semelhante àquele observado em outras infecções fúngicas, induzindo uma resposta inflamatória local e ativando células do sistema imunológico inato (Conti *et al*, 2009; Gaffen, 2008). Apesar de ser importante para a resposta imunológica contra o *Paracoccidioides*, induzindo uma resposta inflamatória local e ativando células do sistema imunológico inato, a IL-17 por outro lado,

pode apresentar um papel deletério, gerando uma resposta inflamatória intensa que estaria envolvida na destruição tecidual, principalmente na forma crônica da doença (Paião, 2012).

### 1.3 O Micronutriente Cobre

Metais de transição são essenciais para a sobrevivência de todos os organismos vivos, sendo ferro, zinco, cobre e manganês de extrema importância por serem necessários para a função de diversas proteínas e enzimas (Mayer *et al*, 2013).

Cerca de 30% de todas as proteínas interagem com um metal como cofator, portanto estes elementos possuem grande relevância para a fisiologia celular (Kehl-Fie & Skaar, 2010)

Um dos aspectos estudados do cobre é a sua presença em proteínas que são importantes para a aquisição de ferro pelas células. As proteínas dependentes de cobre além de auxiliar na absorção de ferro pelas células, participam da biogênese de diversas outras proteínas envolvidas no metabolismo celular. (Kornitzer, 2009; Jung & Kronstad, 2009; Rutherford & Bird, 2004).

O cobre é utilizado como cofator catalítico e estrutural para muitos processos bioquímicos (Banci *et al*, 2010). Esse elemento atua em uma ampla variedade de metaloenzimas, incluindo a superóxido dismutase (defesa antioxidante) e a citocromo *c* oxidase (cadeia de transporte de elétrons). Também está envolvido na aquisição e no transporte de ferro, em eventos de transdução de sinal, no transporte e ativação de oxigênio e na geração de ATP via respiração oxidativa. Devido à sua habilidade catalítica, se há excesso de cobre livre na célula, o mesmo reage com o oxigênio gerando espécies reativas de oxigênio, causando danos a ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas (Laloti *et al*, 2009). Portanto, a homeostase desse metal é cautelosamente controlada e, acredita-se que não exista cobre livre no interior celular (Rae *et al*. 1999), embora quantidades extremamente baixas de cobre livre tenham sido confirmadas em células de leveduras (Wegner *et al*, 2010).

Através da doação ou aceitação de um elétron, o cobre pode ser alterado da forma oxidada cúprica ( $\text{Cu}^{+2}$ ) para a forma reduzida cuprosa ( $\text{Cu}^{+}$ ). Em eucariotos, o  $\text{Cu}^{+}$  entra na célula por duas vias: transportadores de alta afinidade presentes na membrana plasmática ou por permeases de baixa afinidade (Nose *et al*, 2006). No interior celular, o  $\text{Cu}^{+}$  é ligado a proteínas chamadas de chaperonas de cobre (Pufahl *et al*, 1997), que o transportam à enzimas citosólicas ou a transportadores de membrana que irão liberá-lo no interior de organelas

específicas para a utilização por enzimas dependentes de cobre (Huffman & O'Halloran, 2001; Linz & Lutsenko, 2007). De uma maneira geral, os eucariotos necessitam que o cobre esteja no meio intracelular, para a maturação das enzimas dependentes desse metal, conforme descrito anteriormente. Em contraste, algumas bactérias utilizam o cobre fora do citoplasma. Por exemplo, bactérias gram-positivas possuem enzimas dependentes de cobre localizadas na membrana plasmática e que emergem para o espaço extracelular, ou são secretadas (Solioz *et al*, 2010). Já nas gram-negativas, todas as enzimas dependentes de cobre descritas até o momento, encontram-se no periplasma e são solúveis ou incorporadas na membrana interna (Banci *et al*, 2010). O mesmo ocorre com as cianobactérias, as quais utilizam cobre intracelular.

Toxicidade do cobre também resulta da elevada afinidade que o Cu (I) e Cu (II) apresentam para uma série de sítios de proteínas, como cisteína, metionina e de histidina com potenciais ligantes, resultando no deslocamento de íons metálicos a partir de seus sítios ativos, bem como no enovelamento incorreto de proteínas. No entanto, as novas proteínas produzidas pelos ribossomos precisam adquirir o íon cobre em quantidades de maneira eficiente e rápida (O'Halloran *et al*, 2000; Rae *et al*, 1999). É por meio dos processos de reconhecimento de proteína-proteína que a entrega correta de enzimas Cu-dependentes e a subsequente remoção dos tecidos é assegurada para evitar a toxicidade. Vários sistemas altamente sofisticados de transporte celular de cobre foram descobertos nas células eucarióticas e procarióticas (O'Halloran *et al*, 2000; Kim *et al*, 2008).

Em *Chlamydomonas* sp. a absorção é regulada em resposta à disponibilidade de cobre (Hill *et al*, 1996). Esta alta afinidade no sistema de captação é mais ativo em células que são adaptadas para a deficiência de cobre do que em células cultivadas em condições de presença de cobre (Hill *et al*, 1996). *Chlamydomonas* sp. em deficiência de cobre é mais sensível a toxicidade induzida pela Ag (I) em relação a células cultivadas em condições de presença de cobre (Howe & Mercante, 1992). Esta observação foi atribuída ao aumento da capacidade de captação de Ag (I) em células na deficiência de cobre que responderam à privação de cobre pelo aumento dos componentes de captação. A identidade do transportador de cobre não é estabelecida, mas quatro proteínas candidatas da família COPT/CTR com seletividade para o Cu (I) (Petris, 2004) são codificadas em *Chlamydomonas* sp.

A atividade de Cu (II) redutase é também aumentada na deficiência de cobre em *Chlamydomonas* sp. (Hill *et al*, 1996). Estes achados apoiam o envolvimento de Cu (II)

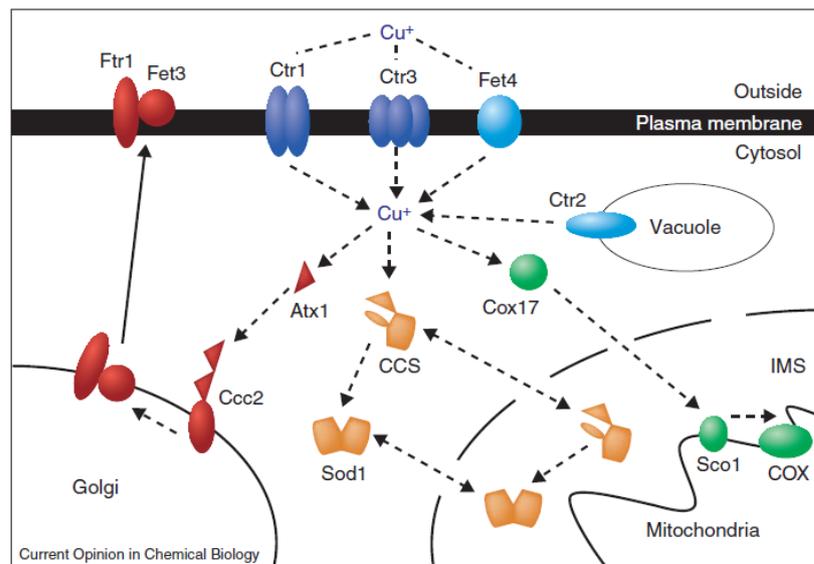
redutase na via de captação de Cu, análogo ao observado para a assimilação de ferro. A identidade do Cu (II) redutase é desconhecido e também não é claro se a redutase é Cu-específica ou é de ampla especificidade dos metais. Estudos bioquímicos têm mostrado, no entanto, que a atividade de Cu (II) redutase também é induzida sob deficiência de ferro (Weger, 1999) e a captação Fe (II) é inibida pelo excesso de Cu (II) (Eckhardt & Buckhout, 1998), sugerindo que a mesma enzima pode ser responsável pela atividade redutase de ambos Cu (II) e Fe (III). Em resumo, a via de captação de Cu em *Chlamydomonas* sp é definida por um transportador da superfície celular Cu (II) e Cu (I) redutase, de forma semelhante à rota de assimilação de cobre em outros eucariotos (Hassett & Kosman, 1995; Rees & Thiele, 2004).

Semelhante ao micronutriente ferro, o cobre é descrito por atuar, positiva ou negativamente, na virulência de algumas bactérias, fungos e vírus. Em *Mycobacterium tuberculosis*, por exemplo, a resistência ao cobre é essencial para o sucesso da infecção (Wolschendorf *et al*, 2011). Para o fungo patógeno de plantas *Botrytis cinerea*, o cobre é fundamental para sua virulência, visto que mutantes defeituosos na expressão de uma proteína transportadora de cobre (ATPase BcCcc2) foram avirulentos em modelo de infecção de folhas de tomate (Saitoh *et al*, 2010). Já para o patógeno humano *C. neoformans*, o cobre está envolvido na expressão de fatores ligados a virulência dessa espécie, tais como a produção de melanina e a formação da cápsula polissacarídica (Waterman *et al*, 2007; Jiang *et al*, 2009; Chun & Madhani, 2010). Esses e outros estudos demonstram a importância da elucidação dos papéis relacionados à utilização e homeostase desse micronutriente.

#### **1.4 Homeostase do Cobre**

*Saccharomyces cerevisiae* tem sido usado como modelo eucariótico para os estudos dos mecanismos de regulação do transporte dos micronutrientes cobre, ferro e zinco. Estudos têm demonstrado que a captação de metais é mediada por dois sistemas de transportes específicos. Um sistema de alta afinidade é ativo em condições limitantes dos respectivos metais, o qual é regulado por fatores transcricionais metais responsivos, que aumentam a expressão dos genes de transportadores quando as quantidades dos respectivos metais são limitadas. Um sistema de baixa afinidade ocorre e continua ativo, desempenhando sua função para manutenção da célula, mesmo quando a quantidade do metal é mais abundante (Figura 2)

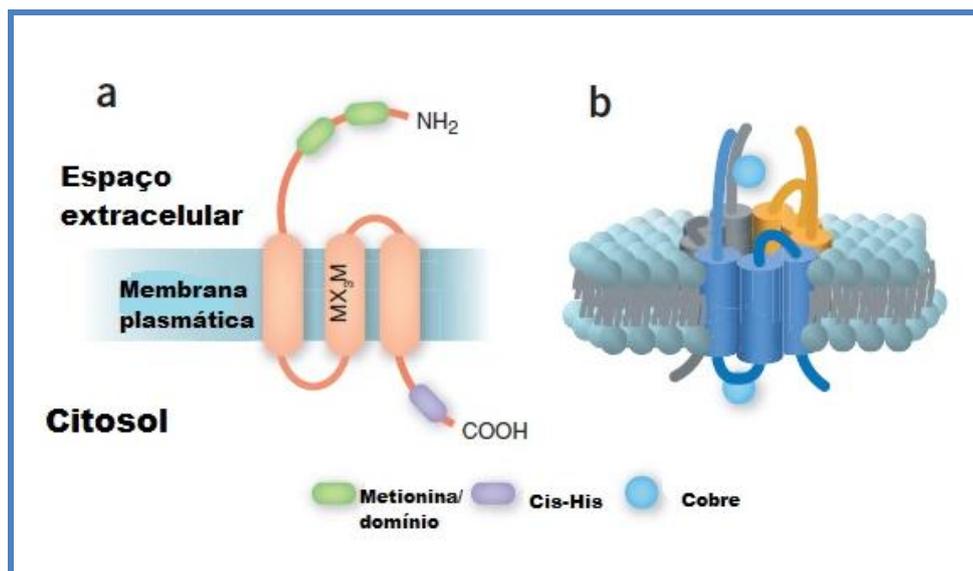
(Puig & Thiele, 2002; Rees & Thiele, 2004). Estudos em *S. cerevisiae* identificaram um grande número de famílias de genes que atuam no transporte de metais, os quais apresentam homólogos que desempenham funções relacionadas nestes processos em mamíferos e vegetais (Van Ho *et al*, 2002). A disponibilidade de cobre, ferro e zinco em tecidos vivos é mantida em níveis baixos o suficiente para restringir o crescimento de agentes patogênicos.



**Figura 2. Homeostase do cobre em *Saccharomyces cerevisiae*.** O modelo mostra homeostase do cobre de *S. cerevisiae*. Este quadro serve para ilustrar a compreensão geral da homeostase do cobre em eucariotos. Dependendo da concentração de cobre extracelular, este é transportado dentro da célula por transportadores de alta afinidade Ctr1 e Ctr3, ou por transportadores de baixa afinidade Cu/Fe Fet4. O Ctr2 pode estar envolvido no efluxo de cobre para o vacúolo. O cobre é distribuído por um mecanismo desconhecido por três diferentes metalochaperonas: Atx1, CCS e Cox17. Entrega de cobre para o compartimento secretório (via mostrada em vermelho) envolve a metalochaperona Atx1 que transporta cobre para Ccc2, uma ATPase tipo-p localizada na rede trans-Golgi, responsável pela translocação de cobre. Uma vez, que o cobre está no lúmen da via secretória ele é carregado para Fet3, uma ferroxidase-multicobre de alta afinidade essencial para a captação de ferro que tem parceria com a subunidade Ftr1. A entrega de cobre para Sod1 é mediada pela chaperona de cobre SOD, CCS ( via mostrada em laranja). Esta proteína contém três diferentes domínios: um domínio I Nt similar ao Atx1, um domínio II central com homologia para Sod1 e um domínio IIO essencial Ct. CCS interage diretamente com Sod1 através de um domínio central e comunica com o domínio III para formar heterodímero. A via de entrega de cobre na mitocôndria é mostrado em verde. A metalochaperona entrega cobre para Sco1 e outras proteínas localizadas na membrana interna da mitocôndria. Em seguida, o cobre é transferido para as subunidades específicas da COX (Puig & Thiele, 2002).

O  $\text{Cu}^{+2}$  é reduzido a  $\text{Cu}^+$  antes de ser absorvido pela célula por metaloredutases (Fre1 e Fre2) presentes na membrana plasmática (Hassett & Kosman, 1995; Van Ho *et al*, 2002). *S. cerevisiae* absorve  $\text{Cu}^+$  por dois mecanismos distintos, um sistema de alta afinidade e, um sistema de baixa afinidade. O sistema de alta afinidade é composto por duas permeases, Ctr1 e Ctr3, as quais são dependentes da ação das metaloredutases de superfície (Pena *et al*, 2000; Kim *et al*, 2008). É sugerido que os transportadores da família CTR possuem três domínios transmembrânicos, sendo que a região amino-terminal extracelular, apresenta duas ou mais regiões ricas em metionina, conhecidas como motivos "Mets". Estas regiões são organizadas como MxxM ou MxM e existem em número variável dentro da região amino-terminal. A porção carboxi-terminal seria intracelular, rica em aminoácidos carregados e apresentando uma região conservada de resíduos de histidina e cisteína. Um motivo MxxM, existe na segunda região transmembrana dos transportadores de cobre CTR1 e CTR3 de leveduras e mamíferos, sugerindo que o mesmo poderia coordenar a entrada de cobre durante transporte intramembranoso. Todas essas características das duas regiões descritas são próprias das proteínas CTR's localizadas na membrana de fungos, vegetais e mamíferos (Figura 3) (Kim *et al*, 2008).

Alguns autores demonstraram que a deleção de Ctr1 resultou em defeitos diretos na absorção de cobre e indiretos na absorção de ferro, associado ao fato que a ferroxidase dependente de cobre, Fet3, é essencial para a absorção de ferro (Van Ho *et al*, 2002; Rees & Thiele 2004). A deleção de Ctr1 e Ctr3 em *S. cerevisiae*, levou a uma privação intracelular do micronutriente cobre (Pena *et al*, 1999; Rees & Thiele 2004) e outro membro da família Ctr, o Ctr2 foi identificado, envolvido no estoque de cobre no vacúolo e ainda na importação deste da membrana plasmática para dentro da célula (Rees & Thiele, 2007). Em situações de privação de cobre, o Ctr2 atua fornecendo cobre do vacúolo para o citoplasma, contribuindo para a homeostase de cobre em *S. cerevisiae* (Rees & Thiele, 2004). Duas outras permeases, Fet4 e Smf1, fazem parte do sistema de baixa afinidade de *S. cerevisiae* (Kim *et al*, 2008).



**Figura 3: Modelo estrutural para os transportadores de cobre de alta afinidade.** (A) - As proteínas CTR's apresentam geralmente aproximadamente 190 resíduos de aminoácidos, possuem dois domínios ricos em metionina (MxxM ou MxM, mostrados em verde) presentes na porção N-terminal extracelular, que tem a função de reforçar a absorção de íons cobre presentes no meio extracelular em condições de baixa concentração de  $\text{Cu}^{+1}$  na célula. Três domínios transmembrana (mostrados em laranja), tem motivo MX2M, que possui função essencial durante o processo de importação do cobre. Um motivo rico em cisteína-histidina (mostrado em roxo), típico das proteínas da família de transportadores de cobre, é presente na região C-terminal intracelular, responsável pela distribuição do cobre para o meio intracelular. (B) – Modelo do transportador de cobre CTR na bicamada lipídica proposto com base em análises de microscopia eletrônica e cristalografia, formando um homotrímero. Cada monômero é representado por uma única cor, com a região N-terminal projetada no exterior da célula captando cobre (demonstrado em esferas azuis). Os fosfolípidios componentes da membrana plasmática foram modelados em azul e cinza. Adaptado de Kim *et al.* 2008.

Uma vez transferido para o meio intracelular, o cobre é transportado para compartimentos secretórios, mitocôndria ou para enzimas citosólicas, através de chaperonas específicas. A ATX1 é uma chaperona citosólica que direciona o cobre para o transportador Ccc2 na face trans do complexo de Golgi. A Ccc2, por sua vez, transloca cobre para dentro das vesículas de onde ele é carregado em um complexo multicobre contendo a proteína ferroxidase Fet3 (Arnesano *et al.*, 2001). Outra chaperona no transporte intracelular é a chaperona de cobre para superóxido dismutase (CCS), que repassa o cobre para a enzima

antioxidante CuZn-superóxido dismutase (SOD1) (Schimidt *et al*, 1999). Algumas proteínas estão envolvidas na transferência de cobre para a mitocôndria, para a montagem do citocromo c oxidase (CcO). A Cox 17 é responsável por liberar o cobre para as proteínas da membrana interna mitocondrial, Cox 11 e ScO1, as quais o transferem para o CcO (Horng *et al*, 2004).

A proteína ATP7A, uma ATPase tipo P localizada primariamente no complexo do Golgi, está envolvida no metabolismo de cobre e é responsável pela exportação de cobre quando as células são expostas a altas concentrações deste metal, também podendo transportar este metal em vesículas ou compartimentos intracelulares (Lutsenko *et al*, 2007; Stafford *et al*, 2013).

Dados na literatura mostram que durante a infecção com espécies de *Mycobacterium*, há um acúmulo de cobre no interior do compartimento fagossomal e que a ativação destes macrófagos com LPS induz a expressão de ATP7A e CTR1 (Wagner *et al*, 2005; White *et al*, 2009). Macrófagos infectados com *E. coli* também demonstraram que o aumento da expressão de ATP7A causou um efeito bactericida (White *et al*, 2009). Durante a infecção por *C. neoformans*, macrófagos ativados mostraram altos níveis de ATP7A e CTR1. Em resposta à infecção, pode haver uma reorientação de cobre no hospedeiro, sendo comprovado pelos altos níveis de cobre encontrados no soro de camundongos após 14 dias de infecção *in vivo* (Ding *et al*, 2013). Este mesmo estudo ainda demonstrou que após dois dias de infecção há uma diminuição dos níveis de ATP7A, enquanto que os níveis de CTR1 permanecem altos após 14 dias de infecção (Ding *et al*, 2013). Estes resultados sugerem que, em resposta à infecção por *C. neoformans*, macrófagos podem mobilizar cobre e redirecioná-lo para a circulação, limitando a concentração de cobre em compartimentos vesiculares (Ding *et al*, 2013).

A ceruloplasmina (CP) é uma proteína oxidase multi-cobre capaz de ligar-se a 6 átomos de cobre e é amplamente encontrada em vertebrados, localizada predominantemente no plasma (Yang *et al*, 1986). Mais de 95% do cobre presente no plasma está ligado à CP, logo esta proteína possui grande importância para a homeostase deste metal (Stafford *et al*, 2013). Além da alta afinidade a cobre, CP também pode atuar como oxidase de ferro, catalizando a oxidação de  $Fe^{+2}$  a  $Fe^{+3}$ , tendo assim importante papel na homeostase de ferro (Osaki e Johnson, 1970). Além disso, vários estímulos pró-inflamatórios, incluindo IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  e lipopolissacarídeo (LPS), induzem a sua síntese (Stafford *et al*, 2013).

Para manter a homeostase de cobre em condições de excesso desse micronutriente, existem as metalotioneínas, as quais são pequenas proteínas ricas em resíduos de cisteínas,

encontradas em todos os eucariotos e alguns procariotos (Banci *et al*, 2010). As metalotioneínas funcionam como moléculas de limpeza de metais pesados, como defensores contra estresse oxidativo e são distribuidores e detoxificadores intracelulares (Palmiter, 1998).

Um estudo recente identificou metalotioneínas em *C. neoformans*, CMT1 e CMT2, que são importantes para a detoxificação de cobre na célula fúngica durante a infecção, foram testadas durante a exposição até 1 mM CuSO<sub>4</sub>, não sendo possível afirmar sua ação em concentrações maiores de cobre (Ding *et al*, 2013).

A regulação em nível transcricional da homeostase de cobre em *S. cerevisiae* está caracterizada em detalhes, tendo sido identificados dois fatores de transcrição responsivos ao cobre. O fator de transcrição Ace1 ativa a expressão gênica em condições de elevados níveis de cobre; já o fator Mac1, ativa a expressão em resposta a deficiência deste (Rutherford & Bird, 2004). Quando *S. cerevisiae* encontra-se em altas concentrações de cobre, Ace1 atua na ativação da expressão dos genes codificadores das metalotioneínas e da SOD1, para proteger a célula contra a toxicidade destes íons (Thiele, 1988; Gralla *et al*, 1991; Cullota *et al*, 1994). Em caso de privação de cobre, Mac1 ativa a expressão dos genes responsáveis pela absorção de cobre, CTR1 e CTR3, e da redutase FRE1 (Labbe *et al*, 1997; Yamaguchi-Iwai *et al*, 1997). Sabe-se também que o fator Mac1 atua na degradação pós-traducional de Ctr1, em condições de excesso deste íon (Yonkovich *et al*, 2002).

Em *S. cerevisiae* e *S. pombe* foi demonstrado que o transporte de cobre está intimamente relacionado à proteína CTR3, visto que mutações realizadas em resíduos de cisteína distribuídos ao longo da cadeia polipeptídica e mais concentrados na região carboxiterminal, inativaram funcionalmente a proteína, ocasionando uma deficiência no nível de cobre no meio intracelular (Beaudoin *et al*, 2006; Beaudoin *et al*, 2007). A substituição de todos os motivos Mets localizados na porção amino-terminal, prejudicou gravemente a captação de cobre através das proteínas CTRs 3, sugerindo que esta região possa servir como ligante do cobre extracelular (Puig *et al*, 2002; Petris, 2004).

Proteínas envolvidas no transporte de cobre intracelular, Ctr2 e Ctr4, foram caracterizadas em *C. neoformans* (Waterman *et al*, 2007; Chun & Madhani, 2010). Linhagens mutantes para o gene *CTR2*, apresentaram produção diminuída do pigmento melanina quando comparados à linhagem selvagem e, geraram uma cápsula polissacarídica menos proeminente do que a produzida pela linhagem selvagem (Chun & Madhani, 2010). Ctr4 é um transportador de cobre ativado pelo fator de transcrição Cuf1. A expressão do gene *CTR4* foi fortemente

aumentada nas células fúngicas recuperadas da fagocitose por macrófagos e durante a infecção em cérebros de ratos, porém não em pulmões de ratos infectados (Waterman *et al*, 2007). Os mesmos resultados de expressão de *CTR4* foram observados em infecções provenientes de cérebro de um indivíduo HIV-positivo (Waterman *et al*, 2007). Um homólogo à chaperona de cobre, Atx1 e ao transportador de cobre Ccc2 também foram identificados em *C. neoformans*, os quais foram descritos por estarem envolvidos na biossíntese de melanina nesse fungo (Walton *et al*, 2005; Silva *et al*, 2011). Esses estudos demonstraram a influência da homeostase de cobre na expressão de fatores ligados à virulência de *C. neoformans*.

*C. neoformans* também é capaz de manter um nível basal de cobre no interior de suas células durante condições de limitação deste metal, devido à importância deste metal para metaloenzimas envolvidas na sua virulência e sobrevivência intracelular durante a infecção, como também pode acumular grandes quantidade de cobre quando este é adicionado ao meio (Raja *et al*, 2013).

A resposta à alteração dos níveis de cobre em *C. neoformans* é controlada em parte pelo fator de transcrição Cuf1. O gene *CUF1* apresenta similaridade de sequência com os fatores de transcrição responsivos a cobre de *S. cerevisiae*, *MAC1* e *ACE1* e com o fator *CUF1* de *S. pombe* (Waterman *et al*, 2007). A deleção desse gene em *C. neoformans* causa um forte defeito no crescimento sob condições de privação de cobre e um decréscimo na atividade da enzima lacase (Waterman *et al*, 2007). Porém, a formação da cápsula e a expressão da urease não foram afetadas (Waterman *et al*, 2007). Outro fator de transcrição envolvido na homeostase de cobre é o ativador transcricional *OXY2*. Foi sugerido que Oxy2 está envolvido na ativação de reductases de ferro/cobre e participa da ativação de transportadores de cobre (Nyhus & Jacobson, 2004). Um repressor transcricional global, Tup1, tem sido implicado na regulação da homeostase de ferro e cobre em *C. neoformans*, sorotipo A (Lee *et al*, 2009). Linhagens *tup1Δ* apresentam uma diminuição na expressão de genes ligados a homeostase de ferro (*FTR1*, *SIT2* e *CIG1*) e Cu (*CTR4*) quando comparado à linhagem selvagem H99 (Waterman *et al*, 2007). Os mutantes também se mostraram sensíveis à baixas concentrações dos metais ferro e cobre, comprovando a influência de Tup1 na homeostase desses metais.

O papel da CuZn superóxido dismutase (SOD1) foi alvo de estudo intensivo. Esta enzima, abundante no fígado, rim e eritrócitos, catalisa a dismutação dos ânions superóxido

(O<sub>2</sub><sup>-</sup>) no citoplasma, os quais são subprodutos da respiração celular. Durante a dismutação, o cobre do centro ativo da SOD1 é reduzido pelo substrato O<sub>2</sub><sup>-</sup> dando origem a dois metabolitos; o oxigênio molecular (O<sub>2</sub>) e o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) proporcionando uma defesa contra radicais livres de oxigênio. Nesta reação o cobre não pode ser substituído por qualquer outro metal, porque apenas este confere atividade catalítica a esta enzima, como anteriormente referido. Isto fundamenta a função antioxidante do cobre (Pedrosa & Cozzolino, 1999).

No sentido de investigar a contribuição da superóxido dismutase (SOD) para a patogênese de infecções fúngicas, (Cox e colaboradores, 2003) codificaram o gene da CuZn SOD (SOD1) do patógeno humano *Cryptococcus neoformans* e fizeram mutantes via rompimento direcionado. As cepas mutantes SOD1 apresentaram diminuição na atividade de SOD e foram notavelmente mais suscetíveis a espécies reativas de oxigênio *in vitro*. O mutante SOD1 foi significativamente menos virulento do que a linhagem selvagem e duas linhagens reconstituídas independentes, em modelo animal. Os estudos *in vitro* estabeleceram que a linhagem SOD1 tinha crescimento atenuado em comparação com o crescimento do tipo selvagem e uma linhagem reconstituída dentro de macrófagos produzindo quantidades reduzidas de óxido nítrico. Estes resultados demonstram que a CuZn SOD contribui para a virulência, não sendo necessária para patogenicidade em *C. neoformans*; a diminuição da virulência da linhagem SOD1 pode ser devido ao aumento da susceptibilidade a radicais de oxigênio no interior de macrófagos; e outros sistemas de defesa antioxidantes em *C. neoformans* pode compensar a perda da CuZn SOD *in vivo*.

As análises de bioinformática de Tristão e colaboradores (2015) mostrou que 26 proteínas que se ligam ao cobre foram encontradas nos genomas de *P. lutzii* e *Pb03*, ao passo que, 25 proteínas foram encontradas nos genomas de *Pb18*. A classificação funcional das proteínas de cobre revelou que o transporte de íons e a síntese de melanina são as categorias funcionais mais expressiva onde encontrou-se 6 transportadores de cobre e 3 lacases. Foram encontradas duas proteínas relacionadas ao stress, a superóxido dismutase que é cobre dependente. Foram também identificadas três amino oxidase contendo domínio de cobre, sugerindo sua atividade catalítica. As análises *in silico*, também, mostrou 5 proteínas hipotéticas presentes nos domínios que se ligam ao cobre.

## 1.5 Proteômica

A análise sistemática em larga escala das proteínas totais de um tecido ou célula foi popularizada sob o termo proteômica (Domon & Aebersold, 2006). Este termo foi introduzido no início dos anos 90 por Wilkins e usado para descrever um conjunto completo de proteínas que são expressas e modificadas seguindo a expressão de todo o genoma de uma célula, tecido ou organismo (Wilkins *et al*, 1996). O objetivo da análise proteômica é obter a mais completa e integrada visão da biologia através do estudo de todas as proteínas da célula, em preferência a estudar proteínas individuais (Graves & Haystead, 2002).

A eletroforese bidimensional (2-DE) é uma das técnicas utilizadas em análises proteômicas, a qual permite separação e visualização de diversas proteínas ao mesmo tempo (Rohner *et al*, 2005). Introduzida por Klose e O' Farrel em 1975, a 2- DE ainda é considerada a técnica mais utilizada para separação de proteínas. Constitui uma ferramenta poderosa para separação de proteínas provenientes de misturas complexas, como células, tecidos e outras amostras biológicas. Tem sido um método crítico para o desenvolvimento dos conhecimentos existentes atualmente sobre a complexidade e variedade de proteínas de células e fluidos biológicos (Adkins *et al*, 2002; Kossowska *et al*, 2009).

Esta técnica permite a separação de proteínas combinando-se primeira dimensão ou focalização isoeétrica e segunda dimensão ou eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE). A focalização isoeétrica é o método que separa proteínas de acordo com seus pontos isoeletricos (pI) , valor específico de pH no qual a carga líquida da proteína é igual a zero. Proteínas apresentam-se positivamente carregadas quando o pH do meio é menor do que o pI e negativamente carregadas quando em pH acima dos valores de pI (GE Healthcare, 2004).

A segunda dimensão consiste em um método eletroforético que separa polipeptídeos de acordo com o peso molecular (*molecular weights*, MW). O SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) é um detergente aniônico que se liga à proteína, formando um complexo negativamente carregado. Uma vez as proteínas submetidas à ação de um agente redutor (por exemplo, ditioneitol - DTT), previamente à formação do complexo, a separação no gel de poliacrilamida dependerá largamente do peso molecular do polipeptídeo. Dessa forma, quanto maior o MW de uma proteína, menor será a distância de migração no gel (GE Healthcare, 2004).

A técnica de 2-DE tem sofrido diversos avanços que possibilitaram melhor resolução e reprodutibilidade dos géis (Liebol *et al*, 2006). A utilização de corantes fluorescentes neste tipo de método tem crescido bastante após o desenvolvimento da técnica de eletroforese bidimensional diferencial (*Two-dimensional differential gel electrophoresis* – 2D DIGE). Esta aplicação inovadora da 2-DE permite o processamento e comparação de três amostras em um único gel através da marcação das proteínas com três diferentes fluoróforos (Cy2, Cy3 e Cy5), aumentando a reprodutibilidade dos experimentos (Chromy *et al*, 2004; Marcus *et al*, 2009).

A análise proteômica pode ser realizada por técnicas que não envolvem a separação em géis, chamadas de *gel-free*. Essa abordagem proteômica, denominada de *shotgun*, se refere à análise direta de misturas complexas, gerando um perfil global das proteínas presentes na mistura. Essa abordagem tem sido facilitada pelo uso da técnica *Multidimensional Protein Identification Technology* (MudPIT), no qual proteínas são separadas em duas dimensões por uma cromatografia de troca catiônica e uma de troca reversa, seguida por HPLC e espectrometria de massas *in tandem* (MS/MS). Para isso, as amostras são digeridas por uma enzima (p.ex. tripsina) e submetidas à análise por espectrometria de massas e busca em banco de dados. Por não exigir um conhecimento prévio da composição da amostra, esse método tem sido muito utilizado em experimentos que buscam descobrir o perfil de proteínas expressas em um organismo, ou tecido, sob uma determinada condição (Domon & Aebersold, 2010).

O acoplamento de cromatografia líquida com espectrometria de massa, como em procedimentos NanoUPLC-MS<sup>E</sup>, fornece mais capacidade de eficiência das análises de amostras complexas do que outras técnicas. Amostras complexas são transferidas individualmente para um frasco de recuperação total, e todos os processos associados com a cromatografia, MS e aquisição de MS / MS e pesquisa de banco de dados são realizados em poucos passos. Essas experiências levaram a inovações significativas, como a capacidade de obter informação linear da sequência estrutural ao nível de femtomol, pequenas áreas de superfície e perdas mínimas de volumes, que minimiza as perdas de analito devido à adsorção de superfície, bem como baixas taxas de fluxo, que minimizam a diluição do analito. Os analitos com baixa abundância podem ser separados com uma alta taxa de cobertura quando eles estão associados com uma elevada dinâmica de qualidade e um sistema de detecção MS de alta qualidade (Murad & Rech, 2012).

A proteômica em fungos patogênicos humanos tem contribuído para um melhor conhecimento dos processos envolvidos na morfogênese, virulência, resposta ao hospedeiro, bem como para o desenvolvimento de potenciais alvos antifúngicos e abordagens terapêuticas (Pitarch *et al*, 2003). Marcadores biológicos de um determinado patógeno podem ser identificados e caracterizados por técnicas proteômicas, ajudando no diagnóstico precoce de doenças e no acompanhamento do tratamento (Cash *et al*, 2002).

## 1.6 Análise Proteômica de Fungos Patogênicos Humanos

Apesar dos diversos sequenciamentos dos genomas de fungos, poucos estudos têm sido feitos comparando o perfil proteômico com análises transcricionais. O grande objetivo na biologia dos fungos é entender a expressão, função e regulação das proteínas codificadas pelo genoma (Bhadoria *et al*, 2007). Os primeiros trabalhos pós-genômicos foram com estudos de proteína do envelope em *Trichoderma reesei* (Lim *et al*, 2001) e de proteínas ancoradas à GPI (glicosilfosfatidilinositol) em *Aspergillus fumigatus* (Bruneau *et al*, 2001). Desde então, diversos trabalhos em proteomas têm sido publicados.

No sentido de esclarecer as proteínas do fungo *A. fumigatus* induzidas durante a aspergilose invasiva, Asif e colaboradores (2010) utilizaram extratos de proteínas de conídios e inocularam em animais. Após a infecção o soro desses animais foi então utilizado como anticorpo primário para identificar antígenos de *A. fumigatus*. Foram identificadas proteínas relacionadas à via glicolítica e ao estresse oxidativo, bem como proteínas associadas à parede celular. Comparando o perfil de proteínas intracelulares entre conídios e micélio de *A. fumigatus*, Teutschbein e colaboradores (2010) identificaram 57 proteínas mais expressas em conídio envolvidas na eliminação de espécies reativas de oxigênio (EROs), biossíntese de pigmentos e morfologia celular.

Monteoliva e colaboradores (2010) utilizando a técnica 2D-DIGE detectaram proteínas citoplasmáticas de diferentes vias metabólicas envolvidas no estabelecimento e na manutenção de cada morfologia celular *C. albicans*. Hsp90, foi descrita como uma proteína abundante nas hifas que orchestra a morfogênese em *C. albicans* sob condições de mudança de temperatura (Shapiro *et al*, 2009).

A habilidade de capturar nutrientes do meio é fundamental para o crescimento de fungos patogênicos, assim a redução da disponibilidade de ferro, e outros micronutrientes,

consistem em um mecanismo de defesa do hospedeiro para eliminar patógenos e combater a doença (Doherty, 2007). Neste sentido, os patógenos precisaram desenvolver eficientes sistemas de captura de ferro, para competir com mecanismos de restrição desse micronutriente pelo hospedeiro (Johnson, 2008). Análises proteômicas realizada por Winters e colaboradores (2008) em *Histoplasma capsulatum* em condições de depleção de ferro detectaram 35 proteínas reprimidas, tais como enolase, malato desidrogenase, sacaropina desidrogenase, Hsp70p, asparaginil-tRNA sintetase. Esses resultados sugerem que *H. capsulatum* induz funções metabólicas específicas para competir com alterações no ambiente do hospedeiro. Com o objetivo de analisar a adaptação de *Paracoccidioides* a condições de restrição de ferro, Parente e colaboradores (2011) avaliaram o perfil protéico do fungo em condições de depleção deste íon. Foi identificado aumento da expressão de proteínas relacionadas à via glicolítica e aquisição de ferro. Enzimas do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), ciclo do glioxalato, ciclo do metilcitrato e cadeia transportadora de elétrons foram reprimidas em decorrência da limitação do micronutriente. Essas análises sugerem que em condições de baixa concentração de ferro, *Paracoccidioides* aumentaria a expressão de proteínas relacionadas ao sistema de captura do metal e direcionaria seu metabolismo energético para vias independentes de ferro (Parente *et al*, 2011).

Em análises proteômicas do fungo *Paracoccidioides lutzii* submetido a estresse oxidativo, Grossklaus e colaboradores (2012) demonstraram que houve estimulação das respostas moleculares no sentido de resistir aos danos causados por espécies reativas de oxigênio. Os níveis de NADPH durante o estresse oxidativo foram induzidos indicando que o potencial redutor foi aumentado em resposta ao estresse. As alterações no metabolismo foram observadas por meio da ativação de enzimas da gliconeogênese e da biossíntese de aminoácidos as quais, são utilizadas na composição de moléculas antioxidantes (Grossklaus *et al*, 2012). No entanto, houve repressão de enzimas envolvidas na produção endógena de EROs, como as enzimas da cadeia respiratória e as que participam dos processos de  $\beta$ -oxidação, mostrando que o *P. lutzii* utilizou várias estratégias para combater o estresse oxidativo.

A análise proteômica de *P. lutzii*, realizada por Rezende e colaboradores (2011) demonstraram que na transição de micélio para levedura ocorre aumento na expressão das enzimas álcool desidrogenase, fosfoglicomutase e enolase. Assim como enzimas da via das pentoses fosfato, como transcetolase e transaldolase, sugerindo que a indução da via durante a

transição poderia fornecer substratos para as enzimas da glicólise, que se mostrou induzida na forma de levedura (Rezende *et al*, 2011). O aumento de expressão da enzima álcool desidrogenase, após 22 horas de transição, bem como de uma enzima da via do ácido tricarbóxico, a succinil CoA, sugere que tanto a fermentação quanto a respiração aeróbia estão presentes na fase de levedura (Rezende *et al*, 2011).

No estudo proteômico comparativo de quatro grupos filogenéticos: *Paracoccidioides spp.* S1, PS2, PS3 e *P. lutzii* (Pigosso *et al*, 2013) houve uma indução da  $\beta$ -oxidação em *Pb339*, representante do grupo S1, indicando que a oxidação de ácidos graxos pode ser importante no fornecimento de acetil-CoA para o metabolismo central de carbono deste grupo filogenético. As estratégias metabólicas mais induzidas em *Pb2*, representante de PS2, são a via das pentoses-fosfato e a degradação de aminoácidos, as quais podem alimentar o metabolismo central de carbono do fungo. *PbEpm83*, representante de PS3, parece utilizar preferencialmente carboidratos para as rotas aeróbicas de produção de energia. *Pb01*, representando *P. lutzii*, parece utilizar um metabolismo mais anaeróbico para a produção de energia a partir de carboidratos. Isso foi proposto a partir da observação da alta produção de enzimas envolvidas com a glicólise, fermentação alcoólica além do alto nível de etanol nesta linhagem (Pigosso *et al*, 2013).

Através de análises transcricional e proteômica Lima e colaboradores (2014) avaliaram as respostas de *P. lutzii* a deprivação de glicose. As análises revelaram que *P. lutzii* muda seu metabolismo em resposta à deprivação de glicose. O fluxo de carbono é centrado na produção de etanol e gliconeogênese pela modulação de outras vias tais como beta-oxidação e ciclos do glioxilato e ácido tricarbóxico. As vias metabólicas alternativas adotadas por *P. lutzii* durante a deprivação de glicose foram elucidadas resultando no melhor entendimento da adaptação e persistência fúngica no ambiente hostil do hospedeiro.

No proteoma de *P. lutzii*, Bailão e colaboradores (2014) demonstraram que na presença de hemoglobina foram induzidas proteínas envolvidas com o metabolismo de aminoácidos, nitrogênio e enxofre. Além disso, as proteínas que estão envolvidas na biossíntese de porfirina foram detectadas apenas quando o fungo foi cultivado na presença de ferro inorgânico. Estes resultados sugerem que o fungo pode usar a hemoglobina como uma eficiente fonte de nitrogênio, enxofre, ferro e porfirina, internalizando toda a molécula de hemoglobina e não somente o ferro.

No trabalho de Silva-Bailão e colaboradores (2014), análises de cromatografia líquida de fase reversa (RP-HPLC) e espectrometria de massas confirmaram a produção de hidroxamatos por *Paracoccidioides* spp. Coprogeno B e ácido dimerúmico foram identificados nos sobrenadantes de cultura enquanto ferricromo C e ferricrocina foram detectados nos extratos celulares do fungo.

Os estudos proteômicos de fungos patogênicos dimórficos vêm crescendo gradativamente, acompanhando o desenvolvimento dos bancos de dados. Orsborn *et al*, (2006) utilizaram a técnica 2D-DIGE (Eletroforese de fluorescência diferencial em gel 2D) acoplada à cromatografia líquida de alta resolução e ao espectrômetro de massas (HPLC-MS/MS) para analisar o perfil de expressão diferencial de *Coccidioides posadasii* nas formas micélio e levedura. Essa técnica levou a identificação da proteína da matriz peroxissomal (Pmp1) a qual, em estudos em modelo de infecção animal, conferiu proteção contra a coccidioidomicose.

Nesse trabalho, utilizamos a técnica de eletroforese bidimensional (2-DE) acoplado à identificação por espectrometria de massa MALDI-QTOF MS e MS/MS e Nano-ESI-UPLC-MS<sup>E</sup> como ferramentas proteômicas para investigar o perfil de proteínas de *P. lutzii* em células leveduriformes após 24 e 48 h de privação de cobre.

## **2. JUSTIFICATIVA**

A disponibilidade de micronutrientes no hospedeiro exerce um papel crucial na relação patógeno-hospedeiro. Como um mecanismo de defesa geral antimicrobiano, mamíferos possuem um elaborado sistema de retenção de micronutrientes que efetivamente reduz o acesso dos microrganismos (Sutak *et al*, 2008). Um exemplo deste mecanismo é o fato que macrófagos ativados diminuem o nível de ferro intracelular, através da redução do nível de receptores para transferrina, o que conseqüentemente causa uma privação deste nutriente para os microrganismos fagocitados (Theurl *et al*, 2005). Portanto, patógenos utilizam mecanismos especializados e efetivos na aquisição de elementos traço, e a disponibilidade destes é frequentemente considerada importante para virulência. Alguns invasores potenciais que possuem defeitos na habilidade de adquirir ferro estabelecem infecção em hospedeiros com altos níveis do metal (Weinberg, 2000). De forma contrária a

patógenos bacterianos, pouco é conhecido sobre a captação e o metabolismo intracelular de metais essenciais em patógenos unicelulares eucarióticos.

Estudos prévios do Laboratório de Biologia Molecular demonstraram que o transportador de cobre de alta afinidade (*PbCTR3*) é uma molécula altamente expressa em condições que mimetizam o processo infectivo. Com o propósito de identificar genes possivelmente envolvidos na adaptação e sobrevivência de *Paracoccidioides spp.* no hospedeiro durante a infecção, Bailão e colaboradores (2006), utilizaram a técnica de Análise de Diferença Representacional de cDNA (cDNA RDA). O objetivo foi identificar genes induzidos durante o processo infectivo e em condições que mimetizam a via hematogênica de disseminação fúngica. Foi observada alta frequência do transcrito *ctr3*, codificando um transportador de cobre de alta afinidade. O transcrito *ctr3* foi identificado como um dos cDNAs mais abundantes em células leveduriformes derivadas de infecção em fígado de camundongos, o que reforça seu possível papel no processo infectivo (Costa *et al*, 2007).

Embora existam patógenos eucariotos unicelulares provenientes de diferentes reinos, como Fungi e Protozoa, estes organismos compartilham várias características considerando-se o metabolismo de micronutrientes: (i) captam nutrientes do ambiente e não os redistribuindo entre células; (ii) a ausência de moléculas clássicas, como a ferritina, para estocagem de micronutrientes; (iii) os micronutrientes são entregues e/ou estocados em várias organelas; e (iv) são patógenos e precisam garantir a captação de micronutrientes em um ambiente hostil com baixos níveis de metais (Sutak *et al*, 2008). Além disso, os patógenos frequentemente ocupam diversos nichos durante seu ciclo de vida, tais como diferentes tecidos e até mesmo diferentes organismos; portanto estes microrganismos requerem múltiplos sistemas de aquisição de metais traços bem como de diversos níveis de disponibilidade destes. Uma vez que a obtenção de micronutrientes em diferentes nichos do hospedeiro é crucial na estratégia adaptativa de *Paracoccidioides* no processo infectivo, a identificação das proteínas relacionadas com a captação/homeostase de metais traços, tornam-se relevantes para um melhor entendimento da relação parasito-hospedeiro e dos mecanismos que compõem a resposta adaptativa do fungo durante a infecção. Portanto, esclarecer as estratégias utilizadas pelo *P. lutzii* durante a privação de cobre pode contribuir para a compreensão dos mecanismos envolvidos no estabelecimento da infecção.

### 3. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é realizar estudos proteômicos do fungo *P. lutzii* em condições limitantes de cobre, visando detectar e avaliar diferenças qualitativas e quantitativas nas proteínas citoplasmáticas da fase leveduriforme.

Em decorrência desse objetivo temos as seguintes estratégias:

- Obtenção dos extratos protéicos e realização dos géis bidimensionais.
- Análises computacionais dos mapas bidimensionais de proteínas capturadas em sistema de fotodocumentação.
- Processamento das imagens capturadas.
- Retirada dos *spots* protéicos de interesse dos géis bidimensionais para digestão com tripsina e posterior obtenção dos espectros de massas.
- Identificação de proteínas diferencialmente expressas por meio da ionização, fragmentação, análise, detecção e produção dos espectros de massas, comparando-os aos bancos de dados de mapas peptídicos para aquelas proteínas candidatas disponibilizadas em bancos de dados.
- Identificação das proteínas citoplasmáticas em condição de depleção de cobre de *P.lutzii* utilizando nano-ESI-UPLC-MS<sup>E</sup>.
- Análise do perfil de expressão diferencial das proteínas de *P.lutzii* nas condições de depleção de cobre e controle, por meio de *Western blot* e RT-PCR em tempo real.
- Propor possíveis estratégias moleculares utilizadas pelo fungo *P. lutzii* em resposta à depleção de cobre.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Isolado e manutenção de *Paracoccidioides***

*Paracoccidioides lutzii* (Pb01) (ATCC, MYA-826) foi utilizado em todos os experimentos citados nesse estudo. A fase leveduriforme do fungo foi mantida *in vitro* por crescimento a 36 °C, em meio Fava-Netto [1% (w/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% (p/v) glicose, 1,2% (p/v) ágar, pH 7,2] por 6 dias (Fava-Neto, 1955). Posteriormente, as células do fungo foram transferidas para o meio Fava-Netto líquido e cultivado por 72 horas a 36 °C, sob agitação de 150 rpm, para obtenção de células na fase exponencial de crescimento.

### **4.2 Cultivo do fungo em condições de privação de cobre**

Um total de  $2 \times 10^8$  leveduras de *P.lutzii* foram crescidas em meio Mc Veigh & Morton (Restrepo & Jiménez 1980) até atingirem a fase exponencial. Para obtenção da condição controle, as células leveduriformes foram crescidas durante 24h e 48h em meio Mc Veigh & Morton (MMcM) contendo 3,5 µM de sulfato de cobre CuSO<sub>4</sub> como fonte de cobre e sem a adição de quelante de cobre. Para a privação de cobre, as células leveduriformes foram incubadas em meio MMcM suplementado com 50 µM de um quelante específico de cobre (BCS: batocuproinadisulfonato sódico; Sigma- Aldrich) por 24 e 48 horas de incubação sob agitação de 150 rpm à 36 °C.

### **4.3 Extração de proteínas citoplasmáticas e preparação do extrato proteico**

Após crescimento em meio MMcM (Restrepo & Jiménez 1980), as células foram centrifugadas à 5000 g, 4°C. Ressuspendeu-se em Tris-Cálcio (20 mM Tris-HCl pH 8.8; 2 mM CaCl<sub>2</sub>) com inibidores de proteases e nuclease. Distribuiu-se em tubos de extração, acrescentando-se pérolas de vidros. Passou-se no bead beater em 5 ciclos de 30 segundos, mantendo-se sempre no gelo. Transferiu-se para eppendorfs limpos e estéreis seguido por centrifugação a 10.000 g por 15 min a 4°C. Para determinar a concentração do extrato bruto de proteínas foi utilizado o reagente Bradford (Sigma-Aldrich) utilizando-se albumina sérica (BSA) como padrão (Bradford,1976).

#### **4.4 Viabilidade Celular sob condições de privação de cobre.**

A viabilidade das células leveduriformes foi determinada através de citometria de fluxo em triplicatas biológicas. Para obtenção da condição controle, as células leveduriformes de *P. lutzii* foram crescidas em meio Mc Veigh & Morton (MMcM) contendo 3,5  $\mu\text{M}$  de Sulfato de cobre  $\text{CuSO}_4$  como fonte de cobre e sem a adição de quelante de cobre. Para a obtenção da condição de privação de cobre, as células leveduriformes foram incubadas em meio MMcM suplementado com 50  $\mu\text{M}$  de um quelante específico de cobre (BCS: batocuproinadisulfonato sódico; Sigma- Aldrich) sob agitação de 150 rpm à 36  $^{\circ}\text{C}$ . A viabilidade celular foi determinado nos pontos 0, 2, 4, 6, 24, 48 e 72 h.

A viabilidade foi determinada por análise de integridade da membrana usando iodeto de propídio como marcador de células mortas. Células em suspensão ( $5 \times 10^6$  células de levedura / ml) foram centrifugadas e o sobrenadante foi descartado. As células foram marcadas por adição da solução de iodeto de propídio (1  $\mu\text{g}$  / ml) durante 20 min, no escuro, à temperatura ambiente. Após incubação com o corante, as células em suspensão foram imediatamente analisadas no C6 Accuri flow cytometer (Accuri Cytometers, Ann Arbor, MI, EUA). Um mínimo de 5.000 eventos por amostra foi obtida com o canal FL3-H. Os dados foram coletados e analisados utilizando FCS Express 4 Plus Research Edition software (Denovo Software, Los Angeles, CA, EUA).

Os resultados obtidos foram utilizados para definir o melhor tempo de cultivo de *P. lutzii*, sob condições de ausência e presença de cobre para o desenvolvimento da análise proteômica.

#### **4.5 Eletroforese bidimensional de proteínas (2-DE) e coloração dos géis**

Um total de 300  $\mu\text{g}$  de proteínas foi utilizado para triplicata biológica de cada condição experimental e aplicado em tiras de gradiente de pH imobilizado (IPG) de 13 cm, com separação não linear (NL) de pH 3-11. Antes da focalização isoelétrica (IEF) os extratos celulares foram precipitados utilizando-se o sistema comercial 2-D Clean-Up<sup>TM</sup>. Após a centrifugação o precipitado foi lavado para retirada de contaminantes não protéicos como detergentes, sais, lipídeos e ácidos nucleicos. A mistura foi centrifugada novamente e o precipitado resultante foi ressuspendido em tampão de reidratação (7 M uréia, 2 M tiouréia,

0,5 % (v/v) tampão para IPG 3-11 NL, 65 mM DTT, 2 % [p/v] CHAPS e traços de azul de bromofenol até se obter o volume final de 250  $\mu$ L. Após incubação por 1 h, sob agitação, o material foi centrifugado a 12.000 g, 10 min a 4  $^{\circ}$ C. O sobrenadante foi aplicado a um suporte apropriado e a tira de IPG foi colocada sobre o tampão de reidratação. As tiras de IPG foram cobertas com óleo mineral e deixadas por 30 min a temperatura ambiente. Em seguida, as tiras foram incubadas (reidratadas) por 14 h, sendo as seguintes as condições para a focalização das proteínas: 500 V por 1 h (step), 500 -1000 V por 1 h (gradiente), 1000 - 8000 por 12,5 h (gradiente) e 8000 V por 2,5 h (step), com total de 15980 V/h. Tanto a reidratação quanto a focalização isoeletrica foram realizados no sistema Ettan IPGphor III e a temperatura da corrida foi mantida à 20  $^{\circ}$ C. Após o término da focalização isoeletrica as tiras foram armazenadas à - 80  $^{\circ}$ C. Após a focalização isoeletrica as tiras de IPG foram reduzidas com 0,5% (p/v) de DTT em 5 mL de tampão de equilíbrio contendo 6 M uréia; 0,5 M Tris-HCl; pH 8,8; 30% (v/v) glicerol, 2% (p/v) SDS e azul de bromofenol durante 40 min com suave agitação. Em seguida, a solução foi descartada e as tiras foram alquiladas com 2,5% (p/v) de iodocetamida no mesmo tampão de equilíbrio e deixadas por 40 min com suave agitação e sob proteção da luz. Após isso, o tampão de equilíbrio foi retirado e as tiras IPGs foram lavadas com tampão de corrida (25 mM Tris pH 8.8, 192 mM glicina, 0,1% [p/v] SDS) por 5 min. A separação na segunda dimensão foi realizada em cuba de eletroforese vertical, Hoefer SE-600 em géis homogêneos de 10% , (1,5 mm de espessura). Um marcador de proteínas com massa molecular conhecida foi colocado na extremidade ácida da tira IPG. As tiras IPG foram colocadas e seladas nos géis SDS-PAGE com 0,5% de agarose em tampão de corrida e traços de azul de bromofenol. A separação eletroforética da segunda dimensão foi realizada segundo a descrição de Laemmli (1970) com tampão de corrida nos compartimentos superior e inferior da cuba. A corrida teve duas etapas: na primeira hora de corrida a voltagem foi mantida a 100 V e após esse tempo foi aumentada para 250 V até que a linha de frente atingisse o final do gel. A temperatura foi mantida à 10  $^{\circ}$ C e após o término da corrida os géis foram retirados da cuba e corados com Coomassie. As imagens dos géis foram capturadas utilizando-se o scanner ImageScan III e posteriormente, digitalizadas com o software ImageMaster 6.0.

## 4.6 Aquisição e análise das imagens

Os géis corados foram capturados em modo transparência utilizando-se o programa Labscan v 3.0 e as imagens foram importadas do formato TIFF (Tag Image File Format) e convertidas para o formato do programa Image Master Platinum 6.0 (.mel). Os *spots* detectados automaticamente pelo software do programa foram conferidos manualmente e os sinais falsos positivos foram removidos, também, manualmente. Foram analisadas triplicatas de géis para cada condição estudada, utilizando-se uma referência para alinhamento (ponto de referência) para pareamento automático. Um *spot* foi considerado reprodutível quando estava presente em todas as triplicatas dos géis de cada condição. Para se comparar spots entre os géis das duas condições (pareamento intra classe) uma pasta de pareamento (*matchSet*) foi criada. Um gel referência (*master*) de cada condição foi escolhido como sendo a imagem com o maior número de spots e com melhor resolução. O pareamento automático entre os géis *master* (pareamento inter classe) foi realizado pelo programa e uma inspeção manual de cada *spot* foi realizada para aumentar a confiabilidade do pareamento (Figuras 4A e 4B). A porcentagem de volume de cada *spot* foi determinada e utilizada para cálculos estatísticos dos níveis de expressão de proteínas.

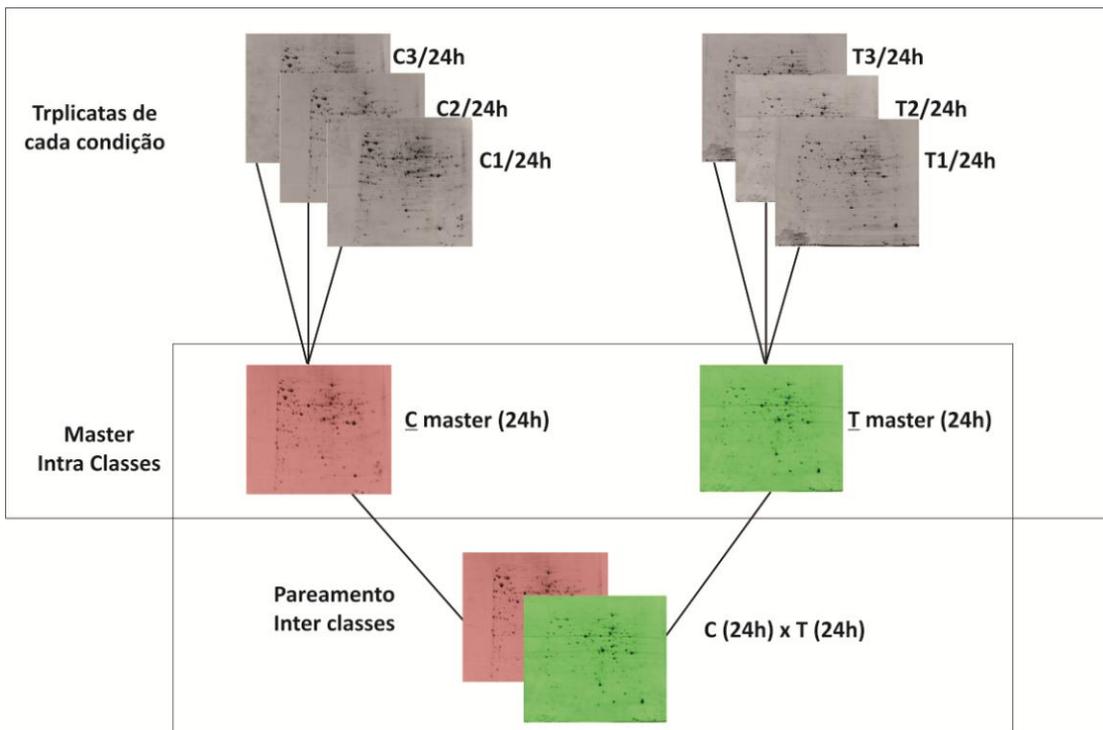


Figura 4 (A) – Fluxograma das análises de imagens realizadas entre as duas condições: controle de 24 horas (C) e tratado com BCS por 24 horas (T).

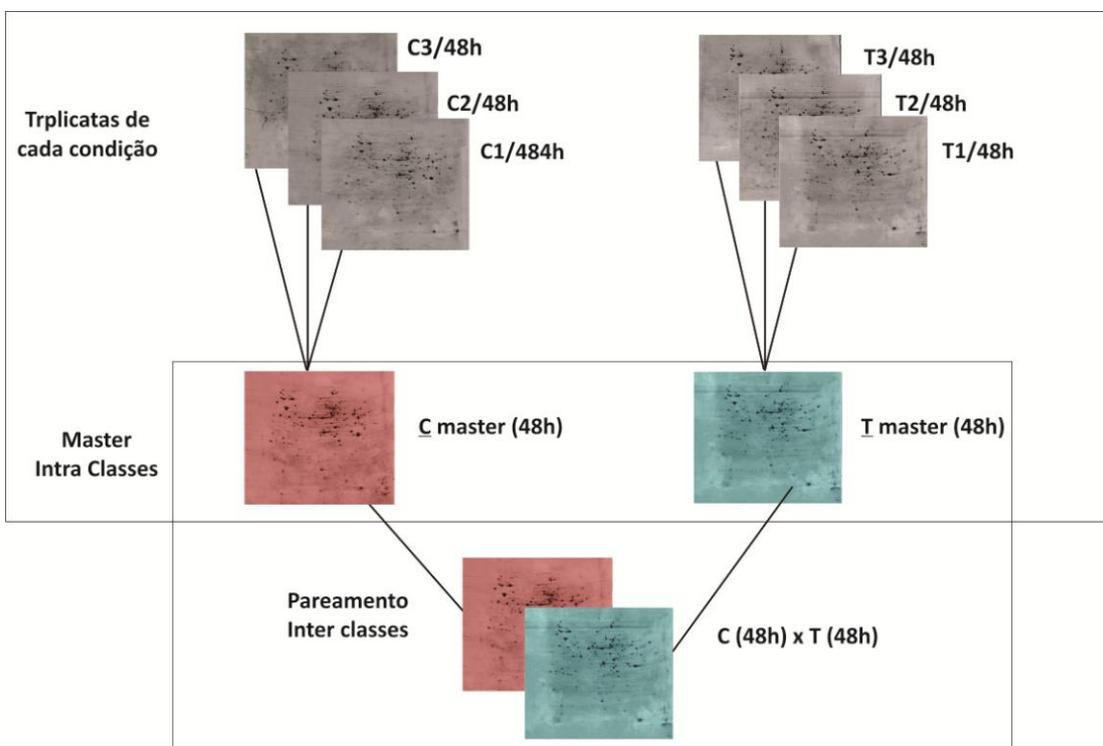


Figura 4 (B) – Fluxograma das análises de imagens realizadas entre as duas condições: controle de 48 horas (C) e tratado com BCS por 48 horas (T).

#### 4.7 Análises Estatísticas

As análises estatísticas entre as duas condições, controle (sem quelante de cobre) e tratado após 24 h e 48 h com BCS foram realizadas com o software STATISTICA version 7.0 (Statsoft Inc., 2005). Os resultados foram considerados significantes quando  $p < 0,05$ .

#### 4.8 Digestão das proteínas para espectrometria de massa tipo MALDI

Os *spots* de proteínas com diferença significativa de expressão foram selecionados, bem como outros escolhidos aleatoriamente, não apresentando expressão diferencial, e excisados do gel 2-D. Quando necessário, o mesmo spot foi retirado de dois ou mais géis e misturados no mesmo tubo antes da digestão. Os spots foram desidratados com 100  $\mu\text{L}$  de acetonitrila (ACN) por 5 min e, após a solução ser retirada, os *spots* de proteínas foram deixados no *speed vacuum* até secar completamente. Os spots de géis foram então reduzidos com 10 mM DTT por 1 h. O sobrenadante foi retirado e os *spots* foram alquilados com 55 mM de iodoacetamida ao abrigo da luz. Os spots foram lavados com 100  $\mu\text{L}$  de solução contendo 25 mM de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  por 10 min agitando em vortex. Em seguida o sobrenadante foi retirado e foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de uma solução contendo 25 mM de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ /50% ACN (v/v), deixando sob agitação em vortex por 5 min. Esse procedimento foi repetido. Após a solução ser retirada, as amostras foram desidratadas no *speed vacuum*. Finalmente, as amostras foram reidratadas em 30  $\mu\text{L}$  de tripsina a 10 ng/ $\mu\text{L}$  (Sequencing Grade Modified Trypsin Promega, Madison, WI, USA) durante 10 min a 4  $^\circ\text{C}$ . Após a remoção do excesso de tripsina, foi adicionado 25  $\mu\text{L}$  de solução de 25 mM de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  às amostras em gel e prosseguiu-se a incubação à 37  $^\circ\text{C}$  por 16 h. Após a digestão, o sobrenadante foi retirado e colocado em tubos novos e limpos. Aos spots de géis foi adicionado 50  $\mu\text{L}$  de solução de 50% (v/v) de ACN, 5% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA). A solução foi misturada em vórtex por 10 min e depois sonicada por 3 min a 4  $^\circ\text{C}$ . O sobrenadante foi adicionado aos tubos anteriores contendo a mistura de peptídeos. Os tubos contendo os peptídeos trópticos foram deixados no *speed vacuum* até secarem completamente e, em seguida, os peptídeos foram reconstituídos em água. Para concentrar e dessalinizar algumas amostras de *spots* pequenos

foi utilizada a ponteira de cromatografia ZipTip C18 (Millipore, Bedford, MA, USA). Foi adicionado 2  $\mu$ L da amostra na placa MALDI e deixado secar à temperatura ambiente até a completa evaporação. Em seguida, 2  $\mu$ L da solução de matriz CHCA [ $\alpha$  ácido  $\alpha$ -ciano- 4-hidroxicinamico em 50% (v/v) de acetonitrila e 5% (v/v) de TFA] a 10 ng/ $\mu$ L foi adicionado à placa e deixado secar à temperatura ambiente.

#### 4.9 Identificação das proteínas por PMF e por MS/MS e pesquisa em banco de dados

As análises foram realizadas no espectrômetro de massa MALDI-Synapt MS<sup>TM</sup> (Waters-Micromass, Manchester, UK). Para realização das análises por MS os espectros foram adquiridos em modo positivo e refletido. O instrumento foi calibrado com uma acurácia de <10 ppm utilizando-se uma mistura de padrões de peptídeos sintéticos conhecidos com uma variação de m/z de 800 to 4000 Da. O instrumento foi configurado para adquirir os espectros MS e os picos com intensidade acima de 15 *counts* foram automaticamente fragmentados com argônio na célula de colisão, resultando nos espectros MS/MS, utilizando-se o software Masslynx 4.0. Os picos de listas (\*.txt) e (\*.pkl) foram criados pelo ProteinLynx Global Server 2.2.5v (Waters, UK).

A identificação das proteínas por PMF foi realizada submetendo-se as listas de massas monoisotópicas dos espectros MS (\*.txt) ao programa MASCOT (MASCOT 2.1.02; Matrix Science, London, U.K.), usando o banco de dados não redundante do National Center for Biotechnology Information (NCBI) para identificar proteínas candidatas. Os parâmetros de busca para PMF foram: (i) taxonomia, fungi; (ii) enzima, tripsina; (iii) modificações fixas: carbamidometilação das cisteínas; (iv) modificações variáveis: oxidação das metioninas; (v) tolerância de peptídeos: 20-100 ppm; (vi) permissão de clivagem perdida para peptídeos: máximo de 1. Para confirmação da identificação das proteínas por PMF, os espectros de íons MS/MS processados e convertidos nos arquivos \*.pkl e a lista de picos foram confrontados novamente no banco de dados não redundante do NCBI (fungi). Os parâmetros de busca foram os mesmos descritos para o PMF, exceto para tolerância de massa do fragmento (MS/MS), que foi entre 0.2-0.6 Da. As análises por MS/MS confirmaram as proteínas identificadas com base nos PMFs, validando as identificações. O banco de dados MIPS (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/yeast/listSearch.html?order=entry>) foi utilizado para prever a categoria funcional das proteínas.

#### **4.10 Preparação e digestão das amostras proteicas para nano-ESI-UPLC-MS<sup>E</sup>**

Foi utilizada uma quantidade de 300µg de proteínas de cada amostra. Cada extrato proteico dos tempos de 24h e 48h (300 µg) foi concentrado até volume final de 50µl e submetido à digestão com Tripsina. A amostra foi suspensa em 50 µL de bicarbonato de amônio (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) 50mM pH 8,5 e adicionada de 25 µL de RapiGest SF 0,2% v/v (Waters Corporation, Milford, MA, USA) como agente surfactante da amostra (Murad *et al*, 2011; Kilpatrick et al. 2012), levando ao termobloco por 15 min à 80°C. Para redução das pontes dissulfeto, foi adicionado as amostras 2,5 µL de DTT 100mM (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), sendo o material levado ao termobloco durante 30 min à 60°C. Posteriormente, foi adicionado as amostras 2,5 µL de iodoacetamida 300mM (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) para alquilação das proteínas que foram reduzidas por DTT, incubou-se por 30min à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Para a digestão trípica, foi utilizada Tripsina (Promega Waters Corporation, Milford, MA, USA), adicionando-se 10 µL da solução (preparada com 50mM de bicarbonato de amônio para 50 ng/ul) na amostra à 37°C por 16 horas. Após a digestão trípica, foi adicionado 10 µL de uma solução de TFA 5% para hidrólise do RapiGest SF (Waters Corporation, Milford, MA, USA), deixando as amostra por 90 min em termobloco à 37°C. A seguir, submeteu-se as amostras à centrifugação 14000 x g durante 30 min 6°C para precipitação dos resquícios de RapiGest SF (Murad *et al*, 2011).

Após a digestão trípica as amostras foram levadas ao *speed vaccum* por 4 horas, para secagem. Depois de secas, as amostras foram transferidas individualmente para um frasco de recuperação total ou “total recovery vial” (Waters Corporation, Milford, MA, USA). As amostras foram ressuspendidas em 20 µL de uma solução contendo 20 mM de formiato de amônio e 200 fmol de fosforilase b (MassPREPTM protein, Waters Corporation, Milford, MA, USA) que é utilizado na cromatografia líquida como normalizador/padrão interno da amostra (Gilar *et al*, 2005; Geromanos *et al*, 2009; Li *et al*, 2009; Murad *et al*, 2011).

#### **4.11 Processamento dos dados e identificação de proteínas**

Os dados de MS obtidos a partir de LC-MS<sup>E</sup> foram processados e pesquisados no servidor ProteinLynx Global Server (PLGS) versão 3.0 (Waters Corp) (Murad *et al*, 2011). As proteínas foram identificadas usando o software de algoritmo. As identificações e os dados quantitativos foram gerados utilizando os algoritmos aplicados contra um banco de dados espécie-específico do *Paracoccidioides* ([http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides\\_brasiliensis/MultiHome.html](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html)).

A normalização dos parâmetros, como: detecção dos íons, *clustering*, e escala logarítmica foram realizados no PLGS. A intensidade das medições foi ajustada tipicamente para as modificações fixas da C-carbamidometilação, Oxidação da metionina e Fosforilação serina-treonina-tirosina (STY). Os componentes foram tipicamente agrupados com uma precisão de massa em 10 ppm e uma tolerância de 0.25 min contra o banco de dados, gerando uma massa teórica de íon precursor com, no mínimo, um peptídeo correspondente. O alinhamento dos íons precursores de alta energia e baixa energia foram conduzidos com uma precisão de 0.05 min. Uma clivagem perdida foi permitida. A tolerância do fragmento do íon precursor foi detectada automaticamente. A identificação de proteínas seguiu o critério de inclusão e detecção de pelo menos 2 íons fragmentados por peptídeo, 5 fragmentos por proteínas e a determinação de pelo menos 1 peptídeo por proteína. A identificação das proteínas foi permitida com no máximo 4% de falso-positivo, com taxa de cobertura realizada em triplicata experimental. Para a análise e identificação das proteínas e nível de quantificação, a intensidade observada foi normalizada através do padrão interno utilizado (Murad *et al*, 2011).

#### **4.12 Análise da expressão de genes em condições de privação de cobre , Síntese de cDNA e análise da expressão gênica por qRT-PCR em Tempo Real**

Células leveduriformes na fase exponencial de crescimento em meio de cultura Fava-Netto líquido foram inoculadas em meio MMcM líquido (Restrepo & Jiménez 1980) na ausência de cobre por 24 e 48 hs. As células foram centrifugadas e o RNA total foi extraído utilizando-se o reagente Trizol, seguindo os procedimentos indicados pelo fabricante (Invitrogen<sup>TM</sup>, Life Technologies, Carlsbad, CA). Os RNAs obtidos foram utilizados para síntese de cDNAs com a transcriptase reversa High Capacity (Applied Biosystems, Foster

City, CA, USA). Os cDNAs foram submetidos a reações de qRT-PCR utilizando-se SYBR green (Applied Biosystems, Foster City, CA) no sistema StepOnePlus™ real time PCR (Applied Biosystems Inc.). A Tabela 1 mostra os oligonucleotídeos utilizados na reação de qRT-PCR. As reações foram realizadas em triplicatas. A especificidade de cada par de oligonucleotídeos confirmada pela visualização de um único produto de PCR em gel de agarose 1,2%. A reação de PCR em tempo real foi realizada em 40 ciclos de 95°C por 15 seg e 60°C por 1min. Na mistura SYBR Green PCR (Applied Biosystems) foi adicionada 10 pmol de cada oligonucleotídeo e 40 ng de cDNA molde, em um volume final de 20µl. As curvas padrões foram geradas para confirmar um único produto de PCR e foi realizada utilizando-se uma alíquota de cDNA de cada amostra, serialmente diluídas (1:5 da diluição original). Os dados foram normalizados com o transcrito codificante para a proteína Tubulina e Proteína ribossomal 60S - L34 amplificados em cada conjunto de experimentos de qRT-PCR. Os níveis de expressão relativa dos genes de interesse foram calculados utilizando-se o método de curva padrão para quantificação relativa (Bookout *et al*, 2006). Os resultados foram validados pelo teste *t* de student, sendo consideradas diferenças significativas as amostras que apresentaram  $p \leq 0,05$ .

**Tabela 1:** Oligonucleotídeos utilizados na RT-qPCR

Gene/ Número de acesso <sup>a</sup>	Sequencia sense (5'→3')	Sequencia ant-sense (5'→3')
Tubulina / PAAG_01647.1	ACAGTGCTTGGGAACCTATAACC	GGGACATATTTGCCACTGCC
Proteína ribossomal 60S - L34/ PAAG_00746	TCAATCTCTCCCGGAATCC	AGTTGGCGATTGTTGTGCGG
CTR3/ PAAG_05251.2	CATGTCATCAATGCCTGCTTC	TGCAGG CGGGTCGGGAGA
Citrato sintase/ PAAG_08075	ACTGAGCACGGCAAGACGG	TTCCAATGCACGGTCGATAA
2-Metilcitrato sintase/ PAAG_04550	CTACCACAAGATGAAGGGGG	CTCGTTGGCATCCAGGACA

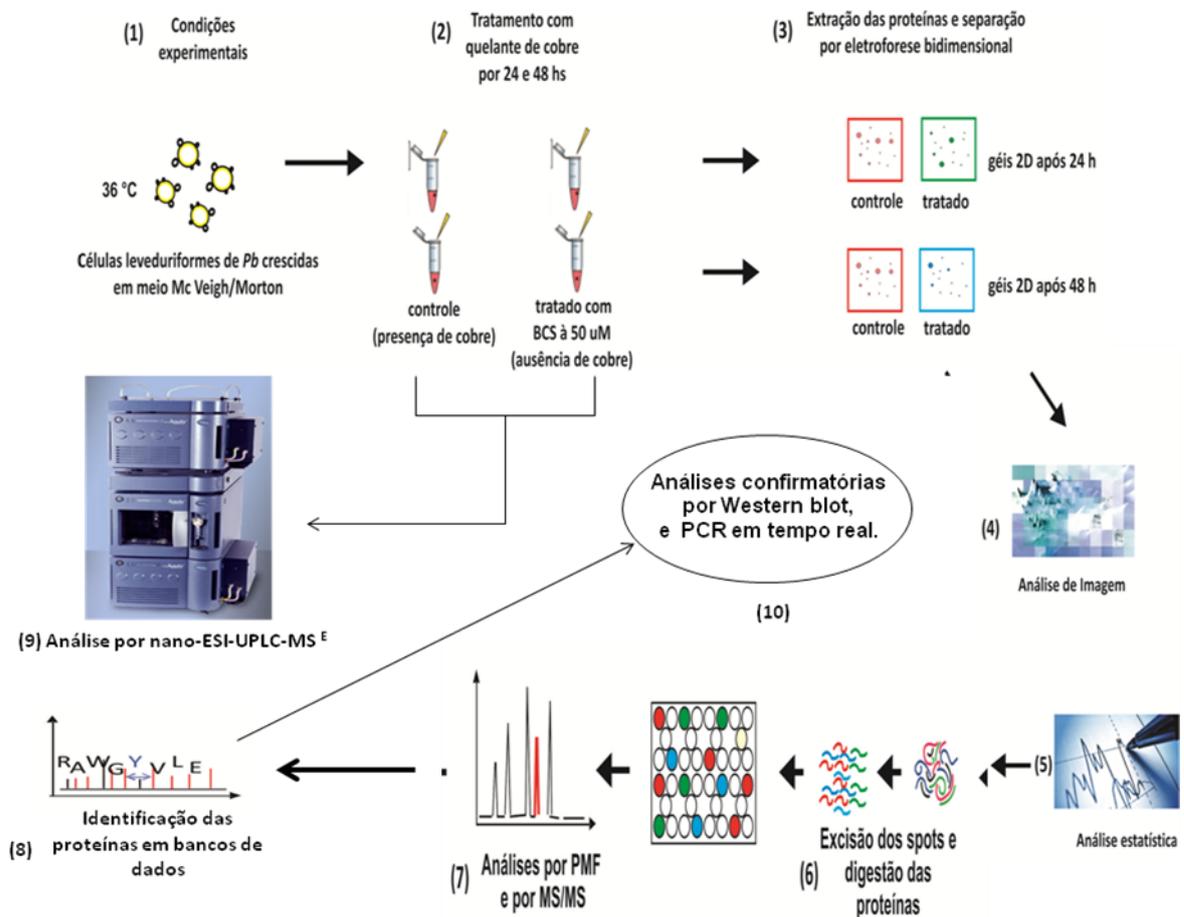
<sup>a</sup>Número de acesso – número de acesso dos genes usados na PCR quantitativa em tempo real, identificada no banco de dados do *Paracoccidioides*: ([http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/Paracoccidioides\\_brasiliensis/MultiHome.html](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/Paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html))

#### 4.13 Análises por Western blotting

Extratos proteicos (30 µg) das células do fungo *P. lutzii* foram quantificadas e as proteínas fracionadas por SDS-PAGE (12%), como descrito por Laemmli (1970). As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (HyBond ECL, GE Healthcare) a 30 V por 16 h a 4°C. Após a confirmação da transferência seguiu-se a incubação com tampão de bloqueio por 2 h a temperatura ambiente. Após o bloqueio dos sítios inespecíficos,

as membranas foram lavadas e incubadas com anticorpos policlonais selecionados. A incubação foi realizada a temperatura ambiente por 2 h, sob agitação vigorosa. Os anticorpos utilizados para essa análise foram: enolase e formamidase. Após incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas três vezes e incubadas com anticorpo secundário de camundongo ou coelho, acoplados à fosfatase alcalina. A incubação foi realizada a temperatura ambiente por 1 h, sob agitação vigorosa. Após a lavagem das membranas e incubação com tampão para fosfatase alcalina, as bandas reativas foram desenvolvidas com o substrato cromogênico para fosfatase alcalina (BCIP/NBT) e a reação foi interrompida pela adição de EDTA 0,5M. As imagens de western blot foram adquiridas com ImageMaster 2D Platinum 6.0 (Geneva Bioinformatics, GeneBio). As imagens Raw Tiff foram analisadas por análise densitométrica das bandas de immunoblotting usando o software AphaEaseFC (Genetic Technologies Inc.). O Pixel da intensidade das bandas foi analisado, gerado e expresso como Valores de Densidade Integrados (IDV).

Um esquema experimental de todas as técnicas desenvolvidas é mostrado na Figura 5.

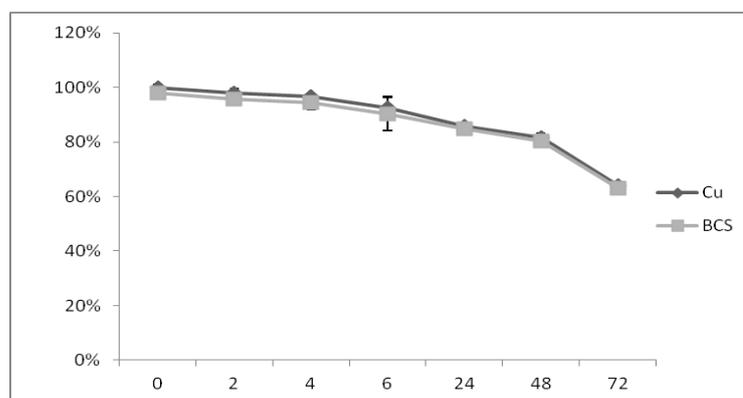


**Figura 5 – Desenho experimental.** *Paracoccidioides lutzii* (ATCC MYA-826) foi utilizado em todos os experimentos. (1) Levedura (L) crescida à 36 °C em meio Mc Veigh/Morton. (2) tratamento com quelante de cobre BCS por 24 e 48 h. (3) Preparação dos extratos de proteínas e fracionamento por 2-DE. Triplicatas de cada condição foram obtidas: controle (C) de 24 e 48 h (sem quelante de cobre) e tratado (T) após 24 e 48 h. (4) Análise de imagem utilizando-se o software ImageMaster 2D Platinum 6.0 e (5) análises estatísticas realizadas com teste de Student ( $p < 0.05$ ). (6) digestão dos *spots* de interesse. (7) Aquisição dos espectros MS e MS/MS. (8) Identificação das proteínas no banco de dados NCBIInr., UniPROT, KEEG. (9) Dados MS foram obtidos a partir de LC-MS<sup>E</sup>. (10) Validação dos resultados do proteoma por *Western blot* e RT-PCR em tempo real.

## 5.0 RESULTADOS

### 5.1 Viabilidade celular de *Paracoccidioides lutzii*

A viabilidade das células leveduriformes crescidas em meio Mc Veigh/Morton (MMcM), com ou sem adição do quelante de cobre batocuproinadisulfonato sódico (BCS), foram determinadas usando iodeto de propídio como marcador de células mortas (Fig. 6). Foi observado, um decréscimo na viabilidade celular após 48h de privação de cobre. Com base nestes dados, os tempos de 24h e 48h de incubação das células de *P.lutzii* em condições de privação de cobre foram selecionados para análise proteômica.

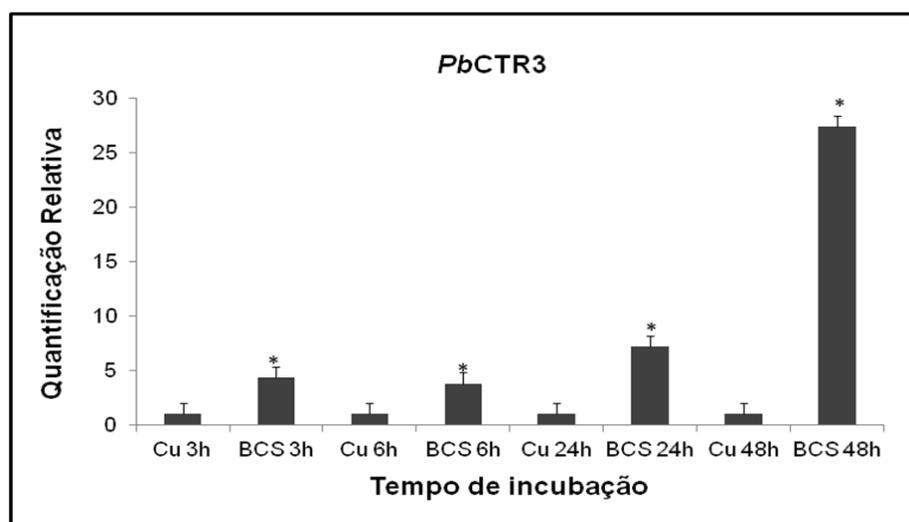


**Figura 6. Efeito da privação de cobre na viabilidade do *P. lutzii* em células leveduriformes.** Viabilidade em meio MMcM contendo 3,5  $\mu\text{M}$  de sulfato de cobre (triângulo) e células leveduriformes incubadas em meio MMcM depletado de cobre, contendo 50  $\mu\text{M}$  de BCS (quadrado). A viabilidade foi determinada usando-se iodeto de propídio. A barra de erros representa os desvios padrão das triplicatas biológicas.

## 5.2 Análise de expressão do gene CTR3, envolvido no metabolismo de cobre, em *P. lutzii* durante restrição de cobre.

Com o objetivo de avaliar a expressão do gene codificante para o transportador de cobre de alta afinidade *PbCTR3*, durante privação de cobre, células leveduriformes do fungo *P. lutzii* (*Pb01*) foram cultivadas na presença do quelante específico de cobre (BCS). Os RNAs obtidos nas condições de depleção de cobre, foram utilizados para síntese de cDNAs e os níveis de expressão gênica avaliados por qRT-PCR em tempo real em triplicatas biológicas.

A expressão de *PbCTR3* (Figura 7), foi induzida durante privação de cobre após 3, 6, 24 e 48 h, sendo que um maior nível de expressão para *PbCTR3* foi observado em 24 e 48 h durante a privação de cobre. No teste de viabilidade celular (Figura 6), observou-se um acentuado decréscimo da viabilidade celular após 48 h de incubação. A partir desses resultado, escolheu-se os tempos de 24 e 48 h para as análises proteômicas.

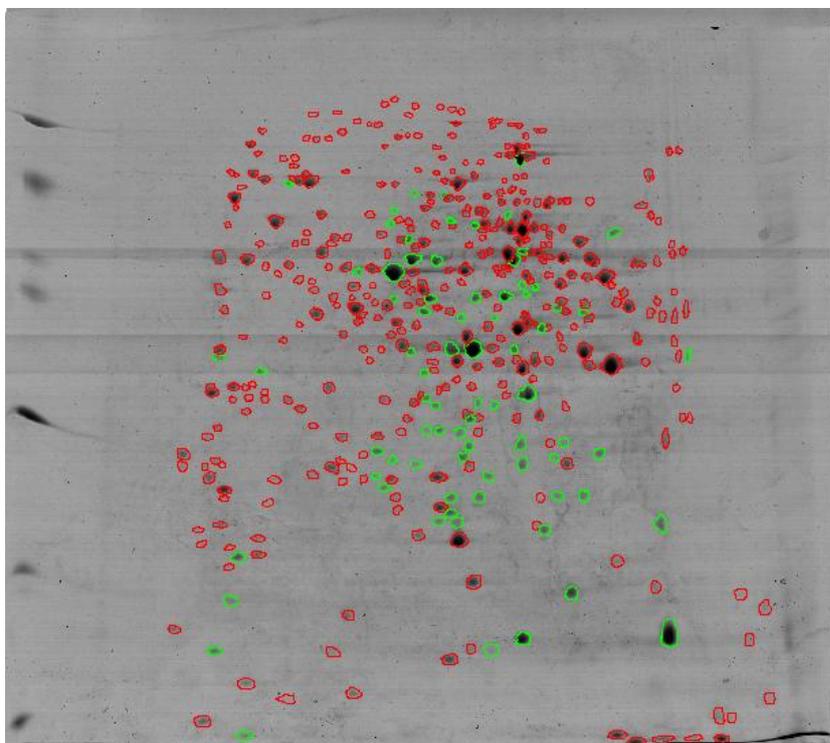


**Figura 7. Análise transcricional correspondendo aos tempos de 3 a 48 h em condições de privação de cobre.** Níveis de expressão gênica avaliados por qRT-PCR em duas condições experimentais (controle e ausência de cobre). Para normalização dos transcritos foi utilizado o gene codificante da proteína Tubulina. Nas análises estatísticas foi utilizado o test t Student's. As barras representam o desvio padrão. \*  $p \leq 0,05$ .

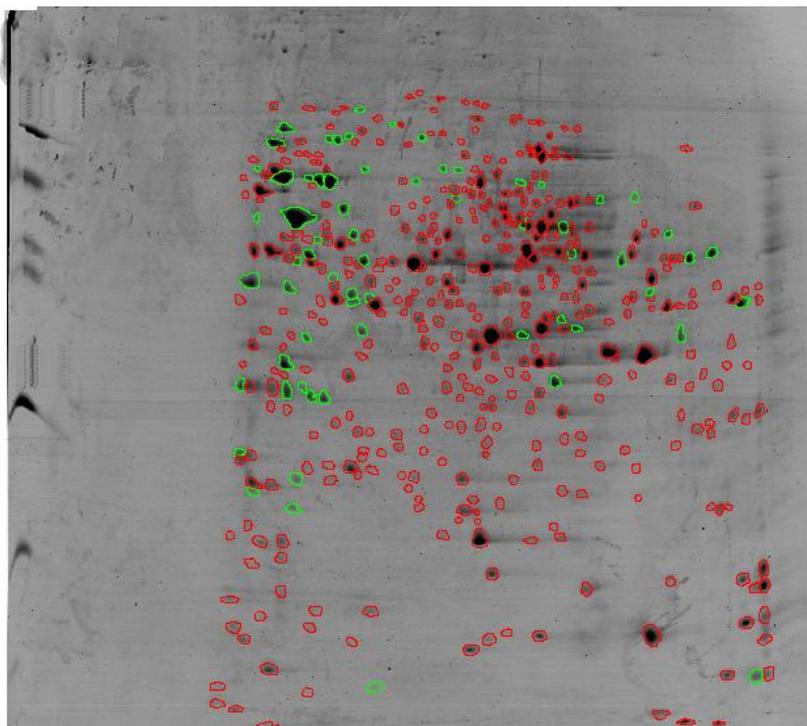
### 5.3 Análises proteômicas de *P. lutzii* por Eletroforese Bidimensional (2-DE)

Cada tempo de incubação foi analisado separadamente bem como triplicata dos géis de cada tratamento foram comparados. As proteínas foram extraídas, seguindo procedimento já estabelecido (Fonseca *et al*, 2001). Utilizando uma ampla faixa de pH de 3-11 não linear (NL) e coloração por *Coomassie* foi possível detectar *spots* de proteínas, com massas moleculares de 12 a 128 kDa e *pI* de 3,44 a 10,8. O perfil protéico da condição controle (24 h) apresentou um número total de 473 *spots*, enquanto, a condição experimental (ausência de cobre por 24 h) apresentou 445 *spots*. Para os experimentos realizados com as amostras de 48 h foram encontrados um número total de 366 *spots* nos géis controle e 361 *spots* nos géis da condição experimental, com variações de massas moleculares de 14 a 113 kDa e *pI* variando de 3,15 a 11,2 . Os perfis protéicos foram reprodutíveis considerando-se as replicatas técnicas e as amostras biológicas.

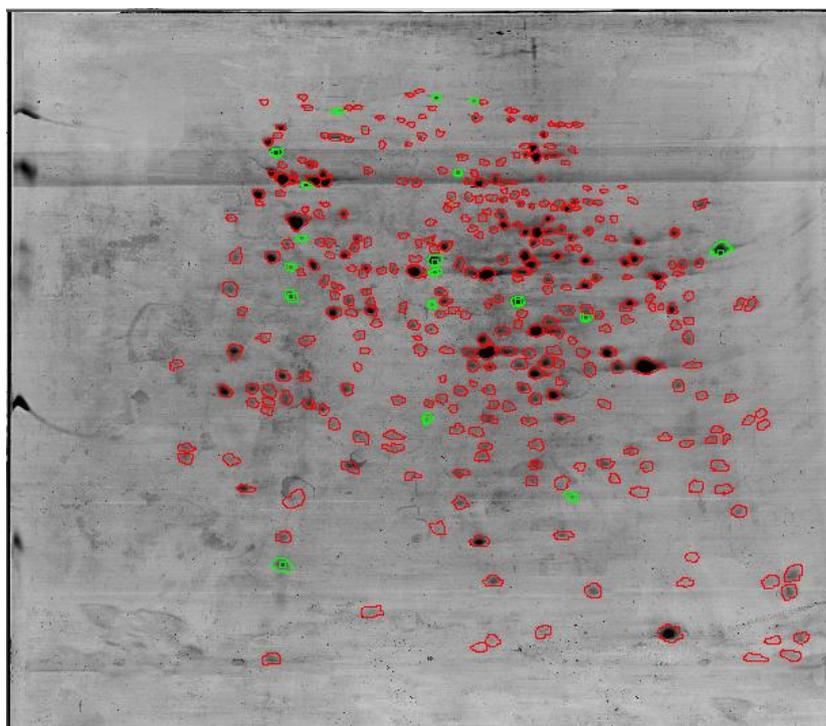
Para avaliar os níveis de expressão das proteínas, a intensidade de coloração dos *spots* nas duas condições (controle e tratado) e nos dois tempos analisados (24 e 48 h) foi comparada através do software Image Master Platinum 6.0 (GE Healthcare). Inicialmente, foi realizado o pareamento entre as triplicatas das amostras controle; em seguida o mesmo procedimento foi realizado para as amostras tratadas (T). Logo após, pareou-se o gel mais representativo (*master*) das amostras dos controles com o *master* das amostras tratadas (T). Foi gerada então, uma lista dos *spots* com dados como: volume, volume normalizado (% de cada *spot*) e valores experimentais de massas moleculares da segunda dimensão e *pI* da primeira dimensão de todos os *spots*. Para o tempo de 24 h de tratamento, 401 *spots* parearam entre as duas condições (controle e tratado) e foram analisados estatisticamente pelo teste de Student ( $p < 0,05$ ). As análises revelaram que 64 *spots* mostraram expressão diminuída no tratado, enquanto que 77 *spots* de proteínas mostraram expressão aumentada no tratamento com quelante de cobre, com níveis de expressão variando de 0,24 até 12,16. Do total de 355 *spots* que parearam entre as duas condições nos tempos de 48 h, 12 *spots* apresentaram expressão diminuída no tratado, enquanto que 18 *spots* mostraram expressão aumentada no tratamento com quelante de cobre, com níveis de expressão variando de 1,13 até 6,48. As Fig. 8 a 12 apresentam um gel bidimensional (*master*) mostrando as proteínas identificadas no controle e tratado de cada um dos tempos utilizados (24 h e 48 h).



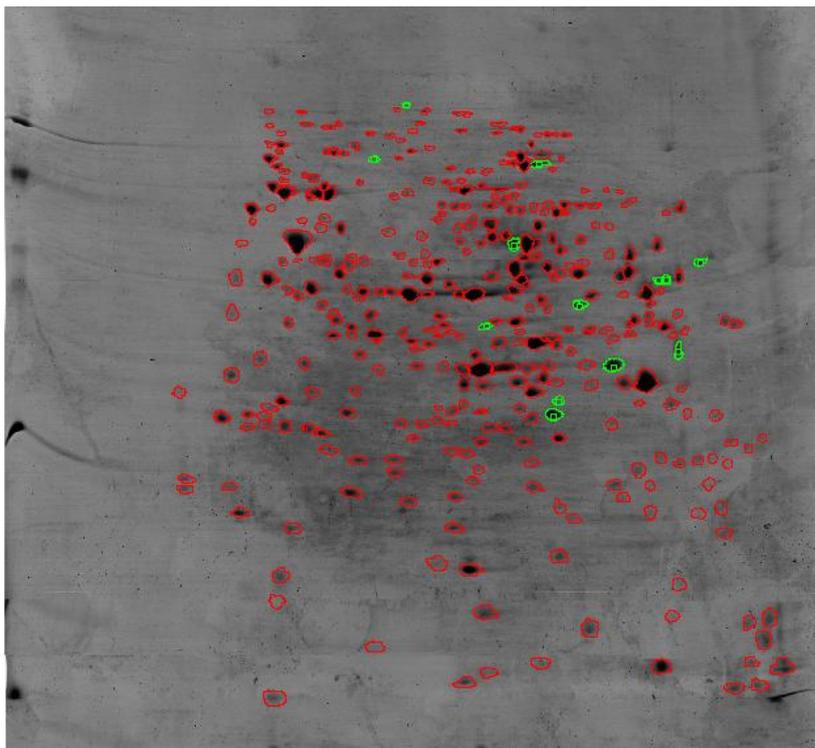
**Figura 8 - Análise de imagem do gel master da condição tratado com quelante de cobre.** Spots circulos em verde indicam proteínas acumuladas preferencialmente na condição de privação de cobre 24 h, quando comparados com o controle 24 h.



**Figura 9 - Análise de imagem do gel master do controle 24 h.** Spots circulosados em verde indicam proteínas diminuídas na condição de privação de cobre 24 h, quando comparados com o controle 24 h.



**Figura 10 - Análise de imagem do gel master da condição tratado com quelante de cobre.** Spots circulosados em verde indicam proteínas acumuladas preferencialmente na condição de privação de cobre 48 h, quando comparados com o controle 48 h.



**Figura 11 - Análise de imagem do gel master do controle 48 h.** Spots circulado em verde indicam proteínas diminuídas na condição de privação de cobre 48 h, quando comparados com o controle 48 h.

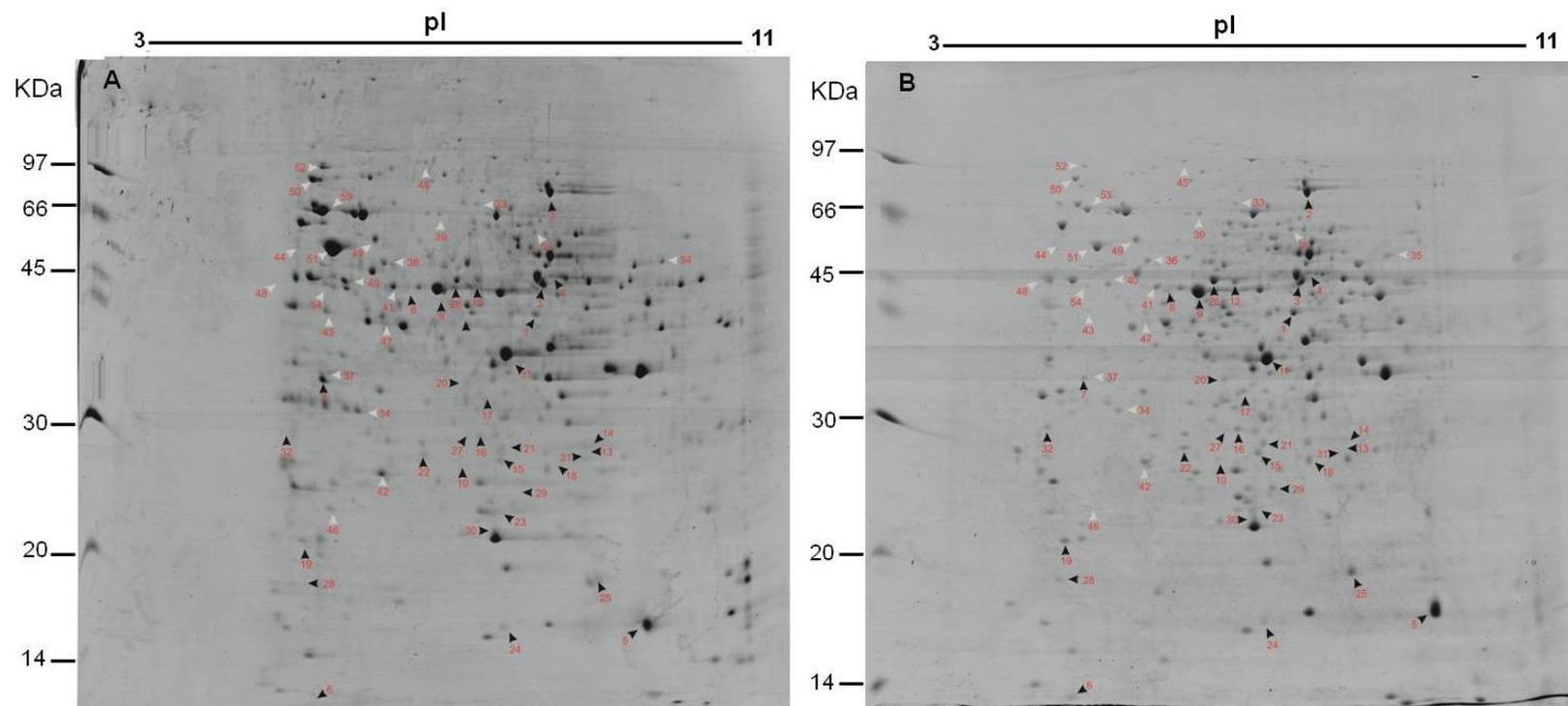
#### **5.4 Identificação das proteínas através de Eletroforese Bidimensional (2-DE).**

Os *spots* de proteínas obtidos dos géis 2-D foram retirados, digeridos com tripsina e os peptídeos foram analisados por PMF e/ou MS/MS. As Tabelas 2 e 3 mostram a relação de todas as proteínas identificadas obtidas por análises de PMF e MS/MS, bem como o *pI* e a massa molecular teóricos e experimentais de cada spot, o número de peptídeos encontrados, a porcentagem de cobertura de sequência em relação à sequência total e os peptídeos confirmados por MS/MS. Todas as proteínas identificadas foram pesquisadas no banco do NCBI<sup>Inr</sup> com restrição para Fungos. Cada peptídeo apresentado na Tabela obteve um *score* acima do valor aceitável, indicando identidade confiável ( $p < 0,05$ ). Foi possível identificar 68 proteínas/isoformas por espectrometria de massa, sendo 42 com expressão aumentada em condições de depleção de cobre e 26 com expressão diminuída em condições de depleção de cobre, como ilustrado nas Fig 12 e 13, Tabelas 2 e 3. Entre as 26 proteínas identificadas que tiveram a expressão diminuída em condições de privação de cobre, 24 proteínas tiveram diferença de expressão com significância estatística ( $p < 0,05$ ) (Tabela 3). Todas as proteínas

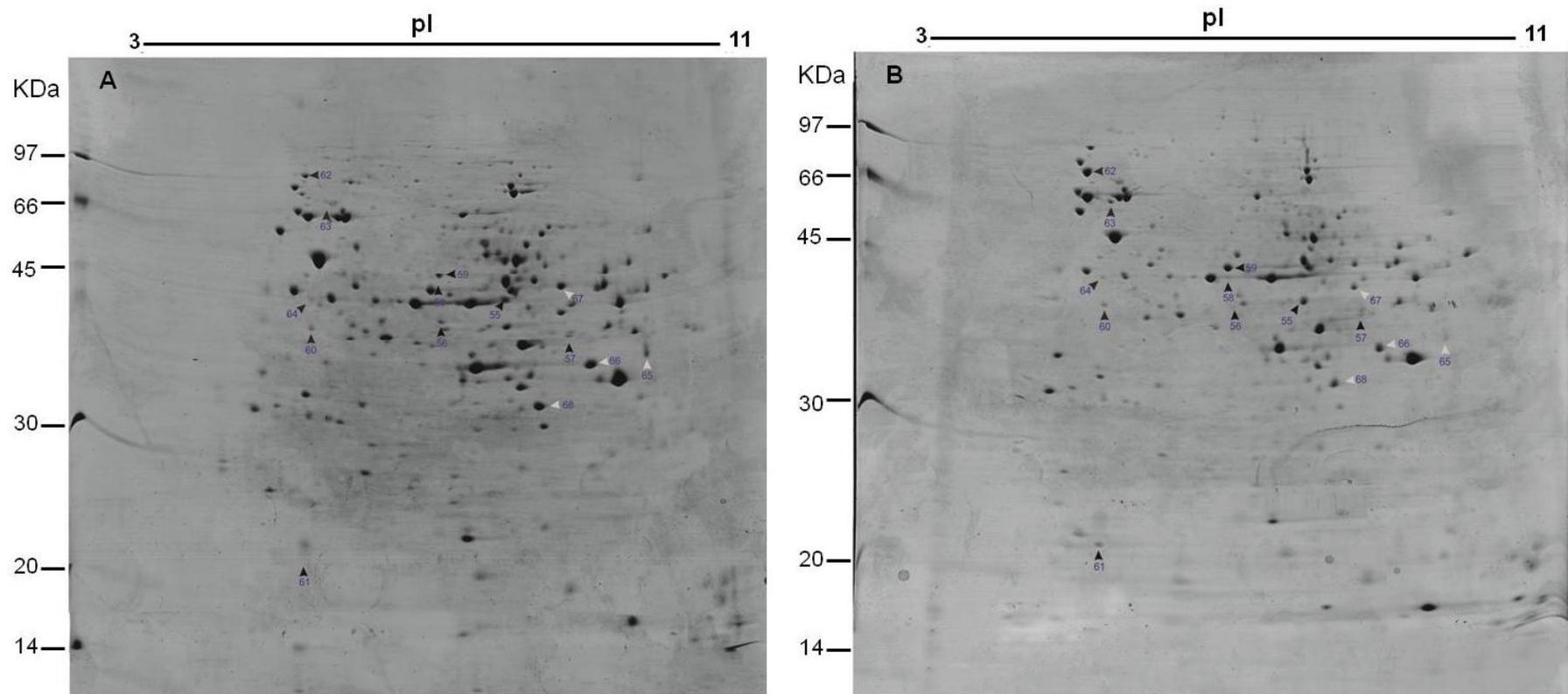
identificadas foram agrupadas na classificação funcional de acordo com FunCat2 ([HTTP://pedant.helmholtzmuenchen.de/pedant3htmlview/pedant3view?Method=analysis&Db=p3\\_r48325\\_Par\\_brazi\\_Pb01](http://pedant.helmholtzmuenchen.de/pedant3htmlview/pedant3view?Method=analysis&Db=p3_r48325_Par_brazi_Pb01)) e agrupadas em diversas categorias.

Proteínas envolvidas no metabolismo de aminoácidos, na via da glicólise, endereçamento de proteínas e de defesa e virulência como as proteínas de choque térmico, estão entre proteínas acumuladas preferencialmente nas amostras submetidas à depleção de cobre (Tabela 2).

As proteínas de *P. lutzii* com expressão reduzida durante depleção de cobre são mostradas na Tabela 3.



**Figura 12. Proteínas de *P. lutzii* em condições de depleção de cobre.** Imagem 2-DE das proteínas de leveduras de *P. lutzii* em meio Mc VeighMorton sem adição de quelante de cobre (A) e com adição de quelante de cobre por 24h (B). Um total de 300 µg de extrato de proteínas de células leveduriformes foram separadas em tiras de 13 cm (IPG strips), pH 3–11 não linear. As posições das proteínas identificadas por espectrometria de massa estão indicadas pelas setas e números. As setas Preta e Branca indicam as proteínas induzidas e reprimidas, respectivamente. Os spots identificados são numerados e listados de acordo com as Tabelas 1 e 2. O gradiente de pH está marcado acima do gel e a massas moleculares do padrão (kDa) estão indicadas à esquerda dos géis



**Figura 13. Proteínas de *P. lutzii* em condições de depleção de cobre.** Imagem 2-DE das proteínas de leveduras de *P. lutzii* em meio Mc Veigh/Morton sem adição de quelante de cobre (A) e com adição de quelante de cobre por 48h (B). Um total de 300 µg de extrato de proteínas de células leveduriformes foram separadas em tiras de 13 cm (IPG strips), pH 3–11 não linear. As posições das proteínas identificadas por espectrometria de massa estão indicadas pelas setas e números. As setas Preta e Branca indicam as proteínas induzidas e reprimidas, respectivamente. Os spots identificados são numerados e listados de acordo com as Tabelas 1 e 2. O gradiente de pH está marcado acima do gel e a massas moleculares do padrão (kDa) estão indicadas à esquerda dos géis.

**Table 2. *Paracoccidioides lutzii* identified proteins with increased expression during copper starvation.**

Accession number/ Protein description <sup>a</sup>	Spot number <sup>b</sup>	Time <sup>c</sup>	PMF		MS/MS		Exp/Theo pI <sup>g</sup>	Exp/Theo MW <sup>h</sup>	Protein fold change <sup>i</sup>	p-value <sup>j</sup>	
			Score <sup>d</sup>	Seq. Cov (%) <sup>e</sup>	Score <sup>d</sup>	Matched Peptides <sup>f</sup>					
<b>1. METABOLISM</b>											
<b>Amino Acid Metabolism</b>											
gi 226287968	O-acetylhomoserine (thiol)-lyase	1	24h	99	51	110	5	7.60/6.24	41.0/46.9	1.9	0.0023
gi   295664721	3-isopropylmalate dehydratase large subunit	2	24h	101	17	95	1	7.79/6.49	75.0/79.1	1.6	0,0006
gi 295658947	O-acetylhomoserine (thiol)-lyase	55	48h	115	51	116	6	7.60/6.24	42.0/46.9	1.2	0,0406
gi 295669670	Adenosylhomocysteinase	56	48h	46	40	-	-	6.48/5.83	42.0/49.0	1.4	0,0358
gi 295671112	Homoserina desidrogenase	57	48h	59	57	-	-	8.49/6.34	40.0/39.5	2.1	0,0231
gi 295658700	Homogentisate 1,2-dioxygenase	3	24h	56	38	-	-	7.66/6.25	49.0/50.8	-	*
gi 295658700	Homogentisate 1,2-dioxygenase	4	24h	50	26	-	-	7.81/6.16	51.0/50.8	-	*
<b>Secondary metabolism</b>											
gi 295666938	Nucleoside diphosphate kinase	5	24h	57	32	-	-	9.63/6.84	17.0/16.8	2.1	0,0138

gi 295661741	Demethylubiquinone-9 3-methyltransferase	6	24h	52	23	84	1	4.40/4.93	13.0/22.4	2.1	0,0259
--------------	--	---	-----	----	----	----	---	-----------	-----------	-----	--------

### Phosphate metabolism

gi 295672504	Inorganic pyrophosphatase	7	24h	163	47	53	1	4.57/5.13	33.0/33.5	4.3	0,0003
--------------	---------------------------	---	-----	-----	----	----	---	-----------	-----------	-----	--------

## 2. ENERGY

### Glycolysis and Gluconeogenesis

gi 295672732	Enolase	8	24h	73	56	92	3	5.81/5.67	44.0/47.4	2.1	0,0057
gi 295672732	Enolase	9	24h	109	37	102	4	6.26/8.93	44.0/43.8	1.7	0,0307
gi 295670663	Triosephosphate isomerase	10	24h	84	39	-	-	6.54/5.39	26.0/27.1	3.9	0,0040
gi 295671120	Fructose 1,6-bisphosphate aldolase	11	24h	224	55	323	8	7.25/6.09	35.0/39.7	1.4	0.0209
gi 295672732	Enolase	58	48h	133	60	161	6	6.67/5.79	46.0/47.4	1.6	0,0374

### Oxidation of fatty acids

gi 295662032	Enoyl-CoA hydratase	13	24h	108	59	182	6	8.22/8.89	27.0/32.1	1.6	0.0216
gi 295662032	Enoyl-CoA hydratase	14	24h	66	42	-	-	8.34/8.89	28.0/32.1	2.1	0,0317

### Fermentation

gi 295665123	Aldehyde dehydrogenase	12	24h	59	45	54	3	6.73/5.92	50.0/54.6	2.2	0.010
gi 295665123	Aldehyde dehydrogenase	59	48h	77	29	99	1	6.42/5.87	48.0/54.5	1.4	0,0138

### Tricarboxylic-acid pathway

gi 295673937	Malate dehydrogenase	15	24h	164	63	228	5	7.07/8.99	27.0/36.0	3.0	0.0153
gi 295671817	Succinyl-CoA ligase subunit beta	60	48h	92	66	-	-	4.51/5.74	42.0/48.6	2.4	0,0062

### **Pentose-phosphate pathway**

gi 295663567	6-phosphogluconolactonase	16	24h	56	43	-	-	6.83/5.86	28.0/29.3	1.9	0,0138
gi 295663567	6-phosphogluconolactonase	17	24h	41	39	-	-	6.78/5.82	30.0/29.3	2.1	0,0061

### **3. CELLULAR TRANSPORT, TRANSPORT FACILITIES AND TRANSPORT ROUTE**

gi 295666381	GTP-binding nuclear protein GSP1/Ran	18	24h	78	66	-	-	7.83/6.90	26.0/24.0	2.4	0,0165
gi 225680389	Actin lateral binding protein	19	24h	79	73	52	2	4.31/4.99	21.0/18.8	2.2	0,0094

### **4. PROTEIN WITH BINDING FUNCTION OR COFACTOR REQUIREMENT**

gi 226288621	Actin cytoskeleton protein (VIP1)	20	24h	86	75	-	-	6.63/6.00	33.0/28.3	1.9	0,0477
--------------	-----------------------------------	----	-----	----	----	---	---	-----------	-----------	-----	--------

### **5. PROTEIN FATE**

gi 226286857	Proteasome component Y7	21	24h	76	44	-	-	7.19/6.03	28.0/29.8	2.0	0,0159
gi 295674837	HAD-superfamily hydrolase	22	24h	59	46	-	-	6.06/5.67	27.0/27.3	1.9	0,0067
gi 295660186	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase ssp1	23	24h	59	64	66	4	6.92/6.00	23.0/21.0	10.6	0,0168
gi 225678123	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase cypE	24	24h	55	41	-	-	7.43/6.08	17.0/17.5	3.7	0,00006
gi   295672668	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	25	24h	96	34	76	1	8.44/7.88	19.0/22.8	2.3	0,0045
gi   295657201	Glutamate carboxypeptidase	26	24h	59	16	71	1	6.43/6.23	51.0/64.6	2.9	0,00007

## 6. TRANSCRIPTION

gi 295670367	U2 small nuclear ribonucleoprotein B	27	24h	83	52	-	-	6.61/6.70	29.0/27.4	2.1	0,0094
--------------	--------------------------------------	----	-----	----	----	---	---	-----------	-----------	-----	--------

## 7. PROTEIN SYNTHESIS

gi 295657799	40S ribosomal protein S12	28	24h	42	49	-	-	4.15/5.01	19.0/16.8	3.1	0,0089
--------------	---------------------------	----	-----	----	----	---	---	-----------	-----------	-----	--------

## 8. BIOGENESIS OF CELLULAR COMPONENTS

gi 295657091	Tropomyosin-1	61	48h	49	48	-	-	4.36/4.99	19.0/18.8	3.4	0,0001
--------------	---------------	----	-----	----	----	---	---	-----------	-----------	-----	--------

## 9. CELL RESCUE, DEFENSE AND VIRULENCE

gi 226292459	30 kDa heat shock protein	29	24h	134	38	91	7	7.3/9.68	24.0/28.6	2.8	0,0022 0,00000
gi 17980998	Y20 protein	30	24h	78	51	-	-	7.04/6.09	23.0/21.6	9.4	1
gi 226287383	Heat shock protein	62	48h	72	61	-	-	4.53/5.54	72.0/76.9	6.5	0,0203
gi 295659837	Heat shock protein - SSB1	63	48h	153	47	114	2	5.08/5.47	62.0/60.7	2.0	0.0452
gi 295659837	Heat shock protein - SSB1	64	48h	131	36	57	5	4.51/5.47	60.0/60.6	1.3	0,0115 0,02169
gi 225680766	Heat shock protein	31	24h	43	73	-	-	8.22/6.13	27.0/20.8	1.6	0
gi 295659116	Hsp70-like protein	32	24h	-	-	64	2	3.98/5.08	29.0/70.9	-	*

Functional classification by FunCat2 ([http://pedant.helmholtz-muenchen.de/pedant3htmlview/pedant3view?Method%40analysis&Db%40p3\\_r48325\\_Par\\_brasi\\_Pb01](http://pedant.helmholtz-muenchen.de/pedant3htmlview/pedant3view?Method%40analysis&Db%40p3_r48325_Par_brasi_Pb01))

<sup>a</sup>GenBank general information identifier;

<sup>b</sup>Spots numbers refers to Figure 12,13.

<sup>c</sup>Time in copper starvation condition

<sup>d</sup>Mascot Score

<sup>e</sup>Amino acid sequence coverage for the identified protein;

<sup>f</sup>Number of matched peptides on MS/MS searching;

<sup>g</sup>Experimental molecular weight/isoelectric point;

<sup>h</sup>Theoretical molecular weight/isoelectric point;

<sup>i</sup>Fold change increase in protein expression in copper starvation;

<sup>j</sup> $p \leq 0.05$  was used to considerer statistically significant differences.

\*Spots visualized only in copper-starvation condition.

**Table 3. *Paracoccidioides lutzii* identified proteins with reduced expression during copper starvation.**

Accession number/ Protein description <sup>a</sup>	Spot number <sup>b</sup>	Time <sup>c</sup>	PMF		MS/MS		Exp/Theo pI <sup>g</sup>	Exp/Theo MW <sup>h</sup>	Protein fold change <sup>i</sup>	p-value <sup>j</sup>	
			Score <sup>d</sup>	Seq. Cov (%) <sup>e</sup>	Score <sup>d</sup>	Matched Peptides <sup>f</sup>					
<b>1. METABOLISM</b>											
<b>Amino Acid Metabolism</b>											
gi 295657047 Cystathionine beta-synthase	33	24h	57	32	-	-	6.73/8.69	71.0/55.4	- 1.7	0,0380	
gi 226293104 Spermidine synthase	34	24h	90	31	45	2	5.02/5.33	30.0/33.6	- 2.4	0,0136	
gi 295667671 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	65	48h	126	65	99	4	9.17	36.9	- 1.8	0,0353	
<b>Secondary metabolism</b>											
gi 225677978 2,5-diketo-D-gluconic acid reductase A	35	24h	50	65	-	-	9.44/7.70	59.0/31.6	- 2.3	0,0197	
gi   295666938 Nucleoside diphosphate kinase	36	24h	133	61	96	1	5.47/6.84	35.0/16.8	- 1.3	0,0422	

### Phosphate metabolism

gi 295672504	Inorganic pyrophosphatase	37	24h	131	71	175	8	4.18/5.13	33.0/33.5	- 1.7	0.0316
--------------	---------------------------	----	-----	-----	----	-----	---	-----------	-----------	-------	--------

### Nucleotide metabolism

gi 295672652	Bifunctional purine biosynthesis protein ADE17	38	24h	102	55	52	5	8.37/7.22	63.0/69.4	- 1.8	0,0113
--------------	--	----	-----	-----	----	----	---	-----------	-----------	-------	--------

## 2. ENERGY

### Glycolysis and Gluconeogenesis

gi 295659988	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	39	24h	65	38	-	-	6.22/5.37	66.0/57.3	- 1.5	0,0129
--------------	---	----	-----	----	----	---	---	-----------	-----------	-------	--------

gi 295672732	Enolase	40	24h	41	44	-	-	4.48/5.54	50.0/47.4	- 2.9	0,0225
--------------	---------	----	-----	----	----	---	---	-----------	-----------	-------	--------

gi 295672732	Enolase	41	24h	136	61	180	6	5.60/5.67	49.0/47.4	- 1.2	0.0160
--------------	---------	----	-----	-----	----	-----	---	-----------	-----------	-------	--------

gi 295670663	Triosephosphate isomerase	42	24h	131	83	207	6	5.42/5.39	26.0/27.1	- 1.3	0.2479
--------------	---------------------------	----	-----	-----	----	-----	---	-----------	-----------	-------	--------

### Fermentation

gi 295674635	Alcohol dehydrogenase	66	48h	205	69	62	1	8.76/7.55	36.0/38.0	- 1.6	0,0471
--------------	-----------------------	----	-----	-----	----	----	---	-----------	-----------	-------	--------

### Tricarboxylic-acid pathway

gi 295671817	Succinyl-CoA ligase subunit beta	43	24h	107	44	-	-	4.60/5.74	44.0/48.6	- 3.4	0,0017
--------------	----------------------------------	----	-----	-----	----	---	---	-----------	-----------	-------	--------

gi 295658897	Citrate synthase	67	48h	126	33	82	3	8.40/8.75	44.0/52.2	- 1.1	0,0004
--------------	------------------	----	-----	-----	----	----	---	-----------	-----------	-------	--------

gi 295673937	Malate dehydrogenase	68	48h	207	47	121	5	8.12/8.99	31.0/36.0	- 1.7	0.0072
--------------	----------------------	----	-----	-----	----	-----	---	-----------	-----------	-------	--------

### **Electron Transport and Membrane-associated energy conservation**

gi 226287911	ATP synthase subunit beta	44	24h	125	49	178	6	4.11/5.33	57.0/55.2	- 1.4	0,0267
--------------	---------------------------	----	-----	-----	----	-----	---	-----------	-----------	-------	--------

### **3. PROTEIN WITH BINDING FUNCTION OR COFACTOR REQUIREMENT**

gi 295672445	Alanyl-tRNA synthetase	45	24h	93	42	-	-	5.89/5.52	93.0/108.4	- 1.8	0,0363
--------------	------------------------	----	-----	----	----	---	---	-----------	------------	-------	--------

### **4. PROTEIN FATE**

gi 225684776	Mitochondrial co-chaperone GrpE	46	24h	41	64	-	-	4.63/6.05	24.0/26.2	- 3.4	0,0003
--------------	---------------------------------	----	-----	----	----	---	---	-----------	-----------	-------	--------

### **5. CELLULAR TRANSPORT, TRANSPORT FACILITIES AND TRANSPORT ROUTE**

gi 295667117	BAR domain-containing protein	47	24h	56	58	-	-	5.4/5.48	43.0/33.6	- 5.7	0,0000 3
--------------	-------------------------------	----	-----	----	----	---	---	----------	-----------	-------	-------------

### **6. CELL CYCLE AND DNA PROCESSING**

gi 38569374	14-3-3-like protein 2	48	24h	75	65	-	-	4.01/4.68	45.0/29.7	- 3.1	0,0087
-------------	-----------------------	----	-----	----	----	---	---	-----------	-----------	-------	--------

### **7. CELL RESCUE,DEFENSE AND VIRULENCE**

gi 295658865	Heat shock protein	49	24h	180	57	90	8	5.28/5.51	59.0/62.3	- 2.7	0.0033
--------------	--------------------	----	-----	-----	----	----	---	-----------	-----------	-------	--------

gi 295659787	Heat shock protein Hsp88	50	24h	208	61	104	3	4.40/4.92	83.0/80.6	- 3.1	0.0367
--------------	--------------------------	----	-----	-----	----	-----	---	-----------	-----------	-------	--------

gi 295658865	Heat shock protein	51	24h	357	64	145	7	4.71/5.51	58.0/62.2	- 3.2	0.0011
--------------	--------------------	----	-----	-----	----	-----	---	-----------	-----------	-------	--------

gi 295659787	Heat shock protein Hsp88	52	24h	243	57	234	3	4.54/4.92	90.0/80.6	- 4.8	0.0409
--------------	--------------------------	----	-----	-----	----	-----	---	-----------	-----------	-------	--------

gi 14538021	Hsp70-like protein	53	24h	207	43	95	4	4.58/5.05	67.0/70.9	- 4.6	0.0015
-------------	--------------------	----	-----	-----	----	----	---	-----------	-----------	-------	--------

gi 295659837	Shock protein térmic- SSB1	54	24h	180	32	178	3	4.59/5.47	49.0/60.6	- 1.4	0.2299
--------------	----------------------------	----	-----	-----	----	-----	---	-----------	-----------	-------	--------

Functional classification by FunCat2 ([http://pedant.helmholtz-muenchen.de/pedant3htmlview/pedant3view?Method!4analysis&Db!4p3\\_r48325\\_Par\\_bras\\_i\\_Pb01](http://pedant.helmholtz-muenchen.de/pedant3htmlview/pedant3view?Method!4analysis&Db!4p3_r48325_Par_bras_i_Pb01))

<sup>a</sup>GenBank general information identifier;

<sup>b</sup>Spots numbers refers to Figure 12,13.

<sup>c</sup>Time in copper starvation condition

<sup>d</sup>Mascot Score

<sup>e</sup>Amino acid sequence coverage for the identified protein;

<sup>f</sup>Number of matched peptides on MS/MS searching;

<sup>g</sup>Experimental molecular weight/isoelectric point;

<sup>h</sup>Theoretical molecular weight/isoelectric point;

<sup>i</sup>Fold change increase in protein expression in copper starvation;

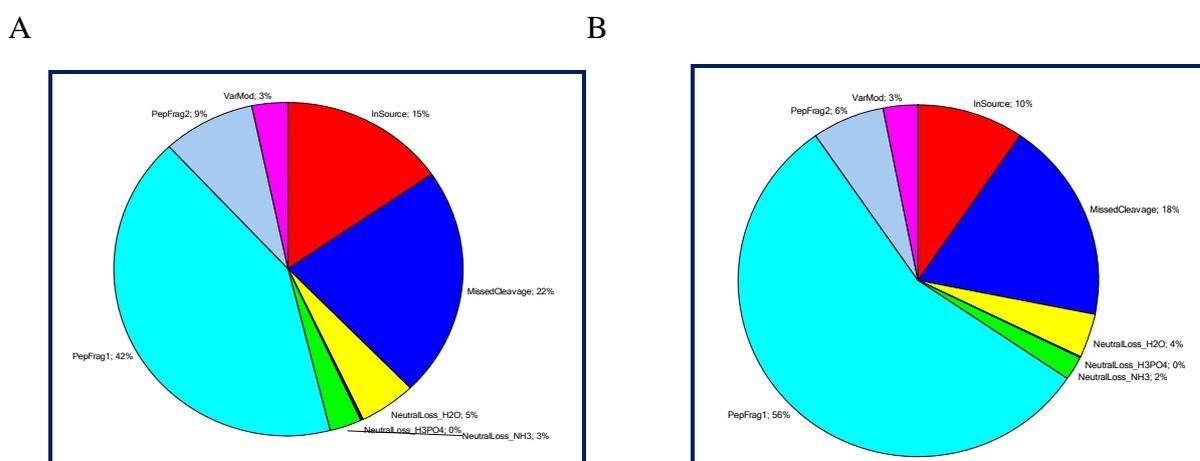
<sup>j</sup> $p \leq 0.05$  was used to considerer statistically significant differences.

\*Spots visualized only in copper-starvation condition.

## 5.5 Análise proteômica através de NanoUPLC-MS<sup>E</sup>

A abordagem proteômica foi também realizada usando NanoUPLC-MS<sup>E</sup> como previamente descrito (Murad *et al*, 2011). Este método tem mostrado melhorar a acurácia da cobertura da proteína quando comparado com abordagem convencional LC-MS/MS (Murad *et al*, 2011).

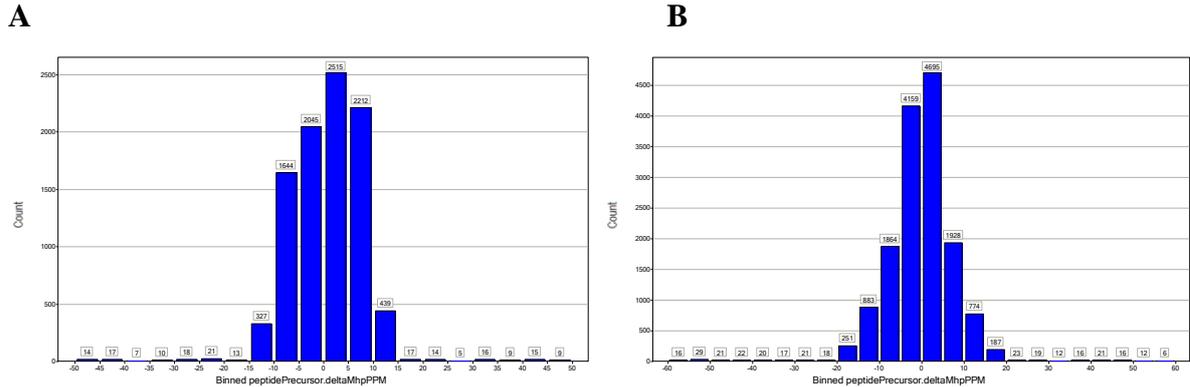
Os resultados da expressão das proteínas e peptídeos pelo NanoUPLC-MS<sup>E</sup> e os dados gerados pelo processo PLGS são mostrados (Figuras 14, 15, 16).



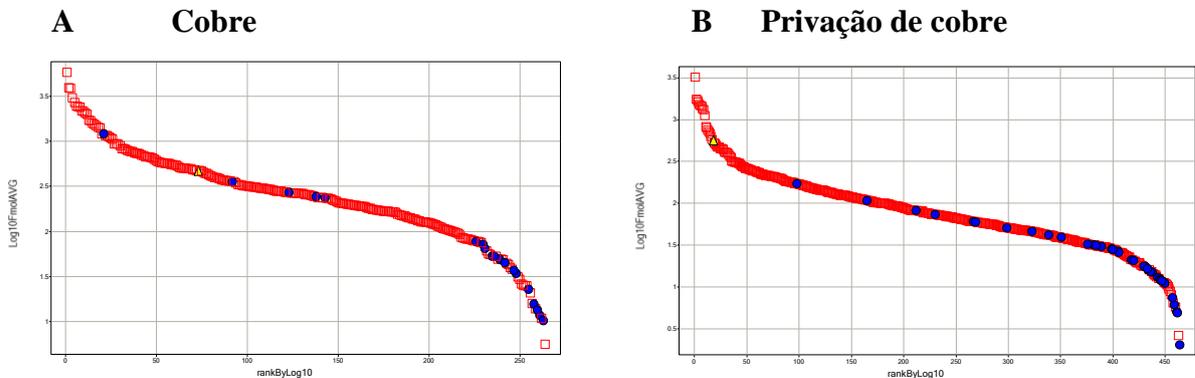
**Figura 14. Qualidade dos peptídeos para as amostras controle (A) e com privação de cobre (B).** O gráfico de pizza mostra o percentual de peptídeos comparado com o banco de dados de *Paracoccidioides lutzii* no PLGS (PepFrag 1 e PepFrag 2), modificações variáveis (VArMod), fragmentação que ocorreu na fonte de ionização (InSource), clivagem perdida realizada pela tripsina (Missed Cleavage) e perda Neutra correspondente a água (H<sub>2</sub>O) e amônia (NH<sub>3</sub>) precursoras para as condições de controle (A) e privação de cobre (B). Foi utilizado o programa Spotfire Decision Site 8,0 v. Os parâmetros PepFrag deve ser predominante, em contraste com InSource e clivagem perdida que não deve chegar a 20%.

A taxa de proteínas falso positivas, na presença de cobre e privação de cobre foram 0,34 e 0,27%, respectivamente. Os experimentos resultaram em 3.324 e 3.840 peptídeos identificados respectivamente, onde 42 e 56% destes foram obtidos de fragmentos dos peptídeos, dados do primeiro passo e 9 e 6% do segundo passo para a condições de cobre e privação de cobre, respectivamente (Figura 14). Um total de 22 e 18% do total de peptídeos foi identificado pela clivagem perdida de tripsina nas condições de presença cobre ou privação de cobre, respectivamente, ao passo que a taxa de fragmentação que ocorreu na fonte de ionização foi de 15 e 10% para as condições de presença de cobre ou privação de cobre,

respectivamente (Fig 14). A figura 15, mostra as partes por milhão de peptídeos de erro (ppm), indicando que a maioria, 94.8 e 95.7% dos peptídeos identificados foram detectados com um erro de menos de 5 e 10 ppm, nas condições de cobre ou privação de cobre, respectivamente. Os resultados apresentados na figura 16, a partir da obtenção da dinâmica de qualidade, indicou que a concentração no intervalo de 3log é uma boa distribuição de detecção de altos e baixos pesos moleculares, como indicado pelo tamanho dos quadrados.



**Figura 15. Análise da acurácia da massa dos peptídeos.** Os dados dos peptídeos foram usados para o gráfico de barras que mostra a acurácia da massa para os peptídeos em amostras com a presença de cobre e na privação de cobre. Um total de 94,3 e 95,2% de peptídeos identificados foram detectados numa faixa de 5 e 10 ppm de erro nas amostras, na presença de cobre (A) e privação de cobre (B), respectivamente.

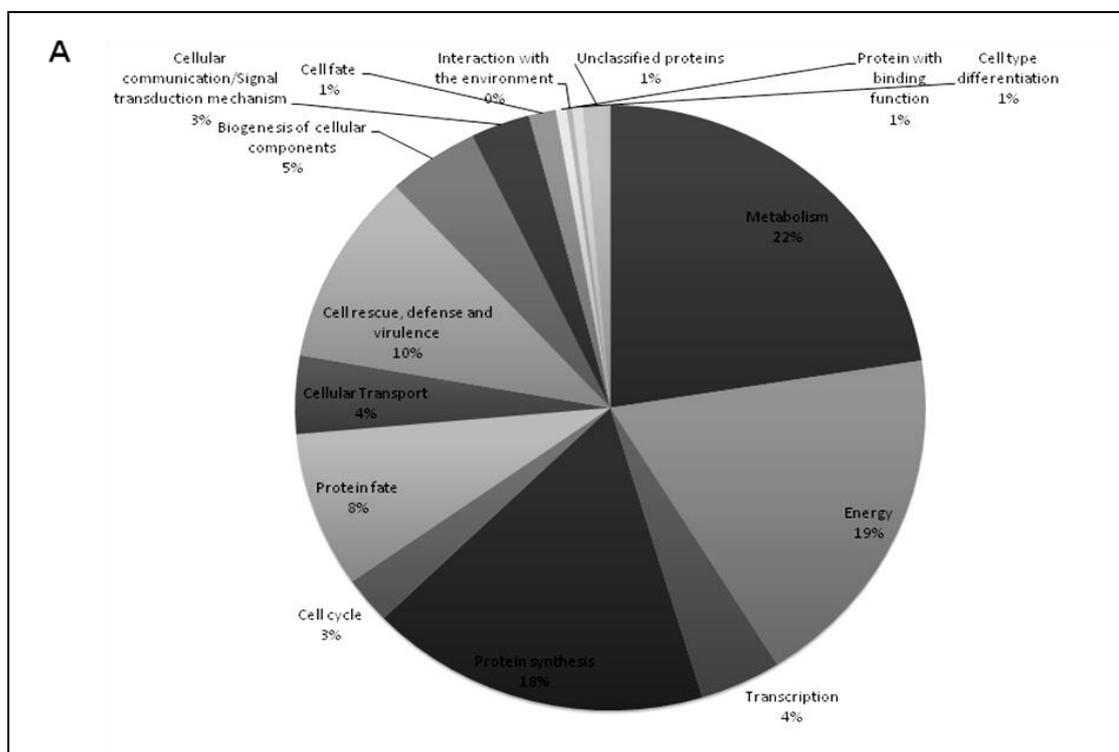


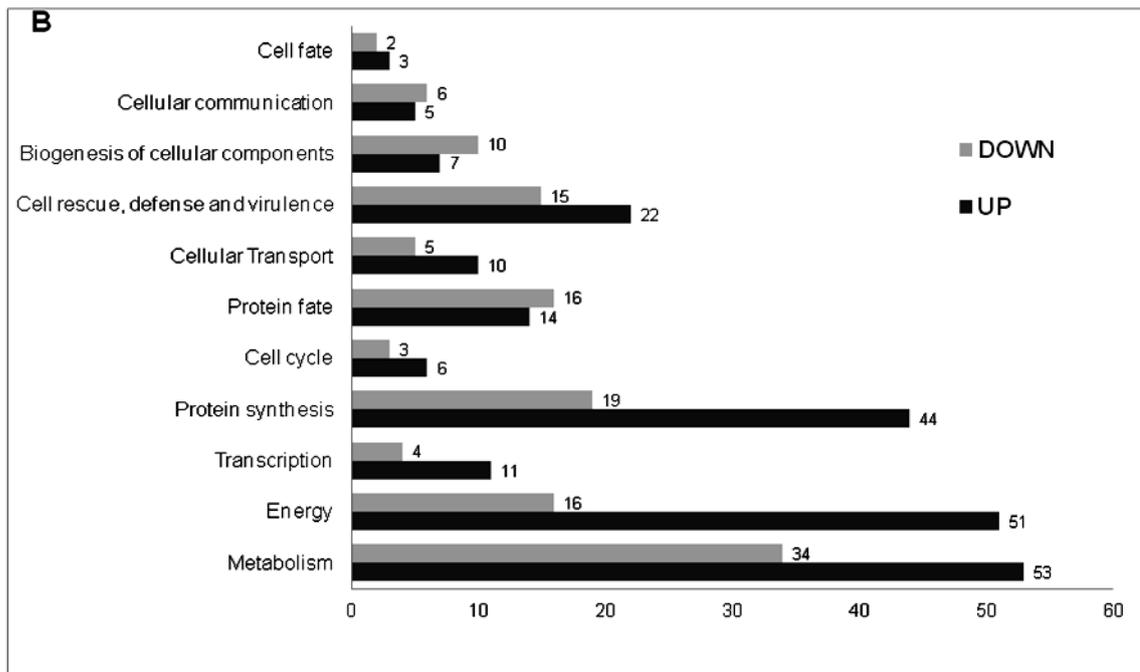
**Figura 16. A obtenção da dinâmica de qualidade da análise proteômica.** Foi realizado a obtenção da dinâmica de qualidade do experimento de proteômica para cada condição. Gráficos do controle (A) e Privação de cobre (B) são mostrados. Proteínas constantes, reversas, e as proteínas padrão foram indicados pelo vermelho / círculo, azul / triângulo, amarelo, respectivamente. As proteínas constantes e reversas indicam proteínas identificadas usando o banco de dados do genoma de *Paracoccidioides lutzi*. A proteína padrão é usada para normalizar os dados de expressão e comparar as proteínas do controle e privação de cobre. Os nossos dados mostraram uma quantificação de proteína padrão aceitável entre ambas as condições.

## 5.6 Identificação das proteínas de *P. lutzii* através do nano-ESI-UPLC-MS<sup>E</sup>

Um total de 366 proteínas diferencialmente expressas foram identificadas. Um fold change de 20% foi usado como limite para determinar as proteínas induzidas e reprimidas. Os processos biológicos e a porcentagem de proteínas induzidas e reprimidas em cada classificação de categoria são mostrados na Figura 17.

A análise proteômica mostrou que proteínas associadas com o metabolismo foram mais representativas durante 48h em condições de privação de cobre. Nessa categoria foram representados os metabolismos de aminoácidos: C-composto/Carboidrato, Vitaminas/Cofatores, Nitrogênio/Enxofre (Fig 17 A). Todas estas subcategorias mostraram proteínas mais induzidas do que reprimidas (Tabelas 4 e 5). Outras categorias apresentaram um número elevado de proteínas reguladas, como Síntese de proteínas, Energia, Defesa e Virulência celular, Transcrição e Transporte celular (Fig 17 B). Por outro lado, os processos envolvidos com Endereçamento de proteínas, Biogênese dos componentes celulares e Comunicação celular/Transdução de sinal apresentaram uma expressão diminuída em condições de depleção de cobre (Fig 17B).





**Figura 17. Níveis de classificação funcional e abundância de proteínas reguladas em *Paracoccidioides lutzii* sob privação de cobre obtidos por dados NanoUPLC-MS<sup>E</sup>.** Os processos biológicos das proteínas diferencialmente expressas foram obtidos de acordo com a categoria funcional do MIPS ([http://pedant.helmholtz-muenchen.de/pedant3htmlview/pedant3view?Method = analysis&Db = p3\\_r48325\\_Par\\_brasi\\_Pb01](http://pedant.helmholtz-muenchen.de/pedant3htmlview/pedant3view?Method=analysis&Db=p3_r48325_Par_brasi_Pb01)) e o banco de dados do Uniprot (<http://www.uniprot.org/>). **A)** Categorização das proteínas diferencialmente expressas durante privação de cobre. **B)** Classificação das proteínas com expressão induzida e reprimida em condições de privação de cobre.

Dentre as proteínas identificadas, um total de 22% foram agrupadas dentro do processo do Metabolismo (Fig 17A). Sob condições de privação de cobre houve um elevado número de enzimas relacionadas com o metabolismo de aminoácidos tais como Serina hidroximetiltransferase, Isovaleryl CoA desidrogenase, 4-aminobutirato aminotransferase, Ornitina aminotransferase, Sacaporina desidrogenase, sendo a grande maioria relacionada com a degradação de aminoácidos, os quais fornece precursores ao ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) como Acetil CoA,  $\alpha$ -cetogluturato, Succinil CoA e Fumarato. O aumento da enzima Isovaleryl CoA desidrogenase envolvida no metabolismo de ácidos graxos poderá gerar Acetil-CoA. Desta maneira a degradação dos aminoácidos fornece substratos para o metabolismo de lipídeos e para o ciclo do TCA de modo a obter energia aerobicamente (Fig. 18, Tabela 4).

A biossíntese de aminoácidos também foi induzida na ausência de cobre, com síntese da Cisteína, Triptofano e Valina, Leucina, Isoleucina, derivados da via glicolítica, pelo 3-fosfoglicerato, Fosfoenolpiruvato e Piruvato, respectivamente. Biossíntese de Histidina derivada da Ribose-5-fosfato pertencente à via das pentoses-fosfato. Síntese da Asparagina, Metionina, Treonina, Lisina, Fenilalanina e Tirosina e Arginina, derivados dos intermediários do ciclo do ácido cítrico, oxaloacetato, fumarato e  $\alpha$ -cetogluturato, respectivamente. Tomando estes dados em conjunto, podemos sugerir que *P. lutzii* aumentou a expressão de enzimas relacionadas à síntese dos aminoácidos, possivelmente para ofertar quantidades suficientes destes aminoácidos aos diferentes processos celulares, como produção de energia.

Proteínas relacionadas com o metabolismo de lipídeos, tais como 3-Cetoacil-CoA tiolase, Acetil CoA acetiltransferase, Ácido graxo sintase subunidade alfa redutase e Ácido graxo sintase subunidade beta redutase, Acil CoA desidrogenase, foram induzidos em 24 e 48 h de privação de cobre (Fig. 18, Tabela 4).

A segunda categoria de classificação das proteínas que foram induzidas está no grupo dos processos energéticos. Enzimas da via glicolítica, incluindo glicose-6-fosfato isomerase, Enolase, Piruvato cinase, Frutose bifosfato aldolase, Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, Fosfoglicerato cinase foram induzidas. A indução ocorreu principalmente em 48 h de depleção de cobre (Fig. 18, Tabela 4). As enzimas aumentadas na via glicolítica, fornecem ATP e intermediários metabólicos no qual o fungo utiliza para manter sua sobrevivência.

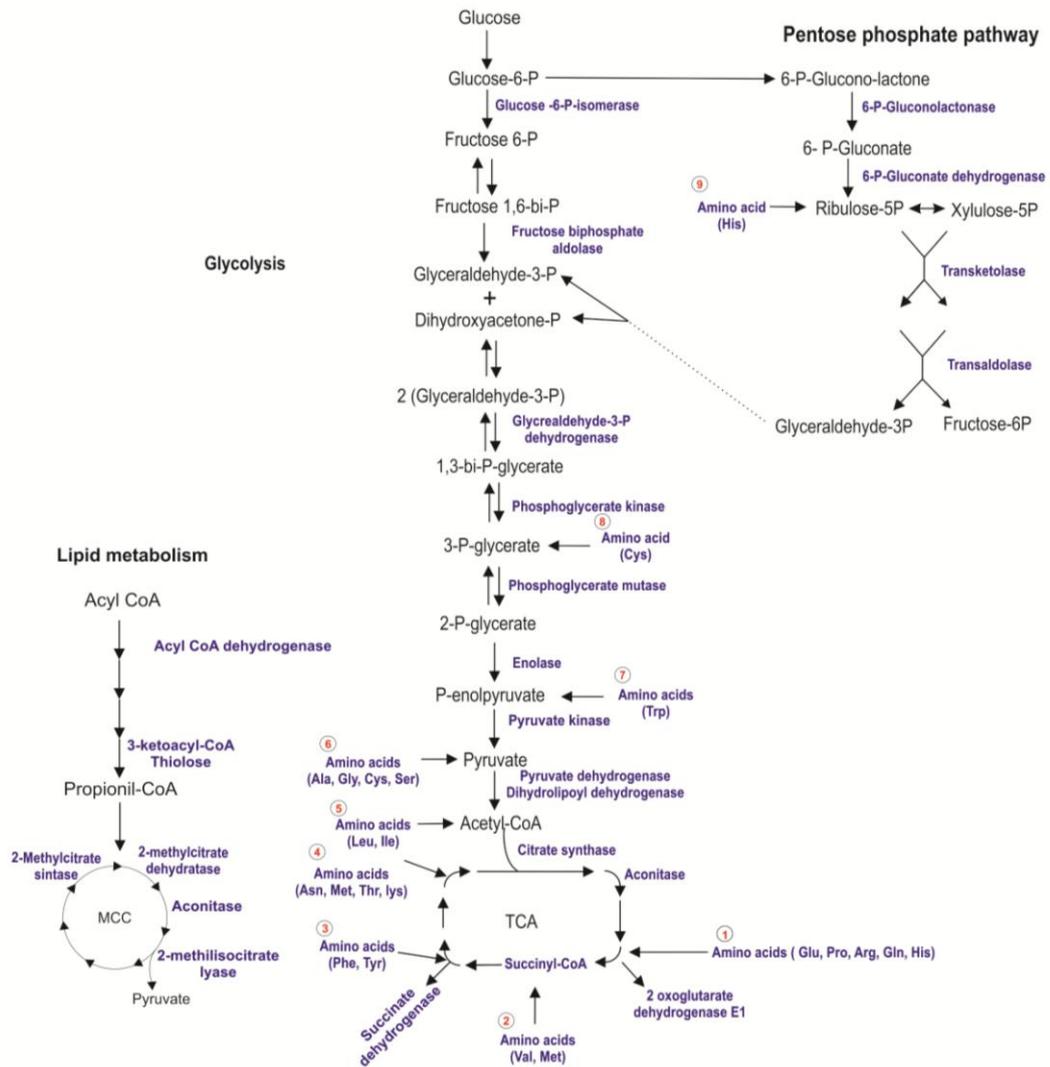
Houve também uma indução de proteínas envolvidas no ciclo do ácido tricarbóxico (TCA), incluindo a Citrato sintase, Aconitase, Piruvato desidrogenase, Succinil CoA, 2-oxogluturato desidrogenase E1 nos tempos de 24 e 48 h durante depleção de cobre (Fig. 18, Tabela 4). O Piruvato, produto da glicólise, é convertido a Acetil-CoA fornecendo substrato para o ciclo do TCA, pelo complexo da Piruvato desidrogenase. As enzimas envolvidas na glicólise, metabolismo de lipídeos e aminoácidos que foram induzidas, são oxidados a  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  pelo ciclo do ácido cítrico e pela cadeia respiratória, produzindo energia de forma aeróbia.

As enzimas da via das pentoses fosfato, incluindo 6-fosfogliconolactonase, 6-fosfogliconato desidrogenase, Transcetolase foram induzidas na privação de cobre nos tempos de 24 e 48 h (Fig.18, Tabela 4). A indução desta via, supostamente está relacionada com a produção de NADPH para processos biossintéticos ou degradação das espécies reativas de oxigênio, que são produzidos pelo metabolismo aeróbio.

Proteínas de *P. lutzii* envolvidas com a via alternativa de fornecimento de carbono, como o ciclo do metilcitrato foram induzidas nos tempos de 24 e 48 h durante depleção de cobre. Essas enzimas foram 2-metilcitrato sintase, 2-metilcitrato desidrogenase e 2-metilisocitrato liase (Fig.18, Tabela 4). O ciclo do metilcitrato utiliza ácidos graxos de cadeia ímpar e os aminoácidos valina, isoleucina e metionina, essas enzimas foram induzidas na privação de cobre fornecendo substrato para a oxidação de propionil-CoA a piruvato.

Também detectamos um aumento da regulação de enzimas *P. lutzii* relacionadas com a síntese de proteínas, incluindo as Proteínas ribossomais, os Fatores de alongação, Valil RNAt sintase, Histidil RNAt sintase e Fenilalanil RNAt sintase cadeia alfa (Tabela 4). Outro processo celular que afetou o *P. lutzii* durante a privação de cobre foi o Resgate celular, Defesa e Virulência, representando um total de 22 proteínas induzidas pela privação de cobre (Tabela 4). Dentro dessa categoria 17 proteínas da família das proteínas heat shock foram induzidas, principalmente após 48h de privação de cobre (Tabela 4). O nível de expressão aumentada das HSPs em *P. lutzii* durante a privação de cobre, pode estar relacionado com a atividade dessas proteínas como chaperonas.

Nós identificamos um total de 134 proteínas reprimidas em resposta à privação de cobre (Tabela 5). As proteínas relacionadas à processos metabólicos que diminuíram em abundância durante a privação de cobre foram, o Endereçamento de proteínas, Comunicação celular, Biogênese dos componentes celulares e algumas proteínas antioxidantes, tais como Tioredoxina, Peroxiredoxina e CuZn-superóxido dismutase (Tabela 5).



**Figura 18. Visão dos processos metabólicos de *Paracoccidioides lutzii* regulados durante a privação de cobre revelado por análises proteômicas.** A figura resume os dados obtidos por análises proteômicas e sugere os mecanismos usados por este fungo para sobreviver durante a depleção de cobre. As proteínas induzidas estão coloridas de azul e estão relacionadas com os seguintes processos metabólicos: Via glicolítica, Via das pentoses-fosfato, Ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), Metabolismo de lipídeos e Ciclo do metilcitrato. Os números 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 indicam os aminoácidos induzidos envolvidos com a produção do  $\alpha$ -cetogluturato, succinil CoA, fumarato, oxaloacetato, acetil CoA, piruvato, fosfenolpiruvato, 3-fosfoglicerato e ribulose-5-fosfato, respectivamente. 1) produção do  $\alpha$ -cetogluturato: Glutamato (Glu), Prolina (Pro), Arginina (Arg), Glutamina (Gln) e Histidina (His). 2) produção de succinil CoA: Valina (Val), Metionina (Met). 3) produção de fumarato: Fenilalanina (Phe) e Tirosina (Tyr). 4) produção de oxaloacetato: Asparagina (Asn), Metionina (Met), Treonina (Thr) e Lisina (Lys). 5) produção de Acetil-CoA: Leucina (Leu) e Isoleucina (Ile). 6) produção de piruvato: Alanina (Ala), Glicina (Gly), Cisteína (Cys), Serina (Ser). 7) produção de fosfenolpiruvato: Triptofano (Trp). 8) produção de 3-fosfoglicerato: Cisteína (Cys). 9) produção de ribulose-5-fosfato: Histidina (His).

### **5.7 Análise comparativa entre as análises proteômicas de *P. lutzii* por eletroforese bidimensional e nano-ESI-UPLC-MS<sup>E</sup>**

Foi possível identificar 68 proteínas/isoformas por eletroforese bidimensional (2-DE), sendo 42 com expressão aumentada em condições de depleção de cobre e 26 com expressão diminuída em condições de depleção de cobre, como ilustrado nas Fig 12 e 13, Tabelas 2 e 3. Através do nano-ESI-UPLC-MS<sup>E</sup> um total de 366 proteínas diferencialmente expressas foram identificadas sendo 232 induzidas e 134 reprimidas Tabelas 4 e 5.

Proteínas envolvidas no metabolismo de aminoácidos, na via da glicólise e defesa e virulência como as proteínas de choque térmico estão entre proteínas acumuladas preferencialmente nas amostras submetidas à depleção de cobre, analisadas por eletroforese bidimensional (Tabela 2), essas vias também apresentaram-se induzidas nas análises por nano-ESI-UPLC-MS<sup>E</sup> (Tabela 4).

As proteínas de *P. lutzii* com expressão reduzida durante depleção de cobre mostradas na Tabela 3 e analisadas por eletroforese 2-DE, foram distribuídas entre as diversas categorias funcionais como metabolismo, energia, transporte de elétrons, defesa e virulência, contudo não houve dentre as classes uma maior abundância na diferenciação das proteínas, no entanto, podemos observar na tabela 4, nas análises por nano-ESI-UPLC-MS<sup>E</sup> que os processos metabólicos que diminuíram em abundância durante a privação de cobre foram o Endereçamento de proteínas, Comunicação celular, Biogênese dos componentes celulares e algumas proteínas antioxidantes, tais como Tioredoxina, Peroxiredoxina e CuZn-superóxido dismutase .

**Table 4. The most abundant up-regulated proteins of *Paracoccidioides Lutzii* yeast cells under copper starvation detected using NanoUPLC-MS.**

Accession number <sup>a</sup>	Time <sup>b</sup>	Protein description <sup>c</sup>	Fold Change (log2) <sup>d</sup>
<b>1. METABOLISM</b>			
<b>Amino Acid Metabolism</b>			
PAAG_00468	24h	4 aminobutyrate aminotransferase	0,55
PAAG_04701	24h	cystathionine gamma lyase	0,58
PAAG_07036	24h	methylmalonate semialdehyde dehydrogenase	0,32
PAAG_08065	24h	aspartate semialdehyde dehydrogenase	0,48
PAAG_04102	24h	isovaleryl CoA dehydrogenase	0,58
PAAG_05776	24h	dihydroxy acid dehydratase	*
PAAG_05018	24h	allantoate amidohydrolase	*
PAAG_02693	48h	saccharopine dehydrogenase	0,59
PAAG_07626	48h	Cobalamin independent synthase	0,78
PAAG_07114	48h	argininosuccinate synthase	0,35
PAAG_02901	48h	S adenosylmethionine synthetase	0,89
PAAG_08512	48h	serine hydroxymethyltransferase	0,53
PAAG_01002	48h	NAD specific glutamate dehydrogenase	1,82
PAAG_05253	48h	delta 1 pyrroline 5 carboxylate dehydrogenase	1,17
PAAG_08065	48h	aspartate semialdehyde dehydrogenase	0,92
PAAG_03045	48h	aminomethyltransferase	0,43
PAAG_00850	48h	glucosamine fructose 6 phosphate aminotransferase	1,74
PAAG_04401	48h	branched chain amino acid aminotransferase	0,81
PAAG_05005	48h	anthranilate synthase component	0,33
PAAG_07089	48h	homocitrate synthase	0,5
PAAG_06431	48h	ornithine aminotransferase	0,75
PAAG_08163	48h	fumarylacetoacetase	0,33
PAAG_08100	48h	O acetylhomoserine thiol lyase	0,99
PAAG_09095	48h	ATP phosphoribosyltransferase	1,3
PAAG_01568	48h	glycine dehydrogenase	*
PAAG_06387	48h	homoisocitrate dehydrogenase	*
PAAG_08313	48h	L PSP endoribonuclease family protein Hmf	0,92
PAAG_07412	48h	serine hydroxymethyltransferase	0,59
PAAG_04904	48h	ATP binding cassette sub family F member	0,62
PAAG_00340	48h	homogentisate 1,2-dioxygenase	0,85

---

**Lipid, fatty acid and isoprenoid metabolism**

---

PAAG_02664	24h	3 ketoacyl CoA thiolase	0,46
PAAG_03689	24h	3 ketoacyl CoA thiolase B	0,62
PAAG_05151	48h	ATP citrate lyase	1,27
<b>PAAG_01525</b>	48h	fatty acid synthase subunit alpha reductase	0,92
PAAG_01524	48h	fatty acid synthase subunit beta dehydratase	1,17

**C-compound and carbohydrate metabolism**

PAAG_02859	24h	adenosylhomocysteinase	0,32
PAAG_05093	24h	succinyl CoA 3 ketoacid coenzyme A transferase	0,35
PAAG_00889	24h	phosphomannomutase	*
PAAG_00545	48h	glycogen phosphorylase	2,02
PAAG_02382	48h	quinone oxidoreductase	0,68
PAAG_08174	48h	mannose 1 phosphate guanyltransferase subunit	0,43
PAAG_00685	48h	alpha mannosidase	0,75
PAAG_01465	48h	carbonic anhydrase	*

**Nucleotide/nucleoside/nucleobase metabolism**

PAAG_05611	24h	deoxyuridine 5 triphosphate nucleotidohydrolase	0,27
------------	-----	---	------

**Nitrogen, sulfur and selenium metabolism**

PAAG_07811	24h	sulfite oxidase	0,5
PAAG_01321	24h	oxidoreductase 2 nitropropane dioxygenase	0,53
PAAG_03333	24h	formamidase	*
PAAG_01321	48h	oxidoreductase 2 nitropropane dioxygenase	1,08
PAAG_03333	48h	formamidase	0,27
PAAG_07811	48h	sulfite oxidase	0,88

**Metabolism of vitamins, cofactors, and prosthetic groups**

PAAG_08856	24h	nicotinate nucleotide pyrophosphorylase	*
PAAG_04443	24h	spermidine synthase	1,12
PAAG_07321	48h	pyridoxine biosynthesis protein PDX1	0,53

**2. ENERGY****Glycolysis and Gluconeogenesis**

---

PAAG_00771	24h	enolase	0,29
PAAG_06526	48h	glucose 6 phosphate isomerase	0,39
PAAG_03243	48h	Aldose 1-epimerase family protein	1,10
PAAG_00771	48h	enolase	0,52
PAAG_06380	48h	pyruvate kinase	1,12
PAAG_01995	48h	fructose bisphosphate aldolase	0,63
PAAG_02869	48h	phosphoglycerate kinase	0,86
PAAG_08468	48h	glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase	0,49
PAAG_02011	48h	phosphoglucomutase	0,45
PAAG_00726	48h	pyruvate carboxylase	0,84
PAAG_07410	48h	2,3 bisphosphoglycerate independent phosphoglycerate mutase	0,37
<b>Tricarboxylic-acid pathway</b>			
PAAG_03330	24h	dihydrolipoyl dehydrogenase	0,32
PAAG_08075	24h	citrate synthase	0,52
PAAG_01725	24h	succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	*
PAAG_02732	24h	2 oxoglutarate dehydrogenase E1	*
PAAG_01534	24h	pyruvate dehydrogenase E1 component subunit	0,39
PAAG_00050	24h	pyruvate dehydrogenase protein X component	*
PAAG_03296	24h	Aconitase	0,35
PAAG_05048	48h	Aconitase	1,27
PAAG_08295	48h	pyruvate dehydrogenase E1 component subunit	0,98
PAAG_05150	48h	ATP citrate synthase subunit	1,72
PAAG_00417	48h	succinyl CoA ligase subunit alpha	0,81
PAAG_08075	48h	citrate synthase	0,6
PAAG_01463	48h	succinyl CoA ligase subunit beta	1,10
PAAG_03330	48h	dihydrolipoyl dehydrogenase	1,21
PAAG_08915	48h	dihydrolipoamide succinyltransferase	0,72
<b>Glyoxylate cycle</b>			
PAAG_06951	48h	isocitrate lyase	*
<b>Oxidation of fatty acids</b>			
PAAG_07786	24h	acetyl CoA acetyltransferase	0,39
PAAG_06224	24h	carnitine O acetyltransferase	0,36
PAAG_05454	24h	acyl CoA dehydrogenase	*
PAAG_07786	48h	acetyl CoA acetyltransferase	1,54

<b>Pentose-phosphate pathway</b>			
PAAG_04166	24h	transaldolase	0,45
PAAG_05621	24h	6 phosphogluconolactonase	*
PAAG_01178	24h	6 phosphogluconate dehydrogenase	*
PAAG_04444	48h	transketolase	0,59
PAAG_01178	48h	6 phosphogluconate dehydrogenase	1,10
PAAG_05621	48h	6 phosphogluconolactonase	0,84
<b>Electron Transport and Membrane-associated energy conservation</b>			
PAAG_04820	24h	ATPase alpha subunit	0,72
PAAG_08037	24h	ATP synthase subunit beta	0,75
PAAG_07246	24h	cytochrome-c oxidase chain VI	0,69
PAAG_01603	48h	cytochrome b2	*
<b>Fermentation</b>			
PAAG_05249	24h	aldehyde dehydrogenase	1,6
PAAG_02050	24h	pyruvate decarboxylase	2,00
PAAG_01465	48h	pyruvate decarboxylase	*
<b>Metabolism of Energy Reserves</b>			
PAAG_06817	24h	UTP glucose 1 phosphate uridylyltransferase	0,32
<b>Methylcitrate cycle</b>			
PAAG_04549	24h	mitochondrial 2 methylisocitrate lyase	*
PAAG_04559	24h	2 methylcitrate dehydratase	0,29
PAAG_04559	48h	2 methylcitrate dehydratase	0,58
PAAG_04550	48h	2 methylcitrate synthase	0,66
<b>3.0 TRANSCRIPTION</b>			
<b>RNA synthesis</b>			
PAAG_04814	24h	nucleic acid binding protein	0,35
PAAG_01393	24h	NAm1 predicted protein	*
PAAG_07098	24h	histone H4	*
PAAG_06886	48h	zinc finger protein GIS2	0,68

PAAG_07099	48h	histone H3	0,39
PAAG_07098	48h	histone H4	0,56
PAAG_06891	48h	mRNA binding post transcriptional regulation	0,55
PAAG_03649	48h	WD repeat containing protein	1,15

### RNA processing

PAAG_00244	24h	polyadenylate binding protein	0,36
PAAG_03277	48h	pre mRNA processing factor	0,71
PAAG_00297	48h	STF2-like protein	0,85

## 4.0 PROTEIN SYNTHESIS

### Ribosome Biogenesis

PAAG_03322	24h	40S ribosomal protein S20	0,43
PAAG_07841	24h	60S acidic ribosomal protein P1	1,69
PAAG_02111	24h	40S ribosomal protein S0	1,23
PAAG_09096	24h	40S ribosomal protein S28	1,11
PAAG_09083	24h	TCTP family protein	1,67
PAAG_04425	24h	60S ribosomal protein L22	*
PAAG_05778	24h	40S ribosomal protein S19	*
PAAG_05590	24h	60S ribosomal protein L12	0,92
PAAG_04690	24h	40S ribosomal protein S15	*
PAAG_05484	24h	40S ribosomal protein S5	*
PAAG_00969	48h	60S ribosomal protein L15	1,05
PAAG_09043	48h	40S ribosomal protein S2	0,63
PAAG_00952	48h	60S ribosomal protein L20	0,65
PAAG_05484	48h	40S ribosomal protein S5	0,39
PAAG_07182	48h	40S ribosomal protein S7	0,48
PAAG_02634	48h	ribosomal protein S6	0,60
PAAG_07955	48h	60S ribosomal protein L18	0,58
PAAG_00430	48h	60S ribosomal protein L2	0,58
PAAG_01052	48h	60S ribosomal protein L10 B	0,43
PAAG_08888	48h	60S ribosomal protein L4 A	0,43
PAAG_04965	48h	60S ribosomal protein L31	0,56
PAAG_00264	48h	40S ribosomal protein S8 B	0,85
PAAG_06320	48h	60S ribosomal protein L13	0,63
PAAG_05590	48h	60S ribosomal protein L12	0,46
PAAG_03827	48h	60S ribosomal protein L21 A	0,48
PAAG_03816	48h	40S ribosomal protein S4	0,49
PAAG_00088	48h	60S ribosomal protein L3	0,89

PAAG_08955	48h	40S ribosomal protein S3aE	0,71
PAAG_01433	48h	40S ribosomal protein S14	0,65
PAAG_01785	48h	40S ribosomal protein S3	0,43
PAAG_07841	48h	60S acidic ribosomal protein P1	0,3

### Translation

PAAG_02921	24h	elongation factor Tu	0,33
PAAG_03556	24h	elongation factor 1 gamma	1,99
PAAG_03028	24h	elongation factor 1 beta	2,05
PAAG_02921	48h	elongation factor Tu	0,71
PAAG_03556	48h	elongation factor 1 gamma	0,37
PAAG_07283	48h	ATP dependent RNA helicase FAL1	0,65
PAAG_00689	48h	ATP dependent RNA helicase eIF4A	1,14
PAAG_01425	48h	eukaryotic translation initiation factor	0,75
PAAG_00594	48h	elongation factor 2	0,86
PAAG_02024	48h	elongation factor 1 alpha	0,72

### Aminoacyl-tRNA-synthetases

PAAG_04742	24h	valyl tRNA synthetase	*
PAAG_07028	24h	histidyl tRNA synthetase	*
PAAG_05806	48h	phenylalanyl tRNA synthetase alpha chain	0,79

## 5.0 CELL CYCLE AND DNA PROCESSING

### DNA processing

PAAG_06574	48h	curved DNA binding protein 42 kDa protein	0,55
PAAG_04949	48h	UV excision repair protein Rad23	0,39
PAAG_01986	48h	nucleosome binding protein	0,63

### Cell Cycle

PAAG_03741	24h	HD family hydrolase	*
PAAG_08918	24h	late histone H2B L4	*
PAAG_01695	48h	arsenite resistance protein Ars2	0,89

## 6.0 PROTEIN FATE

### Protein Folding and Stabilization

PAAG_00986	24h	disulfide isomerase Pdi1	0,40
PAAG_01778	24h	peptidyl prolyl cis trans isomerase H	*
PAAG_00986	48h	disulfide isomerase Pdi1	0,49
PAAG_06068	48h	T complex protein 1 subunit beta	0,72

### Protein Modification

PAAG_06536	24h	ubiquitin	0,32
PAAG_07490	24h	monothiol glutaredoxin 5	*
PAAG_04291	48h	nucleoside diphosphate kinase	0,49
PAAG_07393	48h	histone acetyltransferase SAS2	*

### Protein/peptide degradation

PAAG_00763	24h	proteasome component PUP3	*
PAAG_07339	24h	S phase kinase associated protein 1A	*
PAAG_01104	48h	proteasome component PUP1	0,75
PAAG_08931	48h	glutamate carboxypeptidase	0,58
PAAG_07802	48h	proteasome component PRE6	0,63
PAAG_07339	48h	S phase kinase associated protein 1A	1,27

## 7.0 PROTEIN WITH BINDING FUNCTION OR COFACTOR REQUIREMENT

### Nucleic acid binding

PAAG_04913	24h	SLH14081 Grp1p	0,65
------------	-----	----------------	------

### Protein binding

PAAG_02973	24h	diploid state maintenance protein chpA	*
------------	-----	--	---

## 8.0 CELLULAR TRANSPORT, TRANSPORT FACILITIES AND TRANSPORT ROUTE

### Transported compounds

PAAG_00173	24h	electron transfer flavoprotein subunit alpha	0,46
PAAG_06878	24h	V-type ATPase G subunit	*

### Transport routes

PAAG_06344	48h	rab GDP dissociation inhibitor	0,39
PAAG_06751	48h	DNA damage checkpoint protein rad24	0,36

PAAG_06233	48h	vesicular fusion protein SEC17	*
PAAG_06657	48h	importin subunit alpha	*
PAAG_06288	48h	vacuolar ATP synthase subunit B	*
PAAG_05643	48h	endoplasmic reticulum and nuclear membrane	1,01
PAAG_00797	48h	mitochondrial protein import protein MAS5	1,07
PAAG_00730	48h	clathrin heavy chain 1	1,44

## 9. CELLULAR COMMUNICATION/SIGNAL TRANSDUCTION MECHANISM

### Cellular Signalling

PAAG_08247	24h	calmodulin	0,84
PAAG_03717	24h	myosin regulatory light chain cdc4	*
PAAG_08093	48h	GTP binding protein ypt3	0,62
PAAG_02820	48h	GTP dependent nucleic acid binding protein	0,69
PAAG_06996	48h	G protein complex beta subunit CpcB	0,62

## 10. CELL RESCUE, DEFENSE AND VIRULENCE

### Stress Response

PAAG_06811	24h	heat shock protein STI1	0,4
PAAG_08059	24h	heat shock protein	0,27
PAAG_01262	24h	hsp70 like protein	0,6
PAAG_05142	24h	10 kDa heat shock protein mitochondrial	0,35
PAAG_01339	24h	heat shock protein SSC1	0,26
PAAG_01339	24h	heat shock protein SSC1	0,26
PAAG_08260	24h	Hsp90 co chaperone Cdc37	1,04
PAAG_04851	24h	osmotic growth protein	0,27
PAAG_02686	48h	Hsp90 co chaperone AHA1	0,71
PAAG_02130	48h	heat shock protein HSP98	0,86
PAAG_01339	48h	heat shock protein SSC1	0,79
PAAG_05226	48h	Hsp90 binding co chaperone Sba1	0,50
PAAG_08003	48h	hsp70 like protein	0,36
PAAG_00871	48h	30 kDa heat shock protein	1,23
PAAG_05679	48h	heat shock protein	1,23
PAAG_01262	48h	hsp70 like protein	1,23
PAAG_08059	48h	heat shock protein	1,23
PAAG_07775	48h	heat shock protein SSB1	1,23
PAAG_04851	48h	osmotic growth protein	0,91

### Detoxification

PAAG_02926	24h	Mn-superoxide dismutase	0,79
PAAG_02725	24h	Mn-superoxide dismutase	0,37
PAAG_02364	24h	Thioredoxin	0,26
PAAG_03216	48h	Mitochondrial peroxiredoxin PRX1	1,57
PAAG_04424	48h	Peroxiredoxin HYR1	*

## 11. Cell Fate

### Cell Growth/morphogenesis

PAAG_08973	24h	tropomyosin	0,29
PAAG_04391	48h	progesterone binding protein	0,39
PAAG_04498	48h	ankyrin repeat and SAM domain-containing protein	*

## 12. BIOGENESIS OF CELLULAR COMPONENTS

### Cytoskeleton/structural protein

PAAG_00932	24h	dynein light chain	0,92
PAAG_01591	24h	profilin	*
PAAG_00932	48h	dynein light chain	0,72
PAAG_03532	48h	actin	0,95
PAAG_01647	48h	tubulin alpha 1 chain	0,91
PAAG_08697	48h	myosin 2	1,28
PAAG_00004	48h	actin binding protein	0,52

## 13. UNCLASSIFIED PROTEINS

PAAG_07875	24h	conserved hypothetical protein	*
PAAG_00814	24h	conserved hypothetical protein	*
PAAG_07772	24h	conserved hypothetical protein	*
PAAG_00297	24h	conserved hypothetical protein	*

Biological process of differentially expressed proteins from MIPS ([http://pedant.helmholtz-muenchen.de/pedant3htmlview/pedant3view?Method = analysis&Db = p3\\_r48325\\_Par\\_brasi\\_Pb01](http://pedant.helmholtz-muenchen.de/pedant3htmlview/pedant3view?Method = analysis&Db = p3_r48325_Par_brasi_Pb01)) and Uniprot database (<http://www.uniprot.org/>).

<sup>a</sup> Identification of differentially regulated proteins from Paracoccidioides genome database ([http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides\\_brasiiliensis/MultiHome.html](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiiliensis/MultiHome.html)) using the ProteinLynx Global Server (PLGS) version 3.0 (Waters Corporation, Manchester, UK);

<sup>b</sup> Time in copper starvation condition;

<sup>c</sup> Proteins annotation from Paracoccidioides genome database or by homology in NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>);

<sup>d</sup> Protein expression profiles in log<sub>2</sub>-fold change (56-threshold) obtained from ProteinLynx Global Server (PLGS) analysis normalized with internal standard.

\*: identified only in copper starvation condition

**Table 5. The most abundant down-regulated proteins of *Paracoccidioides lutzii* yeast cells under copper starvation detected using NanoUPLC-MS<sup>E</sup>.**

Accession number <sup>a</sup>	Time <sup>b</sup>	Protein description <sup>c</sup>	Fold change (log <sub>2</sub> ) <sup>d</sup>
<b>1. METABOLISM</b>			
<b>Amino Acid Metabolism</b>			
PAAG_05328	24h	3 isopropylmalate dehydrogenase A	-0,45
PAAG_02901	24h	S adenosylmethionine synthetase	-0,26
PAAG_04701	48h	cystathionine gamma lyase	-3,07
PAAG_05328	48h	3 isopropylmalate dehydrogenase A	-1,20
PAAG_03279	48h	aminopeptidase	*
PAAG_05406	48h	histidine biosynthesis trifunctional protein	*
PAAG_01991	48h	homoserine dehydrogenase	*
PAAG_08162	48h	maleylacetoacetate isomerase	*
PAAG_02354	48h	serine 3 dehydrogenase	*
<b>C-compound and carbohydrate metabolism</b>			
PAAG_04181	48h	sorbitol utilization protein SOU2	-0,78
PAAG_06473	48h	mannitol 1 phosphate 5 dehydrogenase	-1,51
PAAG_02653	48h	acetyl coenzyme A synthetase	*
PAAG_03776	48h	inositol 3 phosphate synthase	*
PAAG_02162	48h	lactam utilization protein LamB	*
PAAG_05093	48h	succinyl CoA 3 ketoacid coenzyme A transferase	*
PAAG_00889	48h	phosphomannomutase	*
PAAG_05392	48h	betaine aldehyde dehydrogenase	*
<b>Nitrogen,sulfur and selenium metabolism</b>			
PAAG_04233	48h	2 nitropropane dioxygenase	*
PAAG_07003	48h	glutamine synthetase	*
<b>Lipid, fatty acid and isoprenoid metabolism</b>			
PAAG_08277	24h	nitroreductase family protein	-0,42
PAAG_05454	48h	acyl CoA dehydrogenase	*
PAAG_02554	48h	3 hydroxyisobutyryl CoA hydrolase	*
PAAG_05984	48h	glutaryl CoA dehydrogenase	*

PAAG_02163	48h	acetyl propionyl coenzyme A carboxylase	*
------------	-----	---	---

### Nucleotide/nucleoside/nucleobase metabolism

PAAG_05019	24h	hypothetical protein (Hit family protein)	-0,43
PAAG_05940	48h	deoxyribose phosphate aldolase	*
PAAG_02633	48h	ribose phosphate pyrophosphokinase	*
PAAG_02115	48h	ribose phosphate pyrophosphokinase	*
PAAG_05803	48h	inosine 5 monophosphate dehydrogenase (IMPDH))	*
PAAG_05019	48h	hit family protein 1	-0,39

### Metabolism of vitamins, cofactors, and prosthetic groups

PAAG_00851	48h	6 ,7 dimethyl 8 ribityllumazine synthase 1	-0,43
PAAG_01324	48h	folic acid synthesis protein	*
PAAG_04443	48h	spermidine synthase	*

### Phosphate metabolism

PAAG_00657	48h	inorganic pyrophosphatase	*
------------	-----	---------------------------	---

## 2. ENERGY

### Glycolysis and Gluconeogenesis

PAAG_02869	24h	phosphoglycerate kinase	-1,14
PAAG_08203	48h	phosphoenolpyruvate carboxykinase	-0,35
PAAG_02682	48h	fructose 1,6 bisphosphatase	*
PAAG_01015	48h	hexokinase	*

### Tricarboxylic-acid pathway

PAAG_00417	24h	succinyl CoA ligase subunit alpha	-0,48
PAAG_03296	48h	Aconitase	-0,68
PAAG_07729	48h	isocitrate dehydrogenase subunit	*
PAAG_00856	48h	isocitrate dehydrogenase subunit	*
PAAG_00050	48h	pyruvate dehydrogenase protein X component	*

### Pentose-phosphate pathway

PAAG_04166	48h	transaldolase	-0,4
------------	-----	---------------	------

<b>Energy conversion and regeneration</b>			
PAAG_03631	24h	12 oxophytodienoate reductase	-0,32
<b>Electron Transport and Membrane-associated energy conservation</b>			
PAAG_08037	48h	ATP synthase subunit beta	-0,63
PAAG_07246	48h	cytochrome-c oxidase chain VI	*
<b>Respiration</b>			
PAAG_03309	48h	suaprgal	-0,53
<b>Fermentation</b>			
PAAG_03910	48h	aldehyde dehydrogenase	*
PAAG_00403	48h	alcohol dehydrogenase	*
<b>3.0 CELL CYCLE AND DNA PROCESSING</b>			
<b>Cell Cycle</b>			
PAAG_05518	48h	cell division cycle protein	-0,45
PAAG_03188	48h	nuclear movement protein nudC	-0,36
PAAG_03129	48h	dynein light chain	*
<b>4.0 PROTEIN SYNTHESIS</b>			
<b>Ribosome Biogenesis</b>			
PAAG_06569	48h	60S ribosomal protein L43	*
PAAG_04998	48h	60S ribosomal protein L8 B	*
PAAG_06367	48h	30S ribosomal protein S17P	*
PAAG_00724	48h	ribosomal protein 11 large subunit	*
PAAG_05704	48h	40S ribosomal protein S13	*
PAAG_03828	48h	40S ribosomal protein S9	*
PAAG_06627	48h	60S ribosomal protein L32	*
PAAG_04425	48h	60S ribosomal protein L22	*
PAAG_03322	48h	40S ribosomal protein S20	*
PAAG_01939	48h	60S ribosomal protein L27 A	*
PAAG_05017	48h	40S ribosomal protein S10 A	*
PAAG_05805	48h	40S ribosomal protein S21	*
PAAG_01435	48h	40S ribosomal protein S16	*
PAAG_00347	48h	60S ribosomal protein L9 B	*
PAAG_01413	48h	40S ribosomal protein S17	*
PAAG_04572	48h	ribosomal protein L14	*
PAAG_00648	48h	60S ribosomal protein L33 B	*

<b>Translation</b>			
PAAG_03028	48h	elongation factor 1 beta	-0,07
<b>Aminoacyl-tRNA-synthetases</b>			
PAAG_03951	48h	prolyl tRNA synthetase	-2,26
<b>5.0 TRANSCRIPTION</b>			
<b>RNA synthesis</b>			
PAAG_06158	48h	MADS box transcription factor Mcm	*
PAAG_06917	48h	KH domain RNA binding protein	*
PAAG_04726	48h	pirin	*
<b>RNA processing</b>			
PAAG_04662	48h	cleavage and polyadenylation specificity	*
<b>6.0 PROTEIN FATE</b>			
<b>Protein Folding and Stabilization</b>			
PAAG_06067	48h	peptidylprolyl isomerase domain and WD repeat-containing	*
PAAG_00739	48h	peptidyl prolyl cis trans isomerase B	*
<b>Protein Modification</b>			
PAAG_01929	24h	HNRNP arginine N methyltransferase	-0,29
PAAG_00238	24h	ubiquitin	*
PAAG_06536	48h	ubiquitin	-0,73
PAAG_01929	48h	HNRNP arginine N methyltransferase	*
<b>Protein/peptide degradation</b>			
PAAG_08931	24h	glutamate carboxypeptidase	-0,63
PAAG_08020	24h	26S proteasome regulatory subunit rpn 8	*
PAAG_00763	48h	proteasome component PUP3	*
PAAG_08020	48h	26S proteasome regulatory subunit rpn 8	*
PAAG_08365	48h	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 8	*
PAAG_00071	48h	proteasome component Y7	*
PAAG_01926	48h	26S protease regulatory subunit 6A	*
PAAG_04282	48h	UBX domain containing protein	*
PAAG_03932	48h	ubiquitin-activating enzyme E1 Y	*
PAAG_09004	48h	puromycin sensitive aminopeptidase	*

## 7.0 CELLULAR TRANSPORT, TRANSPORT FACILITIES AND TRANSPORT ROUTE

### Transported compounds

PAAG_04651	24h	GTP binding nuclear protein GSP1 Ran	-1,04
------------	-----	--------------------------------------	-------

### Transport routes

PAAG_06344	24h	rab GDP dissociation inhibitor	-0,32
PAAG_07702	24h	ADP ribosylation factor	-0,30
PAAG_04651	48h	GTP binding nuclear protein GSP1 Ran	-1,02
PAAG_06155	48h	vacuolar ATP synthase subunit E	*

## 8.0 CELLULAR COMMUNICATION/SIGNAL TRANSDUCTION MECHANISM

### Cellular Signalling

PAAG_01519	24h	inositol monophosphatase	-0,49
PAAG_02820	24h	GTP dependent nucleic acid binding protein	*
PAAG_08247	48h	calmodulin	-0,71
PAAG_02973	48h	diploid state maintenance protein chpA	*
PAAG_02458	48h	GTP binding protein ypt7	*
PAAG_06948	48h	mitogen activated protein kinase MKC1	*

## 9. CELL RESCUE, DEFENSE AND VIRULENCE

### Stress Response

PAAG_05679	24h	heat shock protein	-1,63
PAAG_05142	48h	10 kDa heat shock protein mitochondrial	-0,81
PAAG_06811	48h	heat shock protein STI1	-0,73
PAAG_02055	48h	histone chaperone asf1	-0,76
PAAG_06255	48h	mitochondrial co chaperone GrpE	-2,75
PAAG_08260	48h	Hsp90 co chaperone Cdc37	-0,72
PAAG_01175	48h	DNA damage-responsive-like protein	*

### Detoxification

PAAG_03216	24h	Mitochondrial peroxiredoxin PRX1	-0,29
PAAG_04164	24h	CuZn-superoxide dismutase	*
PAAG_06175	48h	Peroxisomal matrix protein	-0,43
PAAG_02364	48h	Thioredoxin	-0,32
PAAG_07772	48h	Thioredoxin-like protein	*
PAAG_04164	48h	CuZn-superoxide dismutase	*
PAAG_02725	48h	Mn-superoxide dismutase	*

### Disease, virulence and defense

PAAG_03316	48h	polysaccharide export protein	*
<b>10. INTERACTION WITH THE ENVIRONMENT</b>			
<b>Homeostasis</b>			
PAAG_02019	48h	mitochondrial F1F0 ATP synthase subunit Atp14	*
<b>11. CELL FATE</b>			
<b>Cell growth/morphogenesis</b>			
PAAG_04391	24h	progesterone binding protein	*
<b>Cell death</b>			
PAAG_09083	48h	TCTP family protein	-0,88
<b>12. BIOGENESIS OF CELLULAR COMPONENTS</b>			
<b>Cytskeleton/structural proteins</b>			
PAAG_03532	24h	actin	-0,68
PAAG_08058	24h	cofilin	-0,36
PAAG_08058	48h	cofilin	-0,42
PAAG_03031	48h	tubulin beta chain	*
PAAG_06192	48h	ARP2 3 complex 20 kDa subunit	*
PAAG_02396	48h	actin	*
PAAG_05638	48h	F actin capping protein subunit beta	*
PAAG_01591	48h	profilin	*
PAAG_07958	48h	fimbrin	*
<b>Peroxisome</b>			
PAAG_02064	48h	peroxisomal membrane protein receptor Pex19	*
<b>13. CELL TYPE DIFFERENTIATION</b>			
<b>Fungal/ microorganismic tissue</b>			
PAAG_03921	24h	HET C domain containing protein HetC	*
PAAG_03628	48h	tol protein-like protein	*
<b>14. UNCLASSIFIED PROTEINS</b>			
PAAG_02985	48h	hypothetical protein	*

Biological process of differentially expressed proteins from MIPS ([http://pedant.helmholtz-muenchen.de/pedant3htmlview/pedant3view?Method=analysis&Db=p3\\_r48325\\_Par\\_brasi\\_Pb01](http://pedant.helmholtz-muenchen.de/pedant3htmlview/pedant3view?Method=analysis&Db=p3_r48325_Par_brasi_Pb01)) and Uniprot database (<http://www.uniprot.org/>).

<sup>a</sup>Identification of differentially regulated proteins from Paracoccidioides genome database ([http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides\\_brasiliensis/MultiHome.html](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html)) using the ProteinLynx Global Server (PLGS) version 3.0 (Waters Corporation, Manchester, UK);

<sup>b</sup>Time in copper starvation condition;

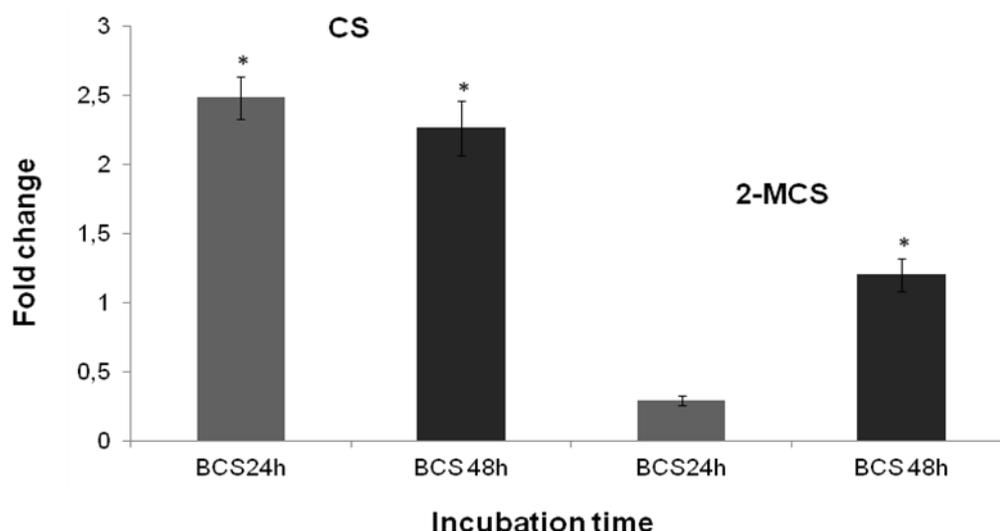
<sup>c</sup>Proteins annotation from Paracoccidioides genome database or by homology in NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>);

<sup>d</sup>Protein expression profiles in log2-fold change (56-threshold) obtained from ProteinLynx Global Server (PLGS) analysis normalized with internal standard.

\*: identified only in copper-replete condition.

## 5.8 Correlação entre os dados proteômicos e transcricionais

Para validar a significância dos resultados encontrados nas análises proteômicas, foi avaliado se as mudanças nos níveis proteicos teriam correlação com as mudanças nos níveis transcricionais. cDNAs foram sintetizados e a quantidade de transcritos foi analisada por qRT-PCR, com oligonucleotídeos amplificadores específicos. Os níveis de transcritos codificantes da Citrato sintase apresentou-se induzida nos tempos de 24 e 48h durante depleção de cobre, conforme a análise proteômica (Fig. 19 e Tabela 4). Com relação a 2-Metilcitrato sintase, o transcrito foi mais abundante no tempo de 48h durante a depleção de cobre, os dados corroboram com as análises proteômicas (Fig. 19 e Tabela 4).

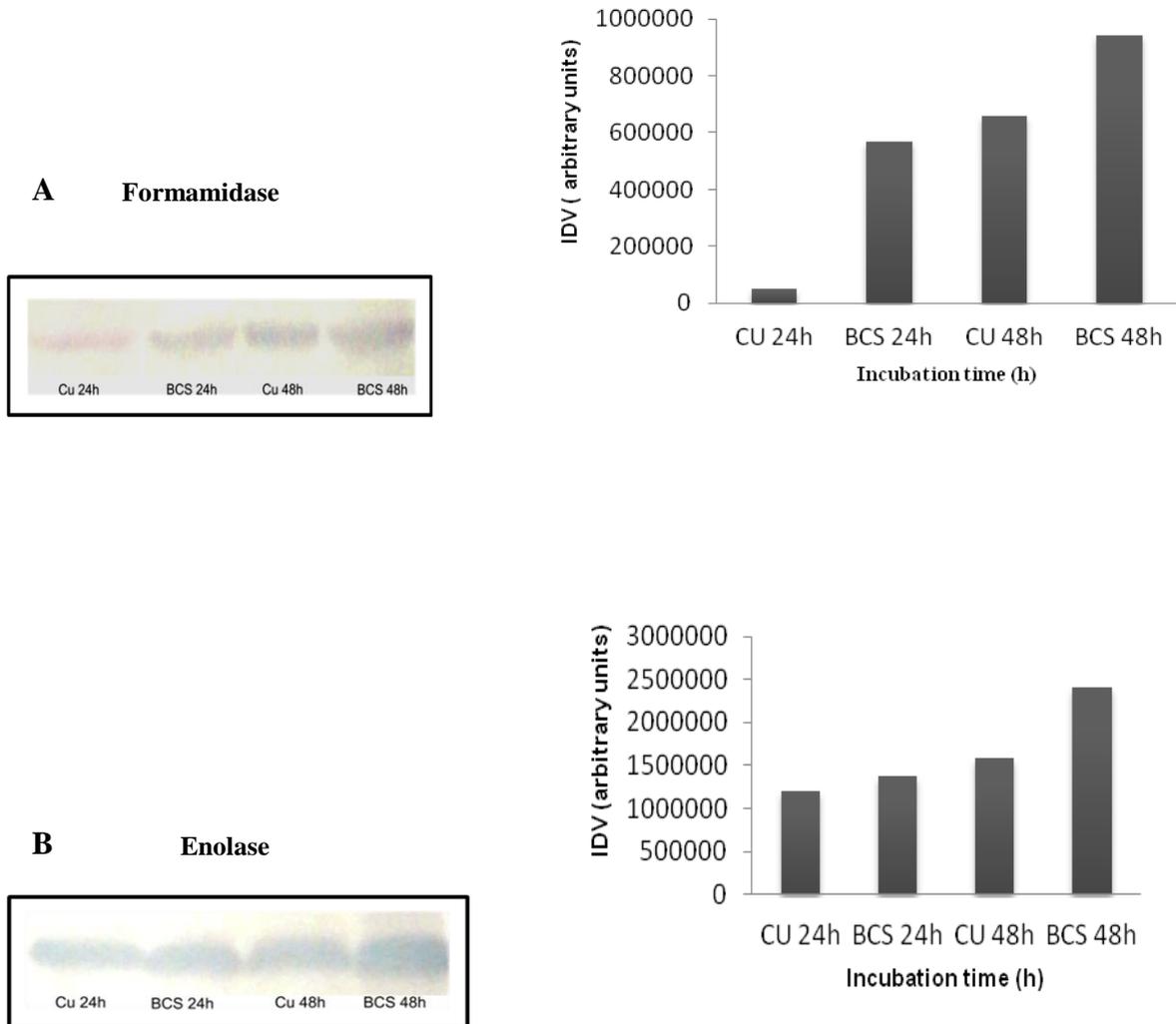


**FIGURA 19. Validação dos dados proteômicos por RT-PCR em tempo real.** Os níveis de transcritos *P. lutzii* codificantes para Citrato sintase (CS) e 2-Metilcitrato sintase (2-MCS) foram quantificados por meio de RT-qPCR. Os dados foram normalizados utilizando o transcrito codificante para a proteína L34 e apresentados como fold change. Análises estatísticas para avaliar o nível de significância foram realizadas utilizando o teste t de Student, adotando  $p \leq 0,05$  (\*).

## 5.9 Análises por Western blotting

A análise por Western blot foi realizada para confirmar a abundância das proteínas de *P. lutzii* detectadas por análises proteômicas. Este foi realizado utilizando anticorpos específicos para duas proteínas: Enolase (Nogueira *et al*, 2010) e Formamidase (Borges *et al*, 2005) alteradas pelos níveis de cobre, como determinado pela análise por NanoUPLC-MS<sup>E</sup>. Os níveis de expressão das enzimas Formamidase e Enolase de *P. lutzii* durante a privação de

cobre foram aumentados nas análises de western blot nos tempos de 24 e 48h, corroborando com as análises proteômicas (Figura 20, painéis A e B).



**FIGURA 20. Validação dos resultados do proteoma de *P. lutzii* durante privação de cobre por Western blotting.** Proteínas (30 µg) de células de levedura do *P. lutzii* foram incubadas a 36°C em meio com MMcM na presença e ausência de cobre por 24 e 48h. A abundância da Formamidase e Enolase foram analisadas por Western blotting. As proteínas foram fracionadas em gel de eletroforese unidimensional. As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose e as espécies de proteínas ≈ 45 e 47 kDa foram detectadas usando anticorpos policlonais de camundongo e coelho anti-Formamidase e anti-Enolase, respectivamente. A análise densitométrica das bandas de imunotransferência foi realizada utilizando o software AphaEaseFC.

## 6. DISCUSSÃO

O cobre é um metal de transição essencial para uma ampla gama de enzimas. Este metal está envolvido em muitas funções indispensáveis para a vida da célula. As proteínas cobre-dependentes, tal como o citocromo c oxidase, exerce um papel crítico na sobrevivência celular e desenvolvimento embrionário em células humanas (Hamza & Gitlin 2002). Sabe-se que o excesso de cobre pode ser tóxico devido a sua modulação redox, produzindo radicais livres que causam danos a lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (Hodgkinson & Petris, 2012). O excesso de metais leva à distúrbios nos níveis de Fe e Cu podendo ter efeitos graves no metabolismo celular, crescimento e desenvolvimento (De Freitas *et al*, 2003). Foi demonstrado que o sistema regulatório de cobre em *C. neoformans*, regulado pelo fator de transcrição dependente de cobre Cuf1, ativa a expressão do transportador de cobre CTR4 de *C. neoformans* em resposta à privação deste metal no interior de macrófagos durante a infecção (Waterman *et al*, 2007). Na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, a homeostase do cobre e ferro são fatores limitantes de crescimento em ambiente alcalino (Serrano *et al*, 2004). Em relação aos microrganismos patogênicos, estudos tem demonstrado que os principais mecanismos envolvidos na homeostase de metais estão interligados aqueles envolvidos na virulência e na patogenicidade (Jung & Kronstad, 2008, Ratledge, 2007). Deste modo, o cobre controla um variada série de eventos bioquímicos modulando importantes fatores de virulência dos fungos (Kim *et al*, 2008). Neste contexto, foi realizado estudo proteômico do *P. lutzii* em condições limitantes de cobre por 24 e 48h. As análises proteômicas resultaram na identificação de 68 proteínas/isoformas por eletroforese 2-DE, das quais 42 com expressão aumentada e 26 com expressão diminuída durante a depleção de cobre. Através da técnica do nano-ESI-UPLC-MS<sup>E</sup> um total de 366 proteínas foram identificadas, sendo 232 induzidas e 134 reprimidas na privação de cobre. Os resultados obtidos em nossas análises proteômicas sob limitação de cobre, mostraram alterações de proteínas envolvidas com o metabolismo de energia (via da glicólise, metabolismo de aminoácidos, metabolismo de lipídeos, ciclo do ácido tricarbóxico, via das pentoses fosfato e ciclo do metilcitrato) proteínas destas vias tiveram um aumento de expressão, sugerindo os possíveis mecanismos utilizados por *P. lutzii* para sobreviver durante depleção de cobre.

Os carboidratos são a fonte primária e preferencial de carbono para a maioria dos organismos, sendo utilizados para gerar energia e produzir biomoléculas. Em *P. lutzii* observamos indução de proteínas da via glicólica em situação de privação de cobre. A

glicólise é responsável pela conversão de hexoses fosforadas em piruvato, enquanto produzem ATP e NADH. A partir daí, as células realizam duas grandes estratégias de produção de energia, fermentação e respiração. Embora ambos os processos regenerem  $\text{NAD}^+$ , a respiração é significativamente mais eficiente energeticamente do que a fermentação uma vez que produz ATP adicional através do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e fosforilação oxidativa (Askew *et al*, 2009). Em condição de privação de cobre, as enzimas induzidas na via glicolítica possivelmente ativam o metabolismo aeróbio, produzindo ATP uma vez que a via do TCA também foi induzida. Como a glicólise é crítica para assimilação de carbono, a via tem sido mostrada estar induzida durante as infecções, sendo importante para a virulência em bactérias patogênicas, parasitas e fungos (Barele *et al*, 2006; Daily *et al*, 2007; Costa *et al*, 2007). Em *Candida albicans*, foi investigado o controle transcricional do metabolismo de carboidratos e identificou-se dois fatores Tye7p e Gal4p, como os reguladores-chaves da glicólise. Quando a respiração é inibida ou o oxigênio limitado, a cepa gal4tye7 de *C. albicans* mostra grave defeito de crescimento quando cultivadas em glicose, frutose ou manose. Isso indica que a glicólise e o desvio de metabólitos para o ciclo do TCA possui uma contribuição importante para a virulência deste fungo (Askew *et al*, 2009). No caso do *P. lutzii* cultivado em ambiente com deficiência do micronutriente cobre, podemos sugerir que está utilizando a glicólise para produzir energia na forma de ATP, com metabolismo aeróbio e auxiliando no processo adaptativo do fungo a um ambiente hostil do hospedeiro.

Em nosso estudo, a enolase foi diferencialmente expressa em condições de depleção de cobre. Donofrio e colaboradores 2009, identificaram a proteína enolase com função de adesina, podendo participar na adesão de *Paracoccidioides*, sendo considerado um fator de virulência. A enolase de *Paracoccidioides* é uma proteína de superfície que se liga à plasminogênio. Deste modo, o fungo é capaz de adquirir atividade proteolítica, pois a plasmina gerada é uma enzima-chave do sistema plasminogênio e contribui para a degradação de uma variedade de constituintes da matriz. A ligação ao plasminogênio e a sua conversão à plasmina (uma serina protease) contribuiu para a patogenicidade de *Paracoccidioides* por facilitar invasão tecidual no hospedeiro (Nogueira *et al*, 2010). Podemos observar que o aumento da expressão da Enolase durante privação de cobre, além de sua função na via glicolítica, pode ser considerada suposto fator de virulência.

A gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH), além do seu papel no metabolismo de carboidratos, esta enzima já foi descrita como molécula de adesão em vários microrganismos patogênicos. Em *Candida albicans* se liga às proteínas da matriz extracelular e, conseqüentemente está associada ao estabelecimento da infecção (Gozalbo *et al*, 1998). Em *Paracoccidioides*, Barbosa *et al*, (2006) demonstraram que a GAPDH é uma molécula localizada na parede celular do fungo: Esta proteína tem função de adesina e liga-se a componentes da matriz extracelular mediando a internalização do fungo. Neste contexto sugere-se que em condições de privação de cobre, o aumento da expressão desta proteína pode ser considerado um provável fator de virulência do fungo.

Proteínas de *P. lutzii* envolvidas com metabolismo de nitrogênio como Formamidase, Oxidoreductase 2-nitropopano dioxigenase apresentaram-se induzidas em 24 e 48 h em condições de privação de cobre. A atividade de amidases é importante para a defesa de patógenos. A amônia, um dos produtos finais da ação da formamidase, tem papel importante na patogênese de *Helicobacter pylori*, auxiliando na destruição tecidual e fornecendo resistência para suportar as variações de pH (Bury-Moné *et al*, 2004). A formamidase localizada na parede e membranas celulares, reage com anticorpos presentes no soro de pacientes infectados com *Paracoccidioides* sugerindo um papel da proteína na interação do fungo com o hospedeiro (Borges *et al*, 2005). Desta forma, a indução de enzimas relacionadas com os fatores de virulência está relacionada com os níveis intracelulares de cobre.

Em *P. lutzii* o complexo piruvato desidrogenase apresentou-se induzido durante privação de cobre. Na respiração aeróbia, o piruvato produzido pela glicólise e pela via das pentoses fosfato é principalmente oxidado e descarboxilado a acetil-CoA pelo complexo piruvato desidrogenase. Esta enzima é altamente conservada entre as espécies, e o genoma de *Candida albicans* contém genes com elevada homologia com *Saccharomyces cerevisiae* codificando um conjunto de genes para todas as subunidades de piruvato desidrogenase. O rompimento de uma das subunidades dos genes da piruvato desidrogenase (Pdx1) em *C. albicans* resulta na deficiência do crescimento filamentoso do fungo (Vellucci *et al*, 2007). Podemos sugerir que disponibilidade de Acetil-CoA gerado pelo piruvato pode ser importante para a sobrevivência de *P. lutzii* em condições inóspitas.

Durante a privação de cobre *P. lutzii* mostrou um aumento da expressão de enzimas envolvidas no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA). Cobre e o ferro representam funções predominantes na via do metabolismo de energia. Muitos organismos utilizam a glicose como

fonte preferencial de carbono . Esta pode ser convertida em um açúcar contendo cinco carbonos, tais como ribose e desoxirribose, através da via pentose fosfato ou ser catabolizada para piruvato e posteriormente acetil-CoA através da glicólise. O acetil-CoA entra para o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), onde é convertido através de oito passos enzimáticos, em intermediários que alimentam numerosas vias, incluindo as vias de biossíntese de aminoácidos, ácidos graxos e glicose (Lorenz e Fink, 2002). O metabolismo do piruvato, o ciclo do TCA e a cadeia respiratória empregam mais proteínas contendo ferro e cobre, de tal modo que estas vias tendem a ser mais vulneráveis aos distúrbios na homeostase de ferro e cobre. No ciclo do TCA, aconitase e succinato desidrogenase requerem ferro-enxofre ou grupos prostéticos heme como cofatores. Apesar dessas enzimas não serem normalmente taxa limitante, a deficiência de cobre pode torna-lás taxa limitante sobre *diauxic-shift* (mudança da respiração anaeróbia para aeróbia em leveduras) (DeRisi *et al*, 1997).

Dentre as via metabólicas induzidas durante a depleção de cobre temos a via das pentoses-fosfato, ao qual é uma via alternativa para o metabolismo da glicose-6-fosfato que é usado principalmente para regenerar a oferta de uma célula de NADPH e para produzir a ribose-5-fosfato, usado na biossíntese de uma variedade de moléculas especializadas, incluindo nucleotídeos e os ácidos nucleicos (Sprengrer, 1995; Zamboni *et al*, 2004). Estudos tem demonstrado que a atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase é importante para a resistência às espécies reativas de oxigênio (MA *et al*, 1998). Nas análises proteômicas da *Chlamydia trachomatis* durante a privação de ferro, demonstrou-se que a enzima 6-fosfogliconolactonase está envolvida na proteção contra os danos oxidativos (Dill *et al*, 2009). A via das pentoses-fosfato fornece substratos para a glicólise. A indução desta via durante privação de cobre, presumidamente foi para a produção de NADPH, processos biossintéticos (como síntese de aminoácidos e de ácidos graxos) ou degradação das espécies reativas de oxigênio, produzidos pelo metabolismo aeróbio.

O *P. lutzii* sob condições de deficiência de cobre apresentou elevado número de enzimas relacionadas com o metabolismo de aminoácidos, sendo a grande maioria correlacionada com degradação de aminoácidos. Os intermediários do Ciclo do ácido tricarboxílico: Fumarato,  $\alpha$ -cetoglutarato, Succinil- CoA, Acetil-CoA são obtidos pela degradação dos aminoácidos. A enzima isovaleril CoA desidrogenase envolvida no metabolismo de ácidos graxos foi induzida em condições limitantes de cobre. Esta enzima catalisa a degradação de leucina e realiza a desidrogenação dos substratos de acil-CoA

influenciando na produção de acetil-CoA (Urano *et al*, 2010). Podemos sugerir que a degradação de aminoácidos fornece substratos para o ciclo do TCA e metabolismo de lipídeos, obtendo energia desses ciclos aerobicamente.

A Biossíntese de aminoácidos também foi induzida em condições de privação de cobre, como a síntese de Cisteína, Triptofano, Valina, Leucina, Arginina, Isoleucina. Dois novos genes regulados pelo fator de transcrição MAC1 são YFR055w e YJL217w (Gross *et al*, 2000). O produto previsto codificado por YFR055w é 28% idêntico ao o produto Cys3, que catalisa a produção de cisteína a partir de cistationina e 26% idêntica a Met17, que converte O acetilhomoserina em homocisteína. YFR055w pode codificar uma das várias isozimas cistationina  $\gamma$ -liase em *S. cerevisiae* que geram cisteína a partir de cistationina (Gross *et al*, 2000). Cys3 é a maior cistationa  $\gamma$ -liase importante na biossíntese de cisteína em levedura (Ono *et al*, 1999). A observação de que YFR055w é induzida por Mac1 pode sugerir que a resposta celular a deficiência de cobre é uma expansão de pools de cisteína. Comparando com esses trabalhos podemos sugerir que o aumento da expressão de enzimas relacionadas com a síntese de aminoácidos como a Homocitrato sintase, Aspartato semialdeído desidrogenase, Argininosuccinato sintase, permite ofertar quantidades suficientes destes aminoácidos aos ciclos metabólicos da Glicólise, TCA e via das pentoses-fosfato do *P. lutzii*.

Os fungos filamentosos metabolizam agentes tóxicos através do propionil-CoA pelo ciclo do metilcitrato. As enzimas 2-metilcitrato liase, 2-metilcitrato desidratase e 2-metilcitrato sintase de *P. lutzii* envolvidas com o ciclo do metilcitrato foram induzidas durante a restrição de cobre. Propionil-CoA é gerado por ativação direta de propionato ou pela quebra de cadeias ímpares de ácidos graxos e dos aminoácidos valina, isoleucina e metionina (Maerker *et al*, 2005; Ibrahim-Granet *et al*, 2008). Os aminoácidos valina, isoleucina e metionina foram positivamente regulados na privação de cobre fornecendo substrato para a oxidação de propionil- CoA a piruvato. Em *Aspergillus fumigatus* (Brook *et al*, 2008) foi demonstrado que atenuação da virulência foi pela deleção do gene metilcitrato sintase. Levando em consideração os trabalhos citados acima, podemos sugerir que a indução de enzimas do ciclo do metilcitrato em *P. lutzii* sob condições de privação de cobre, pode ser um mecanismo de virulência usado pelo fungo para continuar sobrevivendo dentro da célula hospedeira.

De acordo com as análises proteômicas aqui apresentadas, observou-se maior expressão de enzimas envolvidas no metabolismo de lipídeos como Acil-CoA desidrogenase, 3-cetoacil-CoA tiolase, Acetil-CoA aciltransferase, possivelmente aumentando a produção de propionil-CoA. Estudos sugerem um papel importante da via de  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos no processo de virulência em bactéria e fungos (McKinney *et al*, 2000; Prigneau *et al*, 2003). Diversos estudos têm descrito que ácidos-graxos são potenciais fontes de carbono para fungos patogênicos durante infecção e a deleção de genes envolvidos na  $\beta$ -oxidação causa uma acentuada atenuação da virulência (Ramírez & Lorenz, 2007). Podemos sugerir que a indução do metabolismo de lipídeos direciona para obtenção e captação de fontes alternativas de carbono relacionado à sobrevivência do *P. lutzii* em condições de limitação de cobre.

Nossos resultados demonstraram que proteínas relacionadas com a defesa e virulência como as HSPs apresentaram-se com expressão aumentada na privação de cobre. Várias estratégias foram desenvolvidas pelas células para lidar com mudanças adversas no ambiente. Entre essas, a resposta de choque térmico, também referida como resposta ao estresse, é a mais conservada (Welch, 1992, Fehrenbach & Niess, 1999). Apesar de, a indução destas proteínas ter sido inicialmente interpretada como um sinal para a detecção de estresse fisiológico, está bem estabelecido agora que a indução é fundamental nos processos de reparo que seguem diferentes tipos de danos e na prevenção contra a agregação e coagulação de proteínas não nativas (Santoro, 2000), principal mecanismo através do qual as HSP conferem citoproteção, evitando dobraduras e interações incorretas entre as proteínas. O nível de expressão aumentada das HSPs em *P. lutzii* durante a privação de cobre, pode estar relacionado com a atividade dessas proteínas como chaperonas. A privação de cobre, possivelmente, leva ao enovelamento incorreto de proteínas dependentes de cobre, as quais se acumulariam no citoplasma. Altas concentração de proteínas desenoveladas podem ser tóxicas para a célula, desta forma a indução na expressão das HSPs que atuam como chaperonas pode ser importante para produzir detoxificação.

A enzima antioxidante Cu/Zn superóxido superoxidase (SOD1), localizada no citosol e no espaço intermembrana da mitocôndria (Okado-Matsumoto & Fridovich, 2001; Sturtz *et al*, 2001), e o complexo IV são duas enzimas chaves que requerem cobre como grupo prostético (Horn & Barrientos, 2008; Kim *et al*, 2008). A atividade de muitas cuproenzimas diminui com a deficiência de cobre por causa da falta de metal. Nossos resultados apresentaram uma diminuição da expressão Cu/Zn-superóxido dismutase durante a privação de cobre, pois é

uma cuproenzima dependente de cobre. Foi demonstrado que a célula responde a níveis baixos de cobre pelo aumento da expressão da metalochaperona CCS. A maior quantidade de moléculas CCS disponível para entregar o cobre aumenta a eficiência de transferência deste para SOD1, priorizando a distribuição de cobre quando ela é escassa (Bertinato *et al*, 2002). Em *S. cerevisiae* a enzima Cu/Zn superóxido dismutase tem um papel na resposta a deficiência de cobre ativando fatores de transcrição como MAC1 que induz a transcrição de genes envolvidos na captação de alta afinidade de cobre como CTR1, CTR3 e FRE1 (Wood & Thiele, 2008).

Nossos resultados fornecem a primeira resposta do proteoma de *P. lutzii* a privação de cobre. Em conclusão, esta análise proteômica de *P. lutzii* revelou que a maior resposta celular afetada pela restrição de cobre foi relacionada ao metabolismo de energia. Nossos dados mostram também que a via glicolítica, ciclo do TCA, via das pentoses fosfato, ciclo do metilcitrato e metabolismo de lipídeos foram as vias mais induzidas durante a privação de cobre, na qual o metabolismo aeróbio é favorecido. A remodelação metabólica observada em condições de privação de cobre possivelmente é um mecanismo de sobrevivência do patógeno no ambiente hostil do hospedeiro.

## 7. REFERÊNCIAS

Alcântara TM (2002). Fenotipagem das populações celulares e detecção *in situ* de citocinas em biópsias de pacientes com Paracoccidioidomicose. 150f. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, Botucatu.

Adkins J; Varnum S, Auberry K, Moore R, Angell N, Smith R, Springer D, Pounds J (2002). Toward a Human Blood Serum Proteome. Analysis by multidimensional separation coupled with mass spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics*. 947–955.

Albornoz MB (1971). Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. *Saubouraudia*. (9): 248 – 253.

Araújo MS, Souza SCO (2002). Análise epidemiológica de pacientes acometidos com paracoccidioidomicose em região endêmica do estado de Minas Gerais. *Rev Pos-Grad*. (7) :22-6.

Arnesano F, Banci L, Bertini I, Cantini F, Ciofi-Baffoni S, Huffman D.L, O'Halloran TV (2001). Characterization of the binding interface between the copper chaperone Atx1 and the first cytosolic domain of Ccc2 ATPase. *J Biol Chem United States*. 41365-76.

Askew C, Sellam A, Epp E, Hogues H, Mullick A, Nantell A, Whiteway M (2009). Transcriptional Regulation of Carbohydrate Metabolism in the Human Pathogen *Candida albicans*. *PLoS Pathog* 5(10): e1000612. 1-20.

Asif AR, Oellerich M, Amstrong VW, Gross U, Reichard U (2010). Analysis of the cellular *Aspergillus fumigatus* proteome that reacts with sera from rabbits developing an acquired immunity after experimental aspergillosis. *Electrophoresis*. (31):1947-1958.

Barrozo LV, Mendes RP, Marques SA, Benard G, Silva MES, Bagagli E (2009). Climate and acute/subacute paracoccidioidomycosis in a hyper-endemic area in Brazil. *International Journal of Epidemiology*. 1–8.

Bailao AM, Schrank A, Borges CL, Dutra VWI, Molinari-Madlum EE, Soares Felipe MSS, Mendes-Giannini MJ, Martins WS, Pereira M, Soares CMA (2006). Differential gene expression by *Paracoccidioides brasiliensis* in host interaction conditions: Representational difference analysis identifies candidate genes associated with fungal pathogenesis. *Microbes Infect.* (8): 2686-97.

Bailão AM, Nogueira SV, Rondon Caixeta Bonfim SM, et al (2012). Comparative transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* during in vitro adhesion to type I collagen and fibronectin: identification of potential adhesins. *Res Microbiol.* 163: 182–91.

Bailão EFLC, Parente JA, Pigosso LL, De Castro KP, Fonseca FL, Silva-Bailão MG, Bao SN, Bailão AM, Rodrigues ML, Hernandez O, McEwen JG, Soares CMA (2014). Hemoglobin Uptake by *Paracoccidioides spp.* Is Receptor-Mediated. *PLoS One* .8(5): e2856.

Banci L, Bertini I, Cantini F, Ciofi-Baffoni S (2010). Cellular copper distribution: a mechanistic systems biology approach. *Cell Mol Life Sci.* 67: 2563-89.

Barelle CJ, Priest CL, Maccallum DM, Gow NAr, Odds FC, Brown AJP (2006) Niche-specific regulation of central metabolic pathways in a fungal pathogen. *Cell Microbiol* (8): 961–971.

Barbosa MS, Bao SN, Andreotti PF, de Faria FP, Felipe M,S, Dos Santos Feitosa L, Mendes-Giannini, MJ, Soares CMA (2006). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. *Infect. Immun.* 382-389.

Bastos K P, Bailão AM, Borges CL, Faria FP, Felipe MSS, Silva MG, Martins WS, Fiúza RB, Pereira M, Soares CMA (2007). The transcriptome analysis of early morphogenesis in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium reveals novel and induced genes potentially associated to the dimorphic process. *BMC Microbiol.* 7: 29.

Bagagli E, Bosco SMG, Theodoro RC, Franco M (2006). Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. *Infect Genet Evol.* 6: 344-351.

Bava AJ, Mistchenko AS, Palacios MF, Estevez ME, Tiraboschi NI, Sen L, Negroni R, Diez RA (1991). Lymphocyte subpopulations and cytokine production in paracoccidioidomycosis patients. *Microbiol immunol.* (35): 167-171.

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

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

Benard G (2008). An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia.* (165): 209-221.2008.

Bertinato J, Iskandar M, L'Abbe' MR (2002). Copper Deficiency Induces the Upregulation of the Copper Chaperone for Cu/Zn Superoxide Dismutase in Weanling Male Rats1. *American Society for Nutritional Sciences.* 28-31.

Bhadauria V, Zhao WS, Wang LX, Zhang Y, Liu JH, Yang J, Kong LA, Peng YL (2007). Advances in Fungal proteomics. *Microbiol Res.*162 (3):193-200.

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

Borges CL, Pereira M, Felipe MSS, Faria FP, Gomez FJ, George S. Deepe Jr, Soares CMA (2005). The antigenic and catalytically active formamidase of *Paracoccidioides brasiliensis*:

protein characterization, cDNA and gene cloning, heterologous expression and functional analysis of the recombinant protein. *Microbes and Infection*. (7) 66–77.

Blotta MH, Mamoni RL, Oliveira SJ, Nouér SA, Papaiordanou PM, Goveia A, Camargo Zp (1999). Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil; a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. *Am J Trop Med Hyg*. (61) : 390-4.

Bookout AL, Cummins CL, Mangelsdorf DJ, Pesola JM, Kramer MF (2006). High-throughput realtime quantitative reverse transcription PCR. *Curr Protoc Mol Biol*.15:Unit 15.8.

Bradford MM (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. (72): 248-254.

Bruneau JM, Magnin T, Tagat E, Legrand R, Bernard M, Diaquin M, Fudali C, Latgé JP (2001). Proteome analysis of *Aspergillus fumigatus* identifies glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins associated to the cell biosynthesis. *Electrophoresis*. (22): 2812-2823.

Bury-Moné S, Thiberge JM, Contreras M, Maitournam A, Labigne A, De Reuse H (2004). Responsiveness to acidity via metal ion regulators mediates virulence in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol*. 53: 623–638.

Carrero LL, Nino-Vega G, Teixeira MM, Carvalho MJ, Soares CM (2008). New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. *Fungal Genet Biol* (45): 605-12.

Calich, VL, Da Costa TA, Felonato M, Arruda C, Bernardino S, Loures FV, Ribeiro LR, De Cássia VFR, Pina A (2008). Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Mycopathologia*. (165): 223-36. 2008.

Calich VL, Pina A, Felonato M, Bernardino S, Costa TA, Loures FV (2008). Toll-like receptors and fungal infections: the role of TLR2, TLR4 and MyD88 in paracoccidioidomycosis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* (53): 1-7.

Cash (2002). P. Proteomics: the protein revolution. *Biologist (London).* 49(2): 58-62.

Chun CD, Madhani HD (2010). Ctr2 links copper homeostasis to polysaccharide capsule formation and phagocytosis inhibition in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *PLoS One.* 5.

Chromy B, Gonzales A, Perkins J, Choi M, Cortett M, Chang B, Corztt C, Mccutchen-Maloney S. (2004). Proteomic analysis of human serum by twodimensional differential gel electrophoresis after depletion of high-abundant proteins. *Journal of Proteome Research.* (3): 1120-1127.

Clerici M, Sherer GA (1992). Th1-Th2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunol Today.* (14):107-112.

Conti HR, Shen F, Nayyar N, Stocum E, Sun JN, Lindemann MJ, Ho AW, Hai JH, Yu JJ, Jung JW, Filler SG, Masso-Welch P, Edgerton M, Gaffen SL (2009). Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. *J Exp Med.* (206): 299-311.

Costa M, Borges CL, Bailao AM, Meirelles GV, Mendonca YA, Dantas SF, De Faria FP, Felipe MS, Molinari-Madlum EE, Mendes-Giannini MJ, Fiuza RB, Martins WS, Pereira M, Soares CM (2007). Transcriptome profiling of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast-phase cells recovered from infected mice brings new insights into fungal response upon host interaction. *Microbiology* 153: 4194–4207.

Cox FEG, Liew FY (1993). T cell subsets and cytokines in parasitic infections. *Immunol Today.* (13): 445-449.

Culotta VC, Howard WR, Liu XF (1994). CRS5 encodes a metallothionein-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*, *J Biol Chem.* (269): 25295-302.

Daily JP, Scanfeld D, Pochet N, Le Roch K, Plouffe D, Karnal M, Sarr O, Mboup S, Ndir O, Wypij D, Levasseur K, Thomas E, Tamayo P, Dong C, Zhou Y, Lander ES, Ndiaye D, Wirth D, Winzeler EA, Mesirov P, Regev A (2007). Distinct physiological states of *Plasmodium falciparum* in malaria-infected patients. *Nature* (450): 1091–1095.

De Almeida SM (2005). Central nervous system paracoccidioidomycosis: an overview. *Braz J Infect Dis.* 9(2):126-33.

De Brito T, Franco MF (1994). Granulomatous inflammation. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* (36): 185-192.

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

DeRisi JL, Iyer VR, Brown PO (1997). Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 278 (5338): 680–686.

Dill BD, Dessus-Babus S, Raulston JE (2009). Identification of iron-responsive proteins expressed by *Chlamydia trachomatis* reticulate bodies during intracellular growth. *Microbiology.* (155): 210–219.

Domon B, Aebersold R (2006) . Mass spectrometry and protein analysis. 312: 212-7.

Doherty CP (2007). Host-pathogen interactions: the role of iron. *J Nutr.* (137): 1341-1344.

Donofrio FC, Calil AC, Miranda ET, Almeida AM, Bernard G, Soares CP, Veloso SN, Soares CM, Mendes Giannini MJ (2009). Enolase from *Paracoccidioides brasiliensis*: isolation and identification as a fibronectin-binding protein. *J Med Microbiol.* (58): 706-713.

Eckhardt U, Buckhout TJ (1998). Iron assimilation in *Chlamydomonas reinhardtii* involves in ferric reduction and is similar to strategy I higher plants. *J. Exp. Bot.* (49): 219 – 1226 .

Fava-Netto, C (1955). Estudos quantitativos sobre a fixação de complemento na blastomicose sul-americana, com antígeno polissacarídico. *Arq. Cir. Clin. Exp.*(18): 197-254.

Ferreira MC, Oliveira RTD, Maria R (2010). Involvement of Regulatory T Cells in the immunosuppression characteristic of patients with Paracoccidioidomycosis. *Infect Immun.* (78): 4392–4401.

Fehrenbach E, Niess AM (1999). Role of heat shock proteins in the exercise response. *Exercise Immunology Review.* (5): 57-77.

Fortes MRP, Miot HÁ, Kurokawa CS, Marques MEA, Marques AS (2011). Imunologia da Paracoccidioidomicose. *Ann Bras Dermatol.* (86): 516-25.

Franco M, Montenegro MR, Mendes RP, Marques AS, Dillon NL, Mota NS (1987). Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. *Ver Soc Brás Med Trop.* 20:129-32.

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

Gaffen SL (2008). An overview of IL-17 function and signaling. *Cytokine.* (43): 402-7.

Gegembauer G, Araujo LM, Pereira EF, Rodrigues AM, Paniago AMM, Hahn RC, De Camargo ZP (2014). Serology of Paracoccidioidomycosis Due to *Paracoccidioides lutzii*. *PLoS Negl Trop Dis.* 8(7): e2986.

Ge Healthcare. 2-D Electrophoresis Principles and Methods. GE, 2004,162p.

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

Gilar M, Olivova P, Daly AE, Gebler JC (2005). Two-dimensional separation of peptides using RP- RP-HPLC system with differentpH in first and second separation dimensions. *J. Sep. Sci.* (28): 1694–1703.

Goldman GH, Marques ME, Duarte R, de Souza Bernardes LA, Quiapin AC, Vitorelli PM (2003). Expressed sequence tag analysis of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase: identification of putative homologues of *Candida albicans* virulence and pathogenicity genes. *Eukaryot Cell*. (2): 34-48.

Gozalbo D, Gil-Navarro I, Azorion I, Renau-Piqueras IJ, Martinez JP, Gil ML (1998) . The cell wall-associated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is also a fibronectin and laminin binding protein. *Infect Immun*. 66(5): 2052-2059.

Gralla EB, Thiele DJ, Silar P, Valentine JS (1991). ACE1, a copper-dependent transcription factor, activates expression of the yeast copper, zinc superoxide dismutase gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, (88): 8558-62.

Graves PR, Haystead TA. (2002) Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol Mol Biol Rev*. (66): 39-63.

Hassett R and Kosman DJ (1995). Evidence for Cu(II) reduction as a component of copper uptake by *Saccharomyces cerevisiae* . *J. Biol. Chem*. (270): 128 – 134.

Hamza I, Gitlin JD (2002). Copper chaperones for cytochrome c oxidase and human disease. *J Bioenerg Biomembr*. (34): 381-8.

- Hill KL, Hassett R, Kosman D, Merchant S (1996). Regulated copper uptake in *Chlamydomonas reinhardtii* in response to copper availability. *Plant Physiol.* (112): 697 – 704 .
- Hodgkinson V, Petris MJ (2012). Copper homeostasis at the host-pathogen interface. *J Biol Chem.* (287): 13549-55.
- Hornig YC, Cobine PA, Maxfield AB, Carr HS, Winge DR, (2004). Specific copper transfer from the Cox17 metallochaperone to both Sco1 and Cox11 in the assembly of yeast cytochrome C oxidase. In: *J Biol Chem United States.* 35334-40.
- Horn D, Barrientos A (2008). Mitochondrial copper metabolism and delivery to cytochrome c oxidase. *IUBMB Life.* (60): 421–429.
- Howe G, Merchant S (1992). Heavy metal-activated synthesis of peptides in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.*(98): 127 – 136 .
- Huffman DL, O'Halloran TV (2001). Function, structure, and mechanism of intracellular copper trafficking proteins. In: *Annu Rev Biochem United States*, pp. 677-701.
- Ibrahim-Granet O, Dubourdeau M, Latgé JP, Ave P, Huerre M, Brakhage AA, Brock M. (2008). Methylcitrate synthase from *Aspergillus fumigatus* is essential for manifestation of invasive aspergillosis. *Cell Microbiol.* (10): 134–148.
- Jiang N, Sun N, Xiao D, Pan J, Wang Y, Zhu X. (2009). A copper-responsive factor gene Cuf1 is required for copper induction of laccase in *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Microbiol Lett*, (296): 84-90.
- Jimenez-Finkel BE, Murphy JW (1998). induction of antigen-specific T supresor cells by soluble *Paracoccidioides brasiliensis* antigens. *Infect Immun.* (56):734-737.

- Johnson L. (2008). Iron and siderophores in fungal-host interactions. *Mycol Res.* (112): 170-183.
- Jung WH, Hu G, Kuo W, Kronstad JW (2009). Role of ferroxidases in iron uptake and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell.* (8): 1511-20.
- Kehl-Fie TE, Skaar EP (2010). Nutritional immunity beyond iron: a role for manganese and zinc. *Curr Opin Chem Biol.* (14): 218-24.
- Kim, BE, Nevitt T, Thiele DJ (2008). Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. *Nat. Chem. Biol.* (4): 176–185.
- Kossowska B, Dudka I, Gancarz R, Antonowicz-Juchniewicz J (2009) Proteomic analysis of protein profiles in some pathological stages of the human organism. *Postepy Higieny Medycyny Doswiadcjalnej.* 549-563.
- Lacaz CS. *Paracoccidioides brasiliensis*: morphology, evolutionary cycle, maintenance during saprophytic life, biology, virulence, taxonomy. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G (1994). *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton: CRC Press: 13-25.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* (227): 680-685.
- Lalioi V, Muruais G, Tsuchiya Y, Pulido D, Sandoval IV (2009). Molecular mechanisms of copper homeostasis. *Front Biosci United States.* (14): 4878- 903.
- Labbe S, Zhu Z Thiele DJ (1997). Copper-specific transcriptional repression of yeast genes encoding critical components in the copper transport pathway. *J Biol Chem,* (272): 15951-8.
- LieboldI B, Graack H, Pohl T (2006). Two dimensional gel electrophoresis as tool for proteomics studies in combination with protein identification by mass spectrometry. *Proteomics.* 4688-4703.

Lim D, Hains P, Walsh B, Bergquist P, Nevalainen H (2001). Proteins associated with the cell envelope of *Trichoderma reesei*: A proteomic approach. *Proteomics*. (1): 899-909.

Lima SL, Casaletti L, Bailão AM, Vasconcelos ATR, Fernandes GR, Soares CMA. Transcriptional and proteomic Response to Carbon Starvation in *Paracoccidioides*. *PLoS One*. 8(5): e2855.

Linz R, Lutsenko S (2007). Copper-transporting ATPases ATP7A and ATP7B: cousins, not twins. *J Bioenerg Biomembr*. (39): 403-7.

Lorenz MC, Fink GR (2002). Life and death in a macrophage: role of the glyoxylate cycle in virulence. *Eukaryot. Cell*. (1): 657-662.

Lutz A (1908). Uma micose pseudo-coccidíca localizada na boca e observada no Brasil: Contribuição ao conhecimento das hiphoblastomicoses americanas. *Brasil Méd*.22: 121–124.

Lustsenko S, Leshane ES, Shinde U (2007). Biochemical basis of regulation of human coppertransporting ATPases. *Arch Biochem Biophys*. (463): 134-48.

Matute DR, McEwen JG, Puccia R, Montes BA, San-Blas G, et al (2006) Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol Biol Evol* 23: 65-73.

Maresca B, Kobayashi GS (2000). Dimorphism in *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces dermatitidis*. *Contrib Microbiol*.p. 201-216.

Marques AS 2003. Paracoccidioidomicose: atualização epidemiológica, clínica e terapêutica. *Na Brás Dermatol*. 73(2):135-50.

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

Marcus K, Joppich C, May C, Pfeiffer K, Sitek B, Meyer H, Stuehler K. (2009). High-resolution 2-DE. *Methods in Molecular Biology*. 221-240.

Maerker C, Rohde M, Brakhage AA, Brock M (2005). Methylcitrate synthase from *Aspergillus fumigatus*. Propionyl-CoA affects polyketide synthesis, growth and morphology of conidia. *FEBS J.* (272): 3615–3630.

Ma JF, Hager PW, Howell ML, Phibbs PV, Hassett Jr DJ (1998). Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa zwf* gene encoding glucose-6-phosphate dehydrogenase, an enzyme important in resistance to methyl viologen (paraquat). *J. Bacteriol.* (180): 1741–1749.

Mayer FL, Wilson D, Hube B (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence.* (4): 119-28.

McKinney JD, Honer zu Bentrup EJ, Munoz-Elias A, Miczak B, Chen WT, Chan D, Swenson JC, Sacchetti WR, Jacobs Jr, DG, Russell (2000). Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature .* (406): 735– 738.

Mendes RP 1994. The gamut of clinical manifestations. In Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del- Negro G eds. *Paracoccidioidomycosis*, 1st edn. Boca Raton: CRC Press. Pp 233-258.

Mendes-Giannini MJS, Bueno JP, Yasuda MAS (1990). Antibody response to the 43 kDa glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* as a marker for the evaluation of patients under treatment. *Am J Trop Med Hyg.* (43): 200-5.

Montenegro MR, Miyaji M, Franco M, Nishimura K, Coelho KI, Horie Y, Mendes RP, Sano A, Fukushima K, Fecchio D (1996). Isolation of fungi from nature in the region of Botucatu,

state of São Paulo, Brazil, na endemic area of paracoccidioidomycosis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 91(6): 665-70.

Mosmann TR & Coffman R (1989). Heterogeneity of secretion patterns and function of helper T cells. Adv Immunol. (46): 111-115.

Monteoliva L, Martinez-Lopez R, Pitarch A, Hernaez ML, Serna A, Nombela C, Albar JP, Gil C (2010). Quantitative proteome and acidic subproteome profiling of *Candida albicans* yeast-to-hypha transition. J Proteome Res. (10): 502-517.

Murad AM, Souza GH, Garcia JS, Rech EL (2011). Detection and expression analysis of recombinant proteins in plant-derived complex mixtures using nanoUPLC-MS(E). J. Sep. Sci., 34(19), pp.2618–30.

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

Musatti CC, Rezkallah MT, Mendes E, Mendes NF (1976). *In vivo* and *in vitro* evaluation of cell mediated immunity in patients with paracoccidioidomycosis. Cell Immunol. (24): 365.

Mota NG, Peracoli MT, Mendes RP, Gattass CR, Marques SA, Soares AM, Izatto IC, Rezkallah IMT (1988). Mononuclear cell subsets in patients with different clinical forms of paracoccidioidomycosis. J Med Vet Mycol. (26): 105.

Nemecek J C, Wuthrich M, Klein B S (2006). Global control of dimorphism and virulence in fungi. Science New York, NY. 312, 583-588.

Nyhus K, Jacobson ES. (2004). Oxy2 as a transcriptional activator gene for copper uptake in *Cryptococcus neoformans*. Med Mycol. (42). 325-31.

Nogueira SV, Fonseca FL, Rodrigues ML, Mundodi V, Abi-Chacra EA, Winters MS, Alderete JF, Soares CMA (2010). *Paracoccidioides brasiliensis* enolase is a surface protein

that binds plasminogen and mediates interaction of yeast forms with host cells. *Infect Immun.* (9): 4040-4050.

Nogueira V, Bonfim SMRC, Castro KP, Silva JF, Mendes-Giannini, Soares MJ, Pereira M, Soares CMA (2012). Comparative transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* during in vitro adhesion to type I collagen and fibronectin: identification of potential adhesions. *Research in Microbiology.* (163): 182-191.

Nose Y, Rees EM, Thiele DJ (2006). Structure of the Ctr1 copper trans'PORE'ter reveals novel architecture. In: *Trends Biochem Sci* England. 604-7.

O'Halloran TV, Culotta VC (2000). Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions. *Journal of Biological Chemistry.* (275): 25057–25060.

Ono Bi, Hazu T, Yoshida S, Kawato T, Shinoda S, Brzvwczy J, Paszewski A (1999). Cysteine Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: A new outlook on Pathway and regulation. *Yeast.* (15): 1365-1375.

Orsborn KI, Shubitz LF, Peng T, Kellner EM, Orbach MJ, Haynes PA, Galgiani JN. Protein Expression Profiling of *Coccidioides posadasii* by Two-Dimensional Differential In-Gel Electrophoresis and Evaluation of a Newly Recognized Peroxisomal Matrix Protein as a Recombinant Vaccine Candidate. *Infect Immun.* 2006 Mar;74(3):1865-72.

Okado-Matsumoto A, Fridovich I (2001). Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver - Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J Biol Chem.* 276: 38388–38393.

Osaki S, Donald A, Johnson, Frieden E (1970). The Mobilization of Iron from the the Perfused Mammalian Liver by a Serum Copper Enzyme, Ferroxidase I. *The Journal of Biological.* (246): 3018-3023.

Pagliari C, Sotto MN (2003). Dendritic cells and pattern of cytokines in paracoccidioidomycosis skin lesions. *Am J Dermatopathol.* (25): 107-112.

Pagliari C, Pereira NV, Kanashiro L, Stegun FW, Croda J, Duarte MI, Sotto MN (2010). Characterization of cytotoxic immune response in skin mucosal lesions of paracoccidioidomycosis. *J Cutan Pathol.* (37): 565-70.

Pagliari C, Fernandes ER, Stegun FW, da Silva WL, Seixas Duarte MI, Sotto MN (2011). Paracoccidioidomycosis: cells expressing IL17 and Foxp3 in cutaneous and mucosal lesions. *Microb Pathog.* (50): 263-7.

Paião MR (2012). Avaliação da participação de células produtoras de il-17 (th17) na paracoccidioidomicose humana: efeito do tratamento com il-17 e il-23 sobre a atividade fungicida e capacidade migratória de neutrófilos. 161f. Tese (Mestrado). Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas.

Palmiter RD (1998). The elusive function of metallothioneins. *Proc Natl Acad Sci USA.* (95): 8428-30.

Parente AF, Bailão AM, Borges CL, Parente JA, Magalhães AD, Ricart CA, Soares CMA (2011). Proteomic Analysis Reveals That Iron Availability Alters the Metabolic Status of the Pathogenic Fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *PLoS One.* 6: e22810.

Prado M; Da Silva MB, Laurenti R; Travassos RL; Taborda CP (2009). Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104(3): 513-521.

Prigneau O, Porta A, Poudrier JA, Colonna-Romano S, Noel T, Maresca B (2003). Genes involved in beta-oxidation, energy metabolism and glyoxylate cycle are induced by *Candida albicans* during macrophage infection. *Yeast.* (20):723–730.

Pena MM, Lee J. & Thiele DJ (1999). A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution. *J Nutr.* (129): 1251-60.

- Petris, MJ. (2004). The SLC31 (Ctr) copper transporter family. *Eur J Physiol* 447:752–755.
- Pena MM, Puig S, Thiele DJ (2000). Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* high affinity copper transporter Ctr3. *J. Biol. Chem.* (275): 33244–33251.
- Pedrosa LF, Cozzolino AM (1999), Alterações metabólicas e funcionais do cobre em diabetes mellitus. *Revista de Nutrição.* 213-224.
- Pinzan CF, Ruas LP, Casabona-Fortunato AS, Carvalho FC, Roque-Barreira MC (2010). Immunological basis for the gender differences in murine *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *PloS one* (5). e10757.
- Pigosso LL, Parente AF, Coelho AS, Silva LP, Borges CL, Bailão AM, Soares CM. (2013). Comparative proteomics in the genus *Paracoccidioides*. *Fungal Genet Biol.* (60): 87-100.
- Puig S, Lee J, Lau M, Thiele, DJ (2002). Biochemical and genetic analyses of yeast and human high affinity copper transporters suggest a conserved mechanism for copper uptake. *J. Biol. Chem.* (277): 26021–26030.
- Pitarch A, Sánchez M, Nombela C, Gil C. (2003). Analysis of the *Candida albicans* proteome. I. Strategies and applications. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* (787):101-128.
- Pufahl RA, Singer CP, Peariso KL, Lin SJ, Schmidt PJ, Fahrni CJ, Culotta VC, Penner-Hahn JE, O'Halloran TV (1997). Metal ion chaperone function of the soluble Cu(I) receptor Atx1. *Science.* (278): 853-6.
- Queiroz-Telles F (1994). *Paracoccidioides brasiliensis* ultrastructural findings. *Paracoccidioidomycosis.* M. Franco, C. S. Lacaz, A. Restrepo-Moreno and G. Del Negro. London, CRC Press. 27–44.

- Rae TD, Schmidt PJ, Pufahl RA, Culotta VC, O'Halloran TV (1999). Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science*. (284): 805-8.
- Raja MR, Waterman SR, Qiu J, Bleher R, Williamson PR, O'Halloran TV (2013). A copper hyperaccumulation phenotype correlates with pathogenesis in *Cryptococcus neoformans*. *Metallomics*. 363-71.
- Rappleye CA, Goldman WE (2006). Defining virulence genes in the dimorphic fungi. *Annu Rev Microbiol*. (60): 281-303.
- Ramos-e-Silva M (2004). Facial and oral aspects of some venereal and tropical diseases. *Acta Dermatovenereol Croat*. (12): 173-180.
- Ramirez MA, Lorenz MC (2007). Mutations in alternative carbon utilization pathways in *Candida albicans* attenuate virulence and confer pleiotropic phenotypes. *Eukaryot. Cell* (6): 280–290.
- Restrepo A, Jimenez BE, 1980. Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase in a chemically defined medium. *Journal of Clinical Microbiology* (12): 279e281.
- Restrepo A (1985). The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *Sabouraudia*. 23: 323-34.
- Restrepo-Moreno A (2003). Paracoccidioidomycosis. *Clinical Mycology*. W. E. Dismukes, P. G. Pappas and J. Sobel. New York, Oxford University Press: 328–345.
- Ress EM, Thiele DJ (2004). From aging to virulence: forging connections through the study of copper homeostasis in eukaryotic microorganisms. *Curr Opin Microbiol*, 7(2): 175-84.
- Rees EM, Lee J, Thiele DJ (2004). Mobilization of intracellular copper stores by the ctr2 vacuolar copper transporter. In: *J Biol Chem United States*, pp. 54221-9.

Rees EM, Thiele DJ (2007). Identification of a vacuole-associated metalloreductase and its role in Ctr2-mediated intracellular copper mobilization. In: *J Biol Chem* United States, pp. 21629-38.

Rezende TC, Borges CL, Magalhães AD, de Sousa MV, Ricart CA, Bailão AM, Soares CMA (2011). A quantitative view of the morphological phases of *Paracoccidioides brasiliensis* using Proteomics. *J Proteomics*. 75: 572-587.

Romani L. The Tcell response against fungal infections. *Curr Opin Immunology*.1997; 9: 484-490.

Rutherford JC, Bird AJ (2004). Metal responsive transcription factors that regulate iron, zinc, and copper homeostasis in eukaryotic cells. *Eukaryot Cell*. (3): 1-13.

Rohner TC, Staab D, Stoeckli M. (2005) Maldi mass spectrometric imaging of biological tissue sections. *Mechanisms of Ageing and Development*.177 – 185.

Rumbley, C.A. & Phillips, S.M. (1999) The schistosome granuloma: an immunoregulatory organelle. *Microbes Infect*. Jun ;1(7):499-504.

Saitoh Y, Izumitsu K, Morita A, Tanaka C (2010). A copper-transporting ATPase BcCCC2 is necessary for pathogenicity of *Botrytis cinerea*. *Mol.Genet.Genomics*. (284): 33–43.

San-Blas G, Niño-Vega G, Turriaga T (2002). *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med Mycol*.p. 225-242.

Sano A, Nishimura K, Miyaji M (1999). The Research Encouragement Award. Effects of sex hormones on sexual difference of experimental paracoccidioidomycosis. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* .40 (1), 1-8.

Serrano R, Bernal D, Simon E, Arino J (2004). Copper and iron are the limiting factors for growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in an alkaline environment. In: *J Biol Chem* United States. 19698-704.

Shankar J, Restrepo A, Clemons, KV, Stevens, DA (2011). Hormones and the resistance of women to paracoccidioidomycosis. *Clin Microbiol Rev.* (24), 296-313.

Shome SK, Batista AC (1963). Occurrence of *Paracoccidioides brasiliensis* in the soil of Recife, Brazil. *Rev Fac Med Univ Fed Ceará.* (3):90 – 94.

Shapiro RS, Uppuluri P, Kus AK, Collins C, Senn H, Perfeito JR, Heitman J, Cowen LE. 2009. Hsp90 orchestrates temperature-dependent *Candida albicans* morphogenesis via Ras1-PKA signaling. *Curr Biol.* 19: 621-629.

Schmidt PJ, Rae TD, Pufahl RA, Hamma T, Strain J, O'Halloran TV, Culotta VC. (1999). Multiple protein domains contribute to the action of the copper chaperone for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* (274): 23719–23725.

Silva-Vergara ML, Martínez R, Chada A, Madeira M, Freita-Silva G (1998). Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil a coffee plantation in Ibiá, State of Minas Gerais, Brazil. *Med Mycol.* 36:37–42.

Silva MG, Schrank A, Bailão EF, Bailão AM, Borges CL, Staats CC, Parente JA, Pereira M, Salem-Izacc SM, Mendes-Giannini MJ, Oliveira RM, Silva LK, Nosanchuk JD, Vainstein MH, de Almeida Soares CM. (2011) The homeostasis of iron, copper, and zinc in *Paracoccidioides brasiliensis*, *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, and *Cryptococcus gattii*: a comparative analysis. *Front Microbiol.* (2): 49.

Solioz M, Abicht HK, Mermoud M, Mancini S (2010). Response of gram-positive bacteria to copper stress. *J Biol Inorg Chem.* (15): 3-14.

Sprenger GA (1995). Genetics of pentose-phosphate pathway enzymes of *Escherichia coli* K-12. *Arch. Microbiol.* (164):324–330.

Stafford SL, Bokil NJ, Achard ME, Kapetanovic R, Schembri MA, McEwan AG, Sweet MJ (2013). Metal ions in macrophage antimicrobial pathways: emerging roles for zinc and copper. *Biosci Rep.* 33. e00049.

Sturtz LA, Diekert K, Jensen LT, Lill R, Culotta VC (2001). A fraction of yeast Cu, Zn superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria - A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. *J Biol Chem.* (276): 38084–38089.

Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, Kasuga T, Geiser DM, Hibbett DS, Fisher MC (2000). Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genet Biol* 31(1): 21-32.

Teixeira MM, Theodoro RC, Oliveira FF, Machado GC, Hahn RC, Bagagli E, San-Blas G, Felipe MSS (2014). *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications. *Med Mycol.* 52(1):19-28.

Teutschbein J, Albrecht D, Pötsch M, Guthke R, Amanianda V, Clavaud C, Latgé JP, Brakhage AA, Kniemeyer O (2010). Proteome Profiling and Functional 220 Classification of Intracellular Proteins from Conidia of the Human-Pathogenic Mold *Aspergillus fumigatus*. *J Proteome Res.* (9): 3427-3442.

Theodoro RC, Candeias JMG, Araújo JP Jr, Bosco SMG, Macoris SAG, Padula LO Jr, Franco M, Bagagli E (2005). Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. *Med Mycol.* 43(8):725-9.

Theodoro RC, Teixeira Mde M, Felipe MS, Paduan Kdos S, Ribolla PM, San-Blas G, Bagagli, E (2012). Genus *Paracoccidioides*: Species recognition and biogeographic aspects. *PLoS One* 7(5): e37694.

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

URANO K, DAIMON T, BANNO Y, MITA K, TERADA T, SHIMIZU K, KATSUMA S, SHIMADA T. FEBS J (2010). MOLECULAR DEFECT OF ISOVALERYL-CoA DEHYDROGENASE IN THE SKUNK MUTANT OF SILKWORM, BOMBYX MORI . FEBS JOURNAL. (277): 4452-63.

Valle ACF, Costa RLB. Paracoccidioidomicose (2001). In: Batista RS, Igreja RP, Gomes AD, Huggins DW. *Medicina Tropical: abordagem atual das doenças infecciosas e parasitárias*. Rio de Janeiro: Cultura Médica. 943-58.

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

Vellucci VF, Gyax SE, Hostetter MK, (2007). Involvement of *Candida albicans* pyruvate dehydrogenase complex protein X (Pdx1) in filamentation. *Fungal Genetics and Biology* 44: 979–990.

Waterman SR, Hacham M, Hu G, Zhu X, Park YD, Shin S, Panepinto J, Valyi-Nagy T, Beam C, Husain S, Singh N, Williamson PR (2007). Role of a Cuf1/Ctr4 copper regulatory axis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Invest*, 117, 794-802.

Wagner D, Jörg Maser, Barry Lai, Zhonghou Cai, Clifton E. Barry III, Kerstin Höner zu Bentrup, David G. Russell and Luiz E. Bermudez (2005). Elemental analysis of *Mycobacterium avium*-, *Mycobacterium tuberculosis*-, and *Mycobacterium smegmatis*-containing phagosomes indicates pathogen-induced microenvironments within the host cell's endosomal system. *J Immunol.* (174): 1491-500.

Walton FJ, Idnurm A Heitman J. (2005). Novel gene functions required for melanization of the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. In: *Mol Microbiol* England, pp. 1381-96.

Welch WJ (1992). Mammalian stress response: Cell physiology, structure/function of stress proteins and implications for medicine and disease. *Physiological reviews*, (72): 1063-1081.

Weger HG (1999). Ferric and cupric reductase activities in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* : Experiments using iron-limited chemostats . *Planta*. (207): 377 – 384 .

Wegner SV, Arslan H, Sunbul M, Yin J, He C (2010). Dynamic copper(I) imaging in mammalian cells with a genetically encoded fluorescent copper(I) sensor. *J Am Chem Soc*. (132): 2567.

Winters MS, Spellman DS, Chan Q, Gomez FJ, Hernandez M, Catron B, Smulian AG, Neubert TA, Deepe GS Jr. 2008. *Histoplasma capsulatum* proteome response to decreased iron availability. *Proteome Sci*. 6: 36.

White C, Lee J, Kambe T, Fritsche K, Petris MJ (2009). A role for the ATP7A copper-transporting ATPase in macrophage bactericidal activity. *J Biol Chem*, (284): 33949-56.

Winters MS, Spellman DS, Chan Q, Gomez FJ, Hernandez M, Catron B, Smulian AG, Neubert TA, Deepe GS Jr (2008). *Histoplasma capsulatum* proteome response to decreased iron availability. *Proteome Sci*. (6): 36.

Wood LK, Dennis JT. Transcriptional Activation in Yeast in Response to Copper Deficiency Involves Copper-Zinc Superoxide Dismutase (2009)..*The Journal of Biological Chemistry*. (284):404–413.

Wolschendorf F, Ackart D, Shresthat B, Hoscall-Dire L, Nolan S, Lamichhane G, Wangy, Bossmann SH, Basaraba RJ, Niederweis M (2011). Copper resistance is essential for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Nat Acad Sci USA United States*. (108): 1621-1626.

Yamaguchi-Iwai Y., Serpe M., Haile D., Yang W., Kosman D.J., Klausner R.D. & Dancis A (1997). Homeostatic regulation of copper uptake in yeast via direct binding of MAC1 protein to upstream regulatory sequences of FRE1 and CTR1. *J Biol Chem*, 272, 17711-8.

Yamaguchi-Iwai Y, Serpe M, Haile D, Yang W, Kosman DJ, Klausner RD Dancis A (1997). Homeostatic regulation of copper uptake in yeast via direct binding of MAC1 protein to upstream regulatory sequences of FRE1 and CTR1. *J Biol Chem*, (272): 17711-8.

Yang F, S L Naylor, JB Lum, S Cutshaw, JL McCombs, KH Naberhaus, JR McGill, GS Adrian, CM Moore, DR Barnett (1986). Characterization, mapping, and expression of the human ceruloplasmin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (83): 3257-61.

Yonkovich J, McKendry R, Shi X Zhu Z. (2002). Copper ion-sensing transcription factor Mac1p post-translationally controls the degradation of its target gene product Ctr1p. In: *J Biol Chem United States*, pp. 23981-4.

Zamboni N, Fischer E, Laudert D, S, Aymerich S, Hohmannan HP, Sauer U (2004). The *Bacillus subtilis yqjI* gene encodes the NADP<sub>+</sub>-dependent 6-P-gluconate dehydrogenase in the pentose phosphate pathway. *J. Bacteriol.* (186):4528–4534