



**FACULDADE UNIÃO DE GOYAZES**  
**CURSO DE FARMACIA**

**ANÁLISE *IN SÍLICO* DE DOMÍNIOS PROTEICOS LIGANTES DE COBRE DO  
COMPLEXO *PARACOCCIDIIDES***

**Jordanna Mirelle Carvalho Pardiniho**  
**Shirley Danielly da Silva**

**Orientador: Prof. Esp. Aline de Sousa Brito**

Trindade - GO

2016

**FACULDADE UNIÃO DE GOYAZES**  
**CURSO DE FARMACIA**

**ANÁLISE *IN SÍLICO* DE DOMÍNIOS PROTEICOS LIGANTES DE COBRE DO  
COMPLEXO *PARACOCCIDIOIDES***

**Jordanna Mirelle Carvalho Pardinho**

**Shirley Danielly da Silva**

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

**Orientador: Prof. Esp. Aline de Sousa Brito**

Trindade - GO

2016

**Jordanna Mirelle Carvalho Pardino**  
**Shirley Danielly da Silva**

**ANÁLISE *IN SÍLICO* DE DOMÍNIOS PROTEICOS LIGANTES DE COBRE DO  
COMPLEXO *PARACOCCIDIOIDES***

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

---

Prof. Esp. Aline de Sousa Brito

FACULDADE UNIÃO DE GOYAZES

---

Prof. Ms. Julliana Rodrigues Moura

FACULDADE UNIÃO DE GOYAZES

---

Prof. Ms. Leandro do Prado Assunção

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

Trindade - GO

29/11/2016

## **ANÁLISE *IN SILICO* DE DOMÍNIOS PROTEICOS LIGANTES DE COBRE DO COMPLEXO *PARACOCCIDIOIDES***

Jordanna Mirelle Carvalho Pardini<sup>1</sup>

Shirley Danielly da Silva<sup>1</sup>

Aline de Sousa Brito<sup>2</sup>

### **RESUMO**

Os fungos do gênero *Paracoccidioides sp.* são agentes etiológicos da doença sistêmica paracoccidioidomicose (PMC) que acomete primeiramente os pulmões, pela inalação de esporos do fungo e pode disseminar-se para diversos órgãos. No processo infeccioso o patógeno expressa algumas proteínas a fim de captar nutrientes do meio, que são necessários para sua sobrevivência. Desta forma, o objetivo desse trabalho é a análise *in silico* de domínios proteicos de cobre do complexo *Paracoccidioides*. As proteínas ligantes de cobre do complexo *Paracoccidioides* foram obtidas através de domínio público, as sequências das Cu-proteínas foram obtidas por meio do banco de dados do Instituto Broad e pedant3 database, a análise *in silico* foi realizada pelo software *Sequence Manipulation Suite* depois da obtenção dos domínios proteicos. A análise de domínios revelou um total de 1148 sequências, em que 664 pertenciam ao *P. lutzii* e 484 do *P. brasiliensis*. Além disso, dentre essas destaca-se domínios ricos em histidina, cisteína e metionina.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Paracoccidioides*. Análise *in silico*. Domínios de cobre

### **IN SILICO ANALYSIS OF COPPER BINDING PROTEIN DOMAINS OF THE PARACOCCIDIOIDES COMPLEX**

### **ABSTRACT**

The fungi of the genus *Paracoccidioides* sp are etiologic agents of systemic disease paracoccidioidomycosis (PCM) that first affects the lungs by inhalation of spores of the fungus and can spread to several organs. In the infectious process the pathogen expresses some proteins in order to capture nutrients from the medium, which are necessary for its survival. Therefore, the objective of this work is the *in silico* analysis of copper protein domains in the *Paracoccidioides* complex. The copper binding proteins of the *Paracoccidioides* complex were obtained through the public domain, the Cu-protein sequences were obtained through the Broad Institute database and pedant3 database, *in silico* analysis was performed by *Sequence Manipulation Suite*

software after obtaining of protein domains. The analysis of domains revealed a total of 1148 sequences in which 664 belonged to *P. lutzii* and 484 to *P. brasiliensis*. In addition, among these, domains rich in histidine, cysteine and methionine.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Paracoccidioides*. *In silico* analysis. Copper domains.

---

<sup>1</sup> Acadêmico do Curso de Farmácia da Faculdade União de Goyazes

<sup>2</sup> Orientador: Prof. Esp. Aline de Sousa Brito, Faculdade União de Goyazes;

## 1- INTRODUÇÃO

Os fungos do gênero *Paracoccidioides sp* são patogênicos termodimórficos, assim caracterizados por apresentarem mudanças de uma fase filamentosa multicelular para uma fase leveduriforme unicelular (THEODORO et al., 2012). Esses micro-organismos quando cultivados *in vitro* ou em condições ambientais, onde as temperaturas variam em torno de 22°C à 27°C, crescem como micélio. (FRANCO et al., 1989; QUEIROZ-TELLES 1994). Quando em condições de estresse, como carência de nutrientes ou baixas temperaturas o micélio pode transformar-se em conídios (RESTREPO 1988). O micélio incubado *in vitro* à temperatura em torno de 36°C ou alojados nos tecidos do hospedeiro podem sofrer transição dimórfica para a fase leveduriforme (MCEWEN et al., 1987).

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica que acomete inicialmente os pulmões, mas pode disseminar-se afetando outros órgãos (RESTREPO, 1978). A via principal de infecção ocorre por inalação de propágulos infectantes como conídios ou através de fragmentos de hifas (FRANCO 1987). Sendo esta, uma doença predominante nos países da América Latina.

É preciso que esses organismos patogênicos garantam sua sobrevivência para crescer em condições hostis, como é o hospedeiro humano. Assim, é essencial que eles regulam sua expressão gênica reagindo ao hospedeiro (BAILÃO et al., 2006).

A homeostase de metal tem sido bem citada como um fator crucial na patogênese, e o *Paracoccidioides spp* expressa diversos genes de homeostase de metal que se codificam para moléculas que têm sido caracterizadas como importantes fatores de virulência em fungos (SILVA et al., 2011).

Algumas proteínas para realizarem sua função biologicamente precisam de um grupo prostético que é a parte não-aminoácida destas, como as metaloproteínas que apresentam um metal especificamente, onde após a interação atuam na estrutura, catálise e regulação da função protéica. (LEHNINGER *et al.*, 2000; DEGTYARENKO, 2000). Através de estudos que buscam entender as funções desses íons metálicos surgiu a metaloproteômica (BERTINI and CAVALLARO, 2008). Os metais de transição são necessários para vários processos biológicos, pois algumas proteínas são dependentes destes.

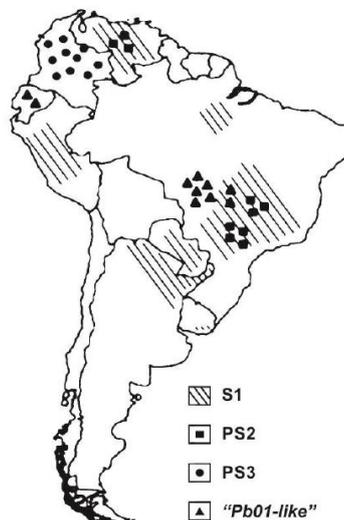
Deste modo, este trabalho tem como objetivo a análise *in silico* de domínios protéicos de cobre do complexo *Paracoccidioides*. Assim como a obtenção das sequências das proteínas ligantes de cobre, análise da frequência dos principais domínios de cobre e identificação dos principais aminoácidos envolvidos na ligação cobre – proteína.

## 2. REFERENCIA TEÓRICO

### 2.1- Aspectos gerais do gênero *Paracoccidioides*

O gênero *Paracoccidioides* a princípio era constituído somente por uma espécie filogenética, *Paracoccidioides brasiliensis*, agente etiológico da Paracoccidioidomicose (PCM). Depois estudos a respeito de polimorfismo genético sugeriram uma divisão em três espécies filogenéticas, divididas em S1 (espécie filogenética 1, com 38 isolados), PS2 (espécie filogenética 2, com 5 isolados) e PS3 (espécie filogenética 3, com 21 isolados) (MATUTE et al., 2006). Devido ao avanço das técnicas de biologia molecular Carrero et al., (2008) notaram que a linhagem 01 de *P. brasiliensis* (*Pb 01*) divergia das outras espécies propondo um quarto grupo filogenético – *Pb 01-like*. Através de estudos realizados por Texeira et al., (2009) descobriram um grupo de 17 isolados similares genotipicamente, incluindo *Pb 01*, que se distingue das demais espécies filogenéticas (S1/PS2/PS3), reforçando a ideia de uma nova espécie filogenética que foi denominada de *Pb 01-like* que é endêmico nas regiões Centro-Oeste do Brasil, como pode ser visto na figura 01:

**Figura 01.** Distribuição geográfica das espécies do gênero *Paracoccidioides* sp. (Fonte: TEIXEIRA et al., 2009)



Através da figura 01 pode-se observar que o *Paracoccidioides sp.* é um fungo predominante da América Latina. A espécie filogenética S1 pode ser encontrada na Venezuela, Perú, Paraguai, em uma determinada região da Argentina e no Brasil, principalmente na região Centro Oeste. Já a espécie PS2 é endêmica na Venezuela e também na região Centro Oeste do Brasil. A PS3 é restrita da Colômbia e o Pb01-like está presente somente no Equador e também na região Centro Oeste do Brasil.

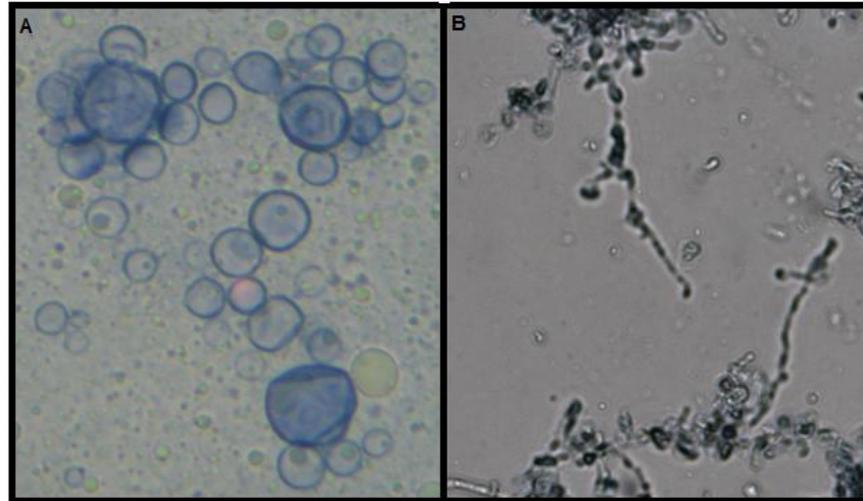
O gênero *Paracoccidioides sp.* foi classificado conforme comparações filogenéticas de sequências de nucleotídeos da subunidade maior do RNA ribossomal realizada por Leclerc et al., (1994) no qual o fungo foi classificado como pertencente ao filo *Ascomycota*, ordem *Onygenales* família *Ajellomycetaceae* onde também fazem parte dessa classificação os gêneros *Blastomyces*, *Emmonsia* e *Histoplasma* (BAGAGLI et al., 2008; BOCCA et al., 2013). Esses microrganismos apresentam diversas características em comum como, por exemplo, o dimorfismo.

Fungos dimórficos são capazes de transitar de sua forma filamentosa miceliana multicelular no ambiente para uma forma de leveduras unicelulares nos tecidos infectados. É possível realizar o processo inverso em laboratório, ou seja, mudar da forma de levedura para micélio. Esse mecanismo está diretamente relacionado com a patogenicidade, pelo fato dessa propriedade ser determinante na fase inicial da interação de fungos com o hospedeiro, uma vez que durante a transição o fungo restaura seu metabolismo conforme o ambiente que se encontra expressando novas moléculas que facilitam sua adaptação (SAN-BLAS et al., 2002; NEMECEK et al., 2006).

Os fungos que compreendem o gênero *Paracoccidioides sp.*, são capazes de sofrer transição morfológica podendo crescer como levedura ou micélio, como mostra a figura a seguir:

**Figura 02.** Morfologia microscópica do *Paracoccidioides brasiliensis*. **A.** Levedura. **B.** Micélio.

Fonte: Laboratório de Biologia Molecular - UFG



É possível observar a forma leveduriforme do fungo. Microscopicamente apresentam células esféricas ou ovais, medindo de 2-30  $\mu\text{m}$  de diâmetro, com múltiplos núcleos. A multiplicação das leveduras ocorre por brotamento polar ou multipolar, que dão à estrutura uma aparência de “roda de leme”, sendo esta, uma importante característica para o diagnóstico da Paracoccidioidomicose (RESTREPO 1978; SAN-BLAS et al., 2002). Como mostra a imagem A da figura anterior (Figura 02)

Já a imagem B da figura 02, mostra a forma filamentosa do fungo, conhecida como micélio. Crescem em condições ambientais ou em cultivo *in vitro*, onde as temperaturas variam em torno de 22 °C à 27 °C. Por meio do microscópio observa-se hifas hialinas septadas, medindo de 1 a 3  $\mu\text{m}$ , com raros clamidósporos terminais ou intercalares e com vários núcleos (FRANCO et al., 1989; QUEIROZ-TELLES 1994). Em condições de estresse, como carência de nutrientes ou baixas temperaturas o micélio pode transformar-se em conídios (RESTREPO, 1988). E quando incubados *in vitro* à temperatura em torno de 36 °C ou alojados nos tecidos do hospedeiro podem sofrer transição dimórfica para a fase leveduriforme (MCEWEN et al., 1987).

O *habitat* natural de *Paracoccidioides spp.* ainda não foi totalmente elucidado, no entanto alguns autores como Restrepo et al., (2001) propõem que o fungo possui pelo menos dois ambientes. O primeiro é o solo e plantas, o qual ele é encontrado no seu estado filamentoso. Já o segundo está associado com o hospedeiro (o homem e alguns animais domésticos e silvestres). Mais tarde Richini-Pereira et al.,

(2008) comprovou por meio de técnicas moleculares, a presença de *P.brasiliensis* em animais selvagens encontrados em estradas e rodovias. Por meio de Nested-PCR com oligonucleotídeos ITS específicos para *P.brasiliensis*, detectou-se o fungo em tatu (*Dasybus sp.*), preá (*Caviaaperea*), porco espinho (*Sphigurrusspnosus*), guaxinim (*Procyonancrivorus*), cachorro (*Canis familiares*) e furão (*Gallictisvittata*). No entanto estes animais devem ser considerados hospedeiros acidentais e não reservas naturais do fungo, pois os mesmos podem ser acometidos pela doença (CONTI-DIAZ, 2007).

## 2.2 Paracoccidioidomicose (PCM)

Embora existam aproximadamente 100.000 espécies fúngicas, apenas uma pequena parcela apresenta risco para a saúde humana desencadeando uma patologia no organismo em que estão instalados (SAN-BLAS& NIÑO - VEGA, 2002). Esses microrganismos que causam prejuízo e interferem diretamente na saúde dos animais são caracterizados como fungos patogênicos e podem provocar desde micoses superficiais até micoses sistêmicas (SCHAECHTER *et al.*, 2002; MURRAY *et al.*, 2004). Entre os causadores de patologia, estão os fungos dimórficos que são responsáveis pela maior parte das infecções fúngicas sistêmicas em humanos e em outros mamíferos (CHEN *et al.*, 2007; NEMECK *et al.*, 2007).

Entre as micoses sistêmicas no Brasil, a PCM representa 51,2% das causas de morte. Representando 87,9% dos casos em pessoas do sexo masculino. Em relação a idade, 53,4% dos pacientes portadores possuem de 30 a 59 anos. Dentre os estados brasileiros mais atingidos estão: Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul (PRADO *et al.*, 2009).

O gênero *Paracoccidioides sp.* é agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), micose sistêmica humana que acomete inicialmente os pulmões, mas pode disseminar-se para vias hematogênicas ou linfáticas podendo causar diferentes formas clínicas da doença (RESTREPO *et al.*, 1984; RIVITTI & AOKI, 1999; RESTREPO *et al.*, 2008; PRADO *et al.*, 2009; TEIXEIRA *et al.*, 2009; MATUTE *et al.*, 2006; BOCCA *et al.*, 2013). A primeira é a forma aguda, também chamada de forma juvenil, é a evolução mais grave da doença e afeta principalmente jovens e crianças, representando de 3 a 5% dos casos. A forma adulta ou crônica tem progressão mais lenta e representa mais de 90% dos casos (MONTENEGRO 1986; FRANCO, 1987).

**Figura 03.** Acometimentos clínicos da PCM. (Fonte: SHIKANAI-YASSUDA et al., 2006)



O processo infeccioso causado por esse fungo se dá por meio da inalação de propágulos infectantes como conídios ou através de fragmentos de hifas presentes no ambiente que tem como destino os alvéolos pulmonares, e posteriormente o fungo muda da forma miceliana para a forma de levedura (FRANCO 1987).

No organismo vivo o microrganismo pode ter dois destinos: primeiro, ele pode ser acometido pelo sistema imune inato que tem como primeira linha de defesa as células fagocitárias (neutrófilos, macrófagos e células dendríticas) que trabalham a fim de destruí-lo. Uma vez que o patógeno é reconhecido, ele sofre fagocitose, processo no qual ocorre a fusão do fagossomo (já com o micro-organismo) com lisossomo, formando o fagolisossomo, onde enzimas lisossomais e intermediários reativos de nitrogênio são produzidos, para a eliminação do microrganismo (JANEWAY & MEDZHITOV, 2002). Além disso as células fagocitárias também podem produzir citocinas que ativam o sistema imune adaptativo que é mediado por linfócitos (T e B).

Segundo, o microrganismo pode criar mecanismos para subverter a ataques dos fagócitos (HAAS, 2007; SEIDER et al., 2010) sobrevivendo no hospedeiro. Estudos realizados por Konno et al., (2009) mostraram que a gp43 é uma proteína da parede celular que reduz a função de macrófagos *in vitro*. Essa é uma das estratégias desenvolvidas pelo fungo para que ele possa alcançar órgãos e sistemas, como fígado, baço e sistema nervoso central pela via hematogênica e linfática (SAN-BLAS, 1993; VALERA et al., 2008).

Esta patologia ocorre com mais frequência em homens, principalmente trabalhadores das zonas rurais, em consequência do contato com o solo contaminado com o fungo. Fatores hormonais também estão diretamente

relacionados com a patogenicidade da doença. Em alguns estudos sugeriu-se que o hormônio 17- $\beta$ -estradiol impede a passagem do fungo da fase miceliana para a leveduriforme. Resultando em uma menor ocorrência em mulheres (RESTREPO et al., 1984).

Estudos sugerem que o fato dessa micose ser mais ocorrente em indivíduos do sexo masculino deve-se a influência do hormônio  $\beta$ -estradiol no processo de transição do fungo na fase miceliana para a fase leveduriforme no tecido hospedeiro. Restrepo et al.,(1984) relataram a inibição da transição dimórfica *in vitro*, que foi confirmada posteriormente por experimentos de infecção em camundongos fêmeas, onde foi possível observar a inibição da transição dimórfica (ARISTIZABAL et al., 1998), preconizando o efeito protetor do  $\beta$ -estradiol.

Ainda que o hormônio  $\beta$ -estradiol exerça papel essencial na proteção de indivíduos do sexo feminino contra a infecção pelo fungo *P. brasiliensis*, esse fator pode ser justificado também pela divergência de respostas imunológicas entre os sexos, visto que em estudos realizados por Pinzan et al., (2010), demonstraram uma maior produção das citocinas IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  por células do baço de camundongos fêmeas em resposta à um antígeno de superfície, sendo capaz de estimular os macrófagos a produzir citocinas e óxido nítrico, podendo influenciar a resposta imune contra o patógeno. Já as células de camundongos machos revelaram maior produção de IL-10, que leva a ativação de células fagocitárias para produção de óxido nítrico e enzimas proteolíticas na tentativa de eliminar o patógeno. Demonstrando assim respostas imunológicas diferentes entre os sexos. Portanto, nota-se que a menor ocorrência da PCM em indivíduos do sexo feminino ocorre tanto pela influência hormonal quanto pela resposta imunitária diferenciada.

### **2.3- Micronutrientes em sistemas biológicos**

Milhares de moléculas inorgânicas e orgânicas diferentes compõem os organismos vivos, são aproximadamente 27 elementos químicos no qual são classificados em principais (C, H, N, O, P, S, Ca e K) e secundários (As, B, Cl, Cr, F, I, Fe, Mg, Mn, Mo, Ni, Se, Si, Na, Sn, V, Zn e Cu). No meio dos elementos secundários temos íons metálicos, que se destacam por possuírem grande importância em inúmeros processos biológicos (NELSON, 1999). Esses íons metálicos não podem ser desenvolvidos pela célula, por esse motivo a homeostase

desses elementos dentro de sistemas biológicos deve ser rigorosamente regulada (FESTA & THIELE, 2011).

Segundo Permyakov (2009) com exceção do Sódio, Magnésio, Molibdênio e Tungstênio que pertencem ao terceiro, quinto e sexto período, respectivamente, os principais metais que são encontrados em sistemas biológicos estão localizados no quarto período da tabela periódica. Com base nessas propriedades os metais podem ser classificados em dois grupos: elementos de transição (Mn, Fe, Co, Cu, Mo e W), pois apresentam a camada de valência, nesse caso os orbitais d, incompleta ocasionando a instabilidade dos íons e em elementos que não são de transição (Na, K, Mg, Ca, Zn), os quais apresentam a camada de valência completa aumentando assim a estabilidade iônica.

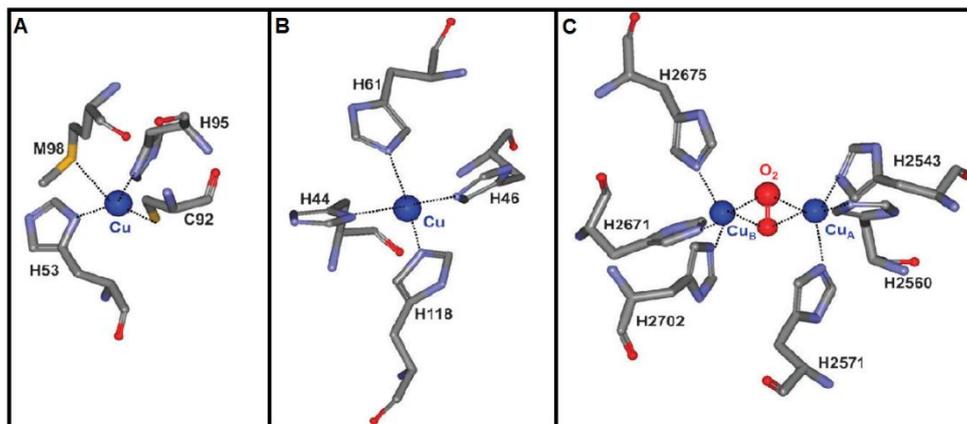
Rutherford e Bird (2004) afirmam que os elementos de transição assim como os elementos que não são de transição desempenham papel fundamental em diversos sistemas biológicos. Elementos de transição como ferro (Fe), cobre (Cu) e manganês (Mn) possuem transportadores moleculares que favorecem a regulação intracelular dos níveis desses metais. Apenas o zinco dentre os metais de transição apresenta transportadores que mediam a sua regulação (VAN HO et al., 2002). Contudo, ainda não se sabe da existência de transportadores de metais não essenciais.

## 2.4- Cobre

O cobre é um íon metálico que possui potencial redox, transita da forma  $\text{Cu}^{1+}$  (forma solúvel) com distribuição eletrônica  $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 4s^1 3d^{10}$  para forma  $\text{Cu}^{2+}$  (forma insolúvel) com distribuição eletrônica  $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 3d^{10}$  (VAN HO et al., 2002). Esse elétron cedido possibilita ao cobre atingir sua estabilidade e aumentar sua capacidade de interação com outros elementos como, por exemplo, Cloreto, Potássio, Fosfato e compostos orgânicos. Os íons de fosfato podem interferir na solubilidade dos elementos metálicos, formando assim, precipitado pouco solúvel diminuindo a concentração de íons em soluções. Por esse motivo a interação exercida com o fosfato é uma das mais importantes (ABREU et al., 2001). Pois o mesmo exerce a função de doador e receptor de elétrons em muitas proteínas relacionadas ao cobre, sendo encontrado em todas as plantas, fungos e animais (MARTINEZ-FINLEY et al., 2012).

As proteínas ligantes de cobre podem ser classificadas de acordo com os aminoácidos presentes na região de ligação. Essa reação pode ser classificada de três tipos: 1, 2 e 3 (Figura 04). No tipo 1 (figura 04 A) o sítio ligante de cobre compõem-se em duas histidinas, uma cisteína e uma metionina. Esses três aminoácidos são essenciais para organizar a geometria trigonal do cobre com a proteína. O tipo 2 (figura 04 B) apresenta quatro resíduos de histidinas e o tipo 3 (figura 04 B) é coordenada por seis a oito histidinas. Uma mesma proteína pode apresentar mais de um tipo de ligação (CHOI et al., 2011).

**Figura 04.** Tipos de reação do cobre com a proteína. (Fonte: CHOI et al., 2011).



## 2.5- Homeostase de cobre em fungos

No ponto de vista bioquímico, eucariotos possuem diversas vias metabólicas e processos associados com a virulência que são reguladas por cobre. No meio destas vias, pode-se destacar fosforilação oxidativa que é uma via do metabolismo central, responsável pela produção de energia e composta por quatro complexos multiproteicos (I, II, III e IV). A citocromo c oxidase é um destes complexos responsável pelo transporte de elétrons na membrana mitocondrial, o qual apresenta cobre e ferro como cofatores. Já em eucariotos, além de proteínas do metabolismo central, foram encontradas proteínas relacionadas com mecanismo de virulência, tais como a superóxido dismutase que são reguladas por cobre (LALIOTI et al., 2009). O cobre também exerce papel fundamental na produção de melanina, no crescimento celular e sinalização molecular (KORNITZER et al., 2009; FESTA e THIELE, 2012). Sendo importante também no controle da homeostase de outros metais, tais como o ferro (VAN HO et al., 2002). Contudo, o cobre pode causar dano

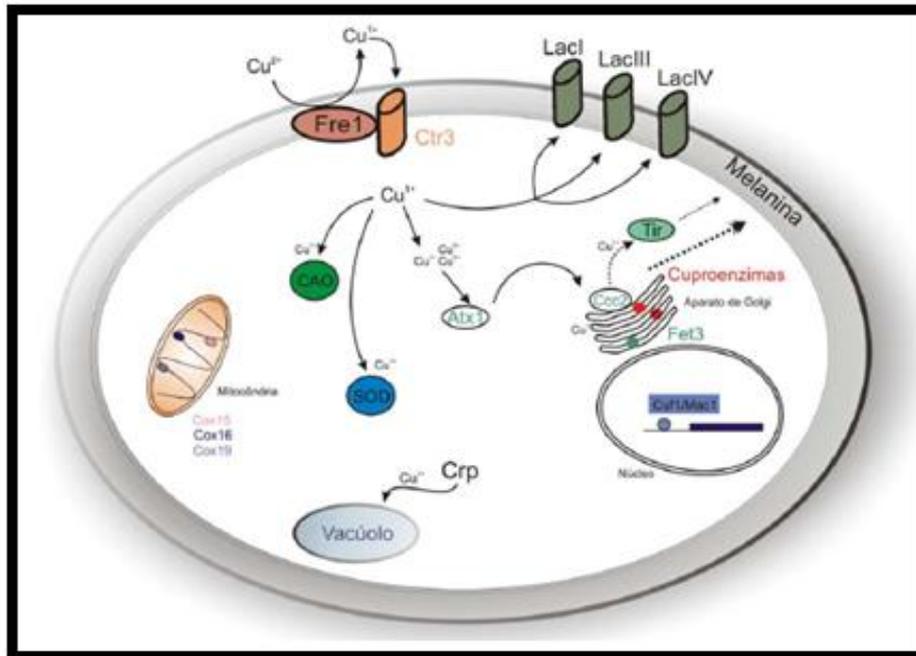
celular quando em altas concentrações tendo a capacidade de interagir com os grupos tióis das proteínas, desestabilizando cofatores de ferro-enxofre, competindo também com outros metais pelo sítio de ligação das proteínas e supostamente levando a formação de espécies reativas de oxigênio, gerando assim radicais livres que causam danos ao DNA, membranas lipídicas e causando estresse oxidativo. Como o cobre é um metal essencial em inúmeras vias, a célula aprimorou mecanismo para a regulação de suas concentrações (REES e THIELE, 2004)

A aquisição de cobre em sistemas biológicos ocorre de duas formas: transporte de alta ou baixa afinidade, realizados por permeases encontradas na membrana plasmática (NOSE et al., 2006).

Estudos realizados por Rees e Thiele (2004) mostraram que a deleção dos genes *ctr1* e *ctr3* influenciaram negativamente na absorção de cobre, levando a ativação ou aumento da expressão de genes relacionados com a limitação intracelular de cobre como, por exemplo, os *ctr2*. Experimentos com imunofluorescência realizados em *S. cerevisiae* apontam que a proteína CTR2 se localiza no vacúolo onde ela regula o excesso de cobre intracelular, transportando e armazenando esse íon no vacúolo. O cobre no citoplasma além de ser regulado pela CTR2 pode sofrer também a ação de outras proteínas, tais como a ATX1 e Ccc2. A ATX1 é uma chaperonacitosólica que tem como habilidade a capacidade de conduzir o cobre para um transportador específico o Ccc2, localizado no complexo de Golgi. O Ccc2 é responsável por transportar o cobre para o interior de vesículas ou organelas, no qual ocorre a formação de complexos de armazenamento. Estudos recentes mostraram a proteína ATP7A uma ATPase, também localizada na membrana do complexo de Golgi, tem como função exportar cobre quando a célula encontra-se em altas concentrações deste metal (LUTSENKO et al., 2007; STAFFORD et al., 2013).

Outros estudos realizados por Ding et al., (2013), observaram um aumento da expressão da proteína ATP7A durante a infecção, sugerindo uma importante função desta biomolécula na regulação de cobre durante o processo infeccioso. A semelhança na homeostase de cobre vem sendo demonstrada em vários estudos, em que apresentam proteínas homólogas as encontradas em *S. cerevisiae*. (KIM, et al., 2009; SUN et al., 2014)

**Figura 05.** Homeostase de Cobre no fungo patogênico *P. brasiliensis*.(Fonte:SUN et al.,2014)



A figura 05 mostra o cobre livre no meio extracelular e capturado por moléculas específicas das famílias ctr sendo transportados para meio intracelular, no qual podem ter vários destinos, produção de LacI, LacIII e LacIV que são proteínas relacionadas à produção de melanina, Superoxidodismutase, são fatores de virulência e também podem ser armazenados em organelas específicas e regular a transcrição de genes específicos. Fre1 é responsável pelas reações de oxido-redução juntamente com auxílio da proteína Ctr3. CAO, SOD e Atx1 são chaperonas reguladas pelos níveis de cobre intracelular, em que excesso de cobre aumenta a expressão desses genes. Fet3 é uma ferroxidase e a Cuf1 atua como fator de transcrição (SANTOS R.S., 2009).

Estudos realizados em *Methanococcus capsulatus* mostraram que este microrganismo em condições limitantes de cobre produz pequenas moléculas com alta afinidade pelo cobre, também chamada de *chalkofore*, uma molécula similar ao sideróforos usados na captura de  $Fe^{3+}$  (KIM et al., 2005). Em fungos, a reprogramação da transcrição de genes é uma resposta comum das células aos níveis elevados de cobre, esses genes são importantes para a captura de cobre, mantendo as concentrações de cobre dentro dos limites homeostáticos, possibilitando que a quantidade do mesmo seja suficiente para servir como cofator e impedindo sua acumulação em níveis citotóxicos (BEADOINet al., 2009).

Conseqüentemente a regulação desses genes funcionam como chave para a sobrevivência e desenvolvimento do fungo.

Festa e Thiele (2012) mostraram que *S. cerevisiae* apresentam os fatores transcricionais Ace1 e Mac1. O primeiro é uma proteína com alto nível de expressão em condições de excesso de cobre, sugerindo estar relacionada na ativação de genes que regulam esta condição tanto intracelular quanto extracelular. Diferente de Ace1 o Mac1 apresenta importante função em condições de escassez de cobre, influenciando positivamente na expressão de genes relacionados na captura de cobre, tais como proteínas da família CTR e metalorredutases. Estudos realizados em *C. neoformans* em baixas concentrações de cobre revelaram outro fator de transcrição o Cuf1, o qual possui a capacidade de induzir a produção de proteínas relacionadas ao estoque de cobre, tais como as metalotioneínas (KIM, et al., 2009). Outro mecanismo utilizado por *C. neoformans* na regulação de cobre, são as proteínas transportadoras CTR1 e CTR4. Esses dois transportadores são regulados pelo nível de cobre durante o processo infeccioso, sendo que, quando o fungo infecta o hospedeiro se depara com altos níveis de cobre aumentando a expressão da CTR1.

Com a permanência do fungo no hospedeiro, este atinge órgãos que limita os níveis de cobre o inibe a expressão de CTR1 e aumenta CTR4, o que indica mecanismo de atuação distinto entre os dois transportadores (SUN et al., 2014). Neste mesmo estudo foi demonstrado que a deleção dos genes CTR1 e CTR4 reduz a virulência do fungo. Recentemente também em *C. neoformans* descobriram as metalotioneínas 1 e 2 (CnMT1 e CnMT2), em que apresentam a capacidade de estocar de 6 a 12 átomos de cobre por proteína. Essa habilidade de estocar cobre auxilia *C. neoformans* na adaptação em ambientes com excesso deste elemento. Em que já foi confirmado que este fungo consegue sobreviver em altas concentrações de cobre, remodelando seu metabolismo (PALACIOS et al., 2014).

### **3. Materiais e Métodos**

### 3.1- Proteínas ligantes de cobre do complexo *Paracoccidioides*

As proteínas ligantes de cobre do *Paracoccidioides lutzii* e *Paracoccidioides brasiliensis* foram obtidas do domínio público: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4288321/>.

### 3.2- Obtenção das sequências de proteínas

As sequências das Cu-proteínas foram obtidas por meio do banco de dados do Instituto Broad e pedant3 database. Disponível em: <https://www.broadinstitute.org/> e <http://pedant.gsf.de/>. Todas as sequências foram fornecidas em modelo FASTA, formato necessário para entrada em softwares de bioinformática.

### 3.3- Análises de domínios

Domínios de ligação a metais já descritos (Kung et al, 2006; Smith et al, 2004) foram utilizados para busca. Os seguintes domínios foram utilizados: C-(X)<sub>n</sub>-C, C-(X)<sub>n</sub>-H, C-(X)<sub>n</sub>-M, H-(X)<sub>n</sub>-H, H-(X)<sub>n</sub>-C, H-(X)<sub>n</sub>-M, M-(X)<sub>n</sub>-M, M-(X)<sub>n</sub>-C e M-(X)<sub>n</sub>-H, com n variando de 0 a 12 e o “X” pode assumir qualquer um dos 20 aminoácidos. Depois da obtenção dos domínios proteicos foi realizado uma análise *in silico* com software *Sequence Manipulation Suite*. O *Sequence Manipulation Suite* é uma coleção de programas JavaScript para gerar, formatar e analisar sequências curtas de DNA e proteínas. Além disso, esse software tem a capacidade de procurar domínios proteicos a partir de sequências descritas na literatura, no qual ocorre o cruzamento dos dados conhecidos com os preditos.

### 3.4- Análises de aminoácidos

A frequência dos principais aminoácidos envolvidos na ligação com o cobre foi obtida a partir do software *Sequence Manipulation Suite*. No qual, tem a capacidade de quantificar os aminoácidos presentes em sequências de proteínas e peptídeos.

**Tabela 01.** Código de aminoácidos

<b>Código de aminoácido</b>	<b>Código de três letras</b>	<b>Aminoácido</b>
A	Ala	Alanina
B	Asx	Ácido aspártico
C	Cys	Cisteína
D	Asp	Ácido aspártico
E	Glu	Ácido glutâmico
F	Phe	Fenilalanina
G	Gly	Glicina
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina
J	Lys	Lisina
L	Leu	Leucina
M	Met	Metionina
N	Asn	Asparagina
P	Pro	Prolina
Q	Gln	Glutamina
R	Arg	Arginina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
W	Trp	Triptofano
X	Xaa	Qualquer aminoácido
Y	Tyr	Tirosina
Z	Glx	Glutamina

### 3.5- Análises dos dados

Após as análises de domínios e aminoácidos, os dados obtidos foram armazenados em planilhas eletrônicas e submetidos análise estatística descritiva, tais como, tabelas de frequências e dinâmica, métodos gráficos (gráficos de barra). Todas as análises foram feitas com auxílio do software estatístico Action R.

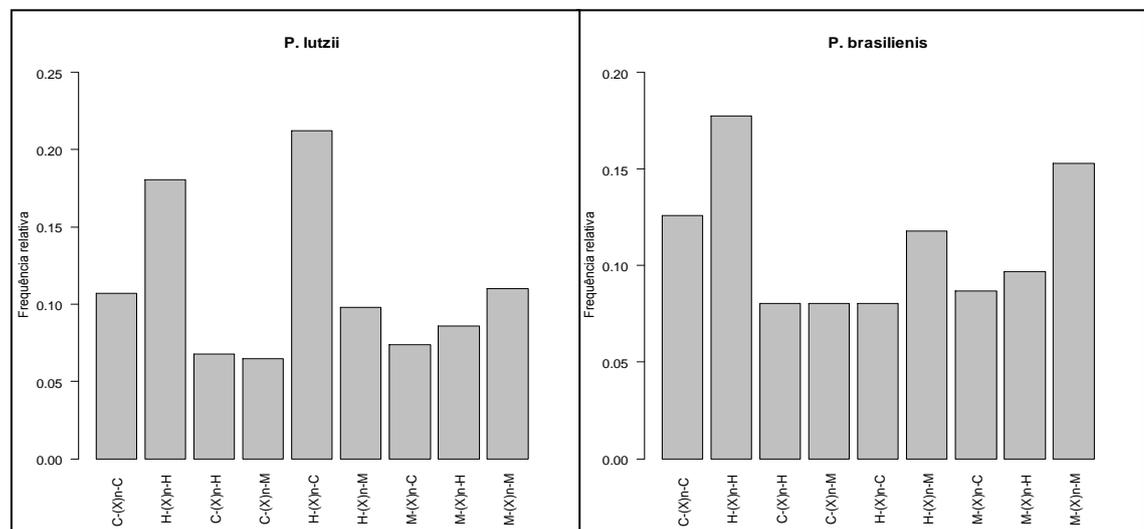
## 4- Resultados e discussão

### 4.1- Análise de domínios de cobre no complexo *Paracoccidioides*

Foi encontrado um total de 51 proteínas ligantes de cobre, dentre elas 26 são proteínas do *P. lutzii* e 25 do *P. brasiliensis*. Ambas as espécies apresentaram

classificação funcional e localização semelhantes, em que a maioria das Cu-proteínas estão relacionadas principalmente com metabolismo celular, transporte de íons e estão localizadas no citoplasma e membrana plasmática (TRISTÃO et al., 2015). A análise de domínios revelou um total de 1148 sequências, em que 664 pertenciam ao *P. lutzii* 484 ao *P. brasiliensis*. Além disso, dentre essas destaca-se domínios ricos em histidina, cisteína e metionina (Figura 01). Os domínios mais frequentes em *P. lutzii* foram, H-(X)n-H (120), C-(X)n-H (141) e em *P. brasiliensis* temos H-(X)n-H (86), M-(X)n-M (74) e H-(X)n-M (57), como mostra a figura 05. O que colabora com os resultados de Sun et al., (2011), que estudou motivos de cobre e zinco em *S. pneumoniae* e encontrou motivos ricos em metionina, histidina e cisteína. Nesse mesmo estudo foi encontrado os motivos H-(X)n-H (n variando de 0-11), C-(X)n-C, C-(X)n-H (n variando de 2-4 e 6-9), H-(X)n-M (n variando 0-10) e M-(x)n-M (n: 0, 3 e 4). Kim et al., (2008) também encontraram transportadores da família CTR, que apresentam domínios M-XX-M e M-X-M, conhecidas como motivos “Mets”, também apresentam regiões ricas em histidina e cisteína.

**Figura 06.** Frequência de domínios ligantes de cobre em *P. lutzii* e *P. brasiliensis*.



Essa diferença nas frequências de motivos entre as espécies sugere que durante o período evolutivo as duas espécies foram submetidas a condições ambientais diferentes. Além disso, essa teoria é altamente suportada quando comparamos duas sequências da mesma proteína vindas de linhagens diferentes, em que percebemos que não apresentam 100% de homologia e identidade, mas apresentam regiões conservadas. A análise *in silico* também permitiu verificar a

frequência de domínios em cada proteína, tanto em *P.lutzii* quanto *P.brasiliensis* (Tabelas 02 e 03). Entre as 51 proteínas analisadas, 47 apresentaram pelo menos um domínio de ligação e 4 proteínas não tinha nenhum dos nove motivos de ligação a cobre. Além do que, aproximadamente 50% das Cu-proteínas tem mais de oito domínios diferentes de ligações, no qual 14 proteínas pertencem ao *P.lutzii* e 11 ao *P.brasiliensis*. Entretanto, também encontramos proteínas com mais de 30 domínios de ligação ao cobre (PAAG\_08210 e PAAG\_07154). Todas essas proteínas com vários motivos de ligação são potenciais alvos de armazenamento de metal, principalmente cobre e alguns outros metais bivalentes, em alguns micro-organismos são consideradas metalotioneínas, moléculas capaz de ligar a uma grande quantidade de metais. Segundo Palácios et al., (2014) o *C. neoformans* apresentam duas metalotioneínas (CnMT1 e CnMT2) que interage com 6 a 12 átomos de cobre.

**Tabela 02.** Frequências de domínios por proteína em *P. lutzii*.

Proteínas	Domínios	Qtd. de domínios
PAAG_01735	-	0
PAAG_05403	M-(X)n-M	1
PAAG_00699	M-(X)n-M	1
PAAG_00194	C-(X)n-C, H-(X)n-C	2
PAAG_04492	H-(X)n-H, M-(X)n-M	2
PAAG_05251	H-(X)n-H, H-(X)n-M, M-(X)n-H, M-(X)n-M	4
PAAG_04164	H-(X)n-H, C-(X)n-H, C-(X)n-M, M-(X)n-H	4
PAAG_01692	H-(X)n-H, C-(X)n-H, H-(X)n-C, H-(X)n-M, M-(X)n-H	5
PAAG_00163	H-(X)n-H, C-(X)n-H, C-(X)n-M, H-(X)n-C, M-(X)n-H	5
PAAG_06668	C-(X)n-C, C-(X)n-M, H-(X)n-C, H-(X)n-M, M-(X)n-C	5
PAAG_08210	C-(X)n-C, C-(X)n-H, C-(X)n-M, H-(X)n-C, M-(X)n-C, M-(X)n-H	6
PAAG_02971	C-(X)n-C, C-(X)n-M, H-(X)n-C, M-(X)n-C, M-(X)n-H, M-(X)n-M	6
PAAG_08820	C-(X)n-C, H-(X)n-H, C-(X)n-H, C-(X)n-M, H-(X)n-C, H-(X)n-M, M-(X)n-C, M-(X)n-H	8
PAAG_02222	H-(X)n-H, C-(X)n-H, C-(X)n-M, H-(X)n-C, H-(X)n-M, M-(X)n-C, M-(X)n-H, M-(X)n-M	8
PAAG_02640	H-(X)n-H, C-(X)n-H, C-(X)n-M, H-(X)n-C, H-(X)n-M, M-(X)n-C, M-(X)n-H, M-(X)n-M	8
PAAG_06004	C-(X)n-C, H-(X)n-H, C-(X)n-H, C-(X)n-M, H-(X)n-C, H-(X)n-M, M-(X)n-C, M-(X)n-M	8
PAAG_03681	H-(X)n-H, C-(X)n-H, C-(X)n-M, H-(X)n-C, H-(X)n-M, M-(X)n-C, M-(X)n-H, M-(X)n-M	8
PAAG_07053	C-(X)n-C, H-(X)n-H, C-(X)n-H, C-(X)n-M, H-(X)n-M, M-(X)n-C, M-(X)n-H, M-(X)n-M	8
PAAG_05671	C-(X)n-C, H-(X)n-H, C-(X)n-H, C-(X)n-M, H-(X)n-C, H-(X)n-M, M-(X)n-C, M-(X)n-H, M-(X)n-M	9
PAAG_03629	C-(X)n-C, H-(X)n-H, C-(X)n-H, C-(X)n-M, H-(X)n-C, H-(X)n-M, M-(X)n-C, M-(X)n-H, M-(X)n-M	9
PAAG_03853	C-(X)n-C, H-(X)n-H, C-(X)n-H, C-(X)n-M, H-(X)n-C, H-(X)n-M, M-(X)n-C, M-(X)n-H, M-(X)n-M	9
PAAG_08658	C-(X)n-C, H-(X)n-H, C-(X)n-H, C-(X)n-M, H-(X)n-C, H-(X)n-M, M-(X)n-C, M-(X)n-H, M-(X)n-M	9
PAAG_03755	C-(X)n-C, H-(X)n-H, C-(X)n-H, C-(X)n-M, H-(X)n-C, H-(X)n-M, M-(X)n-C, M-(X)n-H, M-(X)n-M	9
PAAG_02065	C-(X)n-C, H-(X)n-H, C-(X)n-H, C-(X)n-M, H-(X)n-C, H-(X)n-M, M-(X)n-C, M-(X)n-H, M-(X)n-M	9
PAAG_07154	C-(X)n-C, H-(X)n-H, C-(X)n-H, C-(X)n-M, H-(X)n-C, H-(X)n-M, M-(X)n-C, M-(X)n-H, M-(X)n-M	9
PAAG_03881	C-(X)n-C, H-(X)n-H, C-(X)n-H, C-(X)n-M, H-(X)n-C, H-(X)n-M, M-(X)n-C, M-(X)n-H, M-(X)n-M	9

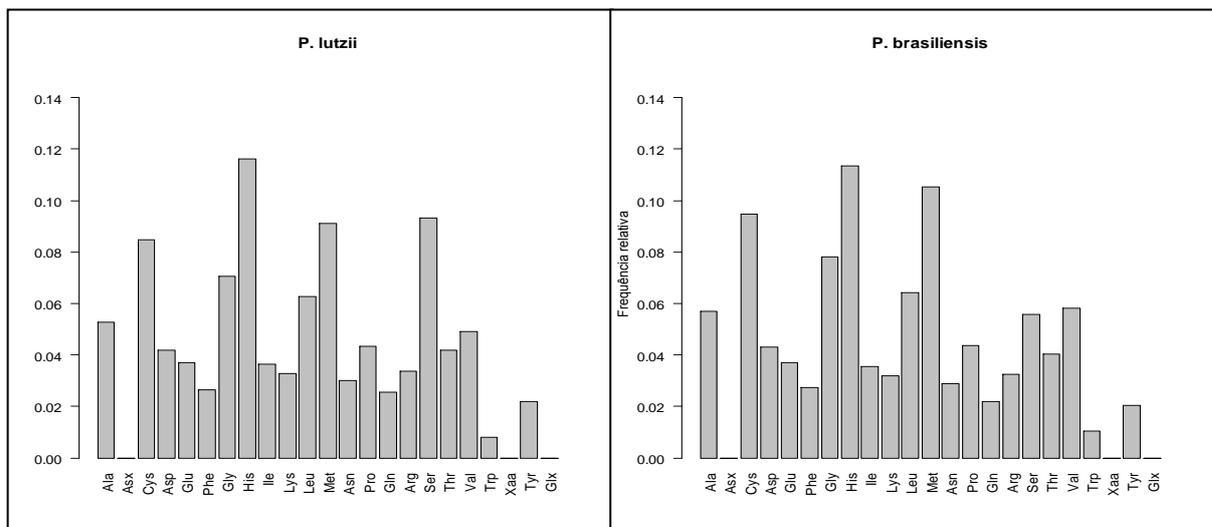
**Tabela 03.** Frequências de domínios por proteína em *P. brasiliensis*.

Proteínas	Domínios	Qtd. dedomínios
PADG_03260	-	0
PADG_02621	-	0
PADG_00042	-	0
PADG_07058	C-(X)n-C	1
PADG_04650	H-(X)n-H, M-(X)n-M	2
PADG_07418	H-(X)n-H, C-(X)n-M	2
PADG_05084	H-(X)n-H, H-(X)n-M, M-(X)n-M	3
PADG_04146	C-(X)n-H, M-(X)n-C, M-(X)n-H, M-(X)n-M	4
PADG_07092	H-(X)n-H, C-(X)n-H, C-(X)n-M, H-(X)n-C, M-(X)n-H	5
PADG_01124	C-(X)n-C, C-(X)n-M, H-(X)n-C, H-(X)n-M, M-(X)n-C	5
PADG_06753	C-(X)n-C, C-(X)n-H, C-(X)n-M, M-(X)n-C, M-(X)n-H, M-(X)n-H, M-(X)n-M	6
PADG_04135	H-(X)n-H, C-(X)n-H, H-(X)n-C, H-(X)n-M, M-(X)n-H, M-(X)n-M	6
PADG_02842	C-(X)n-C, C-(X)n-M, H-(X)n-C, H-(X)n-M, M-(X)n-C, M-(X)n-M	6
PADG_03184	H-(X)n-H, C-(X)n-H, C-(X)n-M, H-(X)n-C, H-(X)n-M, M-(X)n-H, M-(X)n-M	7
PADG_07725	C-(X)n-C, H-(X)n-H, C-(X)n-H, H-(X)n-C, H-(X)n-M, M-(X)n-C, M-(X)n-H, M-(X)n-M	8
PADG_05360	H-(X)n-H, C-(X)n-H, C-(X)n-M, H-(X)n-C, H-(X)n-M, M-(X)n-C, M-(X)n-H, M-(X)n-M	8
PADG_00088	C-(X)n-C, H-(X)n-H, C-(X)n-H, C-(X)n-M, H-(X)n-C, H-(X)n-M, M-(X)n-C, M-(X)n-H	8
PADG_07263	C-(X)n-C, H-(X)n-H, C-(X)n-H, C-(X)n-M, H-(X)n-C, H-(X)n-M, M-(X)n-C, M-(X)n-H	8
PADG_01582	C-(X)n-C, H-(X)n-H, C-(X)n-H, C-(X)n-M, M-(X)n-M, H-(X)n-M, M-(X)n-C, M-(X)n-H	8
PADG_06197	C-(X)n-C, H-(X)n-H, C-(X)n-H, C-(X)n-M, H-(X)n-C, H-(X)n-M, M-(X)n-C, M-(X)n-H, M-(X)n-M	9
PADG_01660	C-(X)n-C, H-(X)n-H, C-(X)n-H, C-(X)n-M, H-(X)n-C, H-(X)n-M, M-(X)n-C, M-(X)n-H, M-(X)n-M	9
PADG_03351	C-(X)n-C, H-(X)n-H, C-(X)n-H, C-(X)n-M, H-(X)n-C, H-(X)n-M, M-(X)n-C, M-(X)n-H, M-(X)n-M	9
PADG_05994	C-(X)n-C, H-(X)n-H, C-(X)n-H, C-(X)n-M, H-(X)n-C, H-(X)n-M, M-(X)n-C, M-(X)n-H, M-(X)n-M	9
PADG_00917	C-(X)n-C, H-(X)n-H, C-(X)n-H, C-(X)n-M, H-(X)n-C, H-(X)n-M, M-(X)n-C, M-(X)n-H, M-(X)n-M	9
PADG_03376	C-(X)n-C, H-(X)n-H, C-(X)n-H, C-(X)n-M, H-(X)n-C, H-(X)n-M, M-(X)n-C, M-(X)n-H, M-(X)n-M	9

#### 4.2- Análise da frequência de aminoácidos

Após a análise de motivos, percebemos que os aminoácidos histidina, cisteína e metionina foram os mais frequentes o que sugere uma maior estabilidade na interação do cobre com essas biomoléculas (Figura 06). Essa estabilidade na ligação pode ser explicada pelas propriedades químicas de cada aminoácido. A histidina apresenta cadeia lateral carregada positivamente (ou características básicas) o que sugere uma melhor interação dos grupos imidazóis com o metal. Diferente da histidina, a metionina apresenta cadeia lateral polar não carregada (COX e NELSON, 2011). Além disso, temos que destacar o grau de ionização ou dissociação dessas moléculas, em que os grupos imidazóis da histidina apresentam pK de 6,00. Em soluções básicas a histidina, apresenta um alto grau de dissociação o que permite aumentar a interação entre o metal e a proteína (COX e NELSON, 2011).

**Figura 07.** Frequência dos aminoácidos presentes nos domínios ligantes de cobre.



Quimicamente esse efeito pode ser explicado pela característica de cada átomo ou molécula, no qual os grupos imidazóis, em solução básica, perdem átomos de hidrogênio e passam a apresentar caráter negativo, o que lhes permite interagir com cátions, nesse caso com os metais  $\text{Cu}^+$ . O mecanismo de interação da metionina com o metal não está totalmente elucidado, sabe-se que essa molécula em condições básicas pode interagir com grupos hidroxila presentes no meio e apresentar caráter negativo permitindo intervir eletrostaticamente ou por ligação iônica com moléculas ou átomos positivos. Em ambos os casos, pela teoria ácido-

básico de Lewis, a histidina e a metionina se comportam como bases de Lewis (capacidade de doar elétrons) e os metais, como ácido de Lewis (capacidade de receber de elétrons). Além desses aminoácidos mais frequentes, a cisteína também é uma importante doadora de elétrons na interação com metais. Essa biomolécula apresenta grupo radical polar com característica neutra o que facilita sua interação com cátions.

#### 4.3- Proteínas ligantes de cobre específicas do complexo *Paracoccidioides*

Durante as análises de bioinformática, percebe-se que das 51 proteínas ligantes de cobre 10 são específicas do complexo *Paracoccidioides*, dentre essas 4 pertencem ao *P.lutzii* e 6 ao *P.brasiliensis*(Tabela 04). Todas as proteínas específicas apresentaram pelo menos um domínio de ligação a metal, no qual sugere que o cobre tem papel crucial na função metabólica dessas biomoléculas, podendo atuar como cofator.

**Tabela 04.** Cu-proteínas específicas do *P. lutzii*/*P. brasiliensis*.

Linagem	Código	Nome	Classificação funcional	Localização
<i>Pb 01</i>	PAAG_06004	Lacase IV	Metabolismo de melanina	M. plasmática
	PAAG_03681	Lacase-1	Metabolismo de melanina	Secretada
	PAAG_00163	Lacase-3	Metabolismo de melanina	M. plasmática
	PAAG_03853	Glioxal oxidase	Metabolismo de lipídeos	Secretada
<i>Pb 18</i>	PADG_05994	Lacase IV	Metabolismo de melanina	Citoplasmática
	PADG_03184	Lacase-1	Metabolismo de melanina	Secretada
	PADG_07092	Lacase-1	Metabolismo de melanina	Secretada
	PADG_05360	Cobre amina oxidase	Metabolismo aminoácido	Secretada
	PADG_04135	Tirosinase	Degração de tirosina	Secretada
	PADG_03351	Glioxal oxidase	Metabolismo de lipídeos	Citoplasmática

Nota-se que as proteínas específicas apresentam classificação diferentes como as Lacase que são multi-cobre oxidases pertencentes ao grupo das oxidases que catalisam a oxidação de compostos fenólicos e aminas aromáticas, essas enzimas estão presente na degradação da lignina e no metabolismo de melanina e são produzidas por diversos organismos (MURUGESAN et al., 2007). Já o glioxal é uma espécie reativa de carbonilas com ação de glicação, formados pela degradação de proteínas glicada. A amina oxidase são proteínas que contem cobre, com ação dependente das carbonilas.

Geralmente, os fármacos antifúngicos tradicionais atuam sobre a membrana plasmática do fungo, podendo prejudicar seu metabolismo. No entanto, existem

poucas possibilidades de alvos incomuns entre o fungo e o ser humano o que dificulta o desenvolvimento de novos fármacos. Assim, pode-se observar a possibilidade de criação de fármacos voltados para essas proteínas específicas (Tabela 3) tanto de *P.lutzii* como de *P.brasiliensis* onde o mecanismo de ação desses possíveis fármacos seria inibir o fungo de expressar essas proteínas, ou se ligar a elas impedindo assim que as mesmas se liguem a cobre.

## 6. CONCLUSÃO

A análise *in silico* de *Paracoccidioides sp.* demonstrou um total de 1148 sequências de domínios as quais destacam-se os ricos em histidina, metionina e cisteína, sendo que os mais frequentes em *P. lutzii* foram, H-(X)n-H (120), C-(X)n-H (141) e em *P. brasiliensis* temos H-(X)n-H (86), M-(X)n-M (74) e H-(X)n-M (57). A análise verificou que 50% das proteínas apresentam mais de oito domínios diferentes de ligações sendo 10 delas pertencem ao *P.lutzii* e 11 ao *P.brasiliensis*. Entretanto, também encontrou-se proteínas com mais de 30 motivos de ligação ao cobre (PAAG\_08210 e PAAG\_07154).

Através da análise de bioinformática foi possível perceber que 14 das proteínas ligantes de cobre são específicas do complexo *Paracoccidioides* apresentando pelo menos um domínio de ligação a metal.

Contudo, essa análise contribuirá com possíveis estudos voltados ao desenvolvimento de novos fármacos.

## 7. REFERÊNCIAS

ARISTIZABAL B.H., CLEMONS K.V., STEVENS D.A., RESTREPO A. Morphological transition of *Paracoccidioidesbrasiliensis* conidia to yeast cells: in vivo inhibition in females. **Infect Immun**, 5587-5591, 1998.

BAGAGLI E., THEODORO R.C., BOSCO S.M., MCEWEN J.G. *Paracoccidioidesbrasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. **Mycopathologia**, p. 197-207, 2008.

BEAUDOIN J., LABBÉ S. Crm1-mediated nuclear export of the *Schizosaccharomycespomb* transcription factor Cuf1 during a shift from low to high copper concentrations. **Eukaryot cell**, 764-75, 2007.

BOCCA, A. L. et al. *Paracoccidioidomycosis*: eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. **Future microbiology**, v. 8, n. 9, p. 1177–91, set. 2013.

CARRERO, L. L. et al. New *Paracoccidioidesbrasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. *Fungal genetics and biology*: **FG & B**, v. 45, n. 5, p. 605-12, mai. 2008.

CHEN, D., JANGANAN, T.K., CHEN, G., MARQUES, E.R., KRESS, M.R., GOLDMAN, G.H., WALMSLEY, A.R. AND BORGES-WALMSLEY, MI. The cAMP pathway is important for controlling the morphological switch to the pathogenic yeast form of *Paracoccidioidesbrasiliensis*. **MolMicrobiol**. p. 761-779, 2007.

CHOI, M.; DAVIDSON, V. L. Cupredoxins - A study of how proteins may evolve to use metals for bioenergetic processes. **Metallomics**. 2011.

CONTI-DIAZ, I. A. On the unknown ecological niche of *Paracoccidioidesbrasiliensis*: Our hypothesis of 1989: presente status and perspectives, São Paulo, v. 49, n. 2, p. 131-134, 2007.

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

FRANCO, M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. **J Med Vet Mycol**, v. 25, n. 1, p. 5-18, 1987.

FRANCO, M., SANO, A., KERA, K., NISHIMURA, K., TAKEO, K., MIYAJI, M. Chlamyospore formation by *Paracoccidioidesbrasiliensis* mycelial form. **Rev. Inst. Med. Trop.**, Sao Paulo, v. 31, p. 151–157, 1989.

HAAS, A. The phagosome: compartment with a license to kill. **Traffic**, v.8, n. 4, p. 311-330, 2007.

JANEWAY, C. A., JR. AND R. MEDZHITOV. Innate immune recognition. **AnnuVerlImmunol**, v.20, p. 197-216, 2002.

KIM H.J., GALEVA, N., LARIVE, C.K., ALTERMAN, M., GRAHAM, D.W. Purification and Physical-Chemical Properties of Methanobactin: A Chalkophore from *Methylosinustrichosporium* OB3b. **Biochemistry**, 2005.

KIM B.E., NEVITT T., THIELE D.J. Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. **Nat ChemBiol**, v. 4, p. 176-185, 2008.

KORNITZER, D. Fungal mechanisms for host iron acquisition. **Curr Opin Microbiol**, 2009.

KUNG, C.C.S., HUANG, W.N., HUANG, Y.C., YEH, K.C. Proteomic survey of copper-binding proteins in Arabidopsis roots by immobilized metal affinity chromatography and mass spectrometry. **Proteomics**, 2006.

LALLIOTI V, MURUAIS G, TSUCHIYA Y, PULIDO D & SANDOVAL IV. Molecular mechanisms of copper homeostasis. **Front Biosci**, v. 14, p. 4878–4903, 2009.

LECLERC MC, PHILIPPE H, GUÉHO E. Phylogeny of dermatophytes and dimorphic fungi based on large subunit ribosomal RNA sequence comparisons. **J Med Vet Mycol**, v. 32, p. 331-41, 1994.

LUSTSENKO S., LESHANE E.S., SHINDE U. Biochemical basis of regulation of human coppertransporting ATPases. **Arch BiochemBiophys**. p. 134-48, 2007.

MARTINEZ-FINLEY, E.J.; CHAKRABORTY, S.; FRETHERAM, SJB.; ASCHNER, M. Cellular transport and homeostasis of essential and non essential metals. **Metallomics**, 2012.

MATUTE, D. R. et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* revealed by gene genealogies. **Molecular biology and evolution**, v. 23, n. 1, p. 65–73, jan. 2006.

MCEWEN JG et al. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. **Journal of medical and veterinary mycology : bi-monthly publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 25, p. 165-175, 1987.

MONTENEGRO M.R. Clinical forms of paracoccidioidomycosis. **Rev Inst Med Trop**, v. 28, p. 203-204, 1986.

NELSON, DAVID L; COX, MICHAEL M. Princípios de bioquímica de Lehninger. 5 ed., Porto Alegre, 2011.

NEMECEK, J. C., WUTHRICH, M., KLEIN, B. S. Global control of dimorphism and virulence in fungi. **Science**, v. 312, p. 583-588, 2006.

NOSE Y., REES E.M., THIELE D.J. Structure of the Ctr1 copper transporter reveals novel architecture. **In: Trends Biochem Si England**, p. 604-607, 2006.

PALACIOS, O., ESPART, A., ESPIN, J., DING, C., THIELE, D.J., ATRIAN, S., CAPDEVILA, M. Full characterization of the Cu-, Zn-, and Cd-binding properties of CnMT1 and CnMT2, two metallothioneins of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* acting as virulence factors. **Metallomics**, 2014.

PERMAKOV, E. A. Metalloproteomics. Wiley series on protein and peptide science. 2009.

PINZAN CF, RUAS LP, CASABONA-FORTUNATO AS, CARVALHO FC, ROQUE-BARREIRA M. Immunological Basis for the Gender Differences in Murine *Paracoccidioides brasiliensis* Infection. **PLoS One**, v. 5, 2010.

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

QUEIROZ-TELLES, F. *Paracoccidioides brasiliensis* ultrastructural Wndings. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G (Eds.), *Paracoccidioidomycosis*. **CRC Press**, London, p. 27–44, 1994.

REES EM, LEE J, THIELE DJ. Mobilization of intracellular copper stores by the ctr2 vacuolar copper transporter. **J Biol Chem**. 2004.

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

RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis. **Acta. Med. Colomb**.,v. 3, p. 33-36, 1978.

RESTREPO, A. Immune response to *Paracoccidioides brasiliensis* in human and animal hosts. **Curr Top Med Mycol**, v. 2, p. 239-277, 1988.

RESTREPO A, MCEWEN, J. G.; CASTAÑEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Med Mycol**, v. 39, n. 3, p. 233-41, jun. 2001.

RESTREPO, A. et al. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. Estrogens Inhibit Mycelium-to-Yeast Transformation in the Fungus *Paracoccidioides* br. **Infection and immunity**, p. 346, 1984.

RICHINI-PEREIRA, V. B. et al. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in road killed wild animals. **Med Mycol**, v. 46, n. 1, p. 35-40, feb. 2008.

RUTHERFORD, J. C. E BIRD, A. J. Metal-Responsive Transcription Factors That Regulate Iron, Zinc, and copper Homeostasis in Eukaryot Cell. v.3, n. 1, p. 1-13, 2004.

SAN-BLAS, G.; NINO-VEGA, G.; ITURRIAGA, T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Med Mycol**, v. 40, n. 3, p. 225-242, 2002.

SANTOS, R.A. Análise da expressão de genes envolvidos na manutenção da homeostase de cobre no patógeno humano *Paracoccidioides brasiliensis*. 2009. Dissertação.

SEIDER, K., A. HEYKEN, et al. Interaction of pathogenic yeasts with phagocytes: survival, persistence and escape. **Curr Opin Microbiol**.,v. 13, n. 4, p. 392-400, 2010.

SMITH, S.D., SHE, Y.M., ROBERTS, E.A., SARKAR, B. Using Immobilized Metal Affinity Chromatography, Two-Dimensional Electrophoresis and Mass Spectrometry to identify Hepatocellular Proteins with Copper-Binding Ability. **Journal of Proteome**, 2004.

SMITH, C.L., STAUBER, J.L., WILSON, M.R., JOLLEY, D.F. The use of immobilized metal affinity chromatography (IMAC) to compare expression of copper-binding

proteins in control and copper-exposed marine microalgae. **Anal Bioanal Chem**, 2014.

STAFFORD S.L., BOKIL N.J., ACHARD ME, KAPETANOVIC R, SCHEMBRI MA, MCEWAN AG, SWEET MJ. Metal ions in macrophage antimicrobial pathways: emerging roles for zinc and copper. **Biosci Rep**, 2013.

SUN, T.S., JU, X., GAO, H.L., WANG, T., THIELE, D.J., LI, J.Y., WANG, Z.Y., DING, C. Reciprocal functions of *Cryptococcus neoformans* copper homeostasis machinery during pulmonary infection and meningoencephalitis. **Nature**, 2014.

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

VALERA, E. T., MORI, B. M., ENGEL, E. E., COSTA, I. S., BRANDÃO, D. F., NOGUEIRA-BARBOSA, M. H., QUEIROZ, R. G., SILVEIRA, V. D., SCRIDELI, C. A. E TONE, L. G. Fungal infection by *Paracoccidioides brasiliensis* mimicking bone tumor. **Pediatr Blood Cancer**, 2008.

VAN HO A., WARD D. M., KAPLAN J. Transition metal transport in yeast. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 56, p. 237–261. 2002.

TRISTÃO, G.B., ASSUNÇÃO, L.P., SANTOS, L.P.A., BORGES, C.L., BAILÃO, M.G.S., SOARES, C.M.A., CAVALLARO, G., BAILÃO, A.M. Predicting copper-, iron-, and zinc binding proteins in pathogenic species of the *Paracoccidioides* genus. **Frontiers Microbiology**, 2015.