



PURIFICAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COBRE E ZINCO- PROTEÍNAS DE *Paracoccidioides* sp. POR IMAC-MS

RODRIGUES, Geovana Santana ¹; FERREIRA, Laura Raniere Borges dos Anjos ²;
BAILÃO, Alexandre Melo ³; Faculdade Alfredo Nasser – UNIFAN
geo-sr@hotmail.com

Resumo: O gênero *Paracoccidioides* inclui fungos termodimórficos causadores da micose sistêmica paracoccidioidomicose (PCM). Durante o processo infeccioso, os organismos patogênicos necessitam obter nutrientes, dentre eles os metais, para manutenção de processos celulares. Dentre os metais com funções biológicas, destacam-se cobre e zinco que participam de processos como: transcrição, obtenção de energia, virulência e combate ao estresse oxidativo. Na maioria das vezes, as funções desempenhadas por elementos metálicos dependem de sua associação com proteínas, denominadas de metaloproteínas. Assim a identificação e caracterização do metaloproteoma do *Paracoccidioides* sp. tem por finalidade o melhor entendimento dos papéis desempenhados por estes metais na biologia e patogênese desses fungos. Este trabalho objetiva a caracterização das metaloproteínas ligantes a Cu e Zn da fase de levedura do *Paracoccidioides* sp.

Palavras-Chave: *Paracoccidioides*, IMAC, metaloproteínas

APOIO FINANCEIRO: CNPq, UFG

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Paracoccidioides* abrange fungos patogênicos que causam a paracoccidioidomicose (PCM), sendo estes pertencentes ao filo Ascomycota, classe Euromyceto, ordem Onygenales e família Ajellomycetaceae, a qual inclui também os patógenos *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis* e *Coccidioides posadasii* (BAGAGLI *et al.*, 2006; UNTEREINER *et al.*, 2004).

¹ Graduanda em Farmácia – FUG e Bolsista do CNPq - Brasil

² Graduanda em Biomedicina - ICS/UNIFAN

³ Professor e orientador – ICB/UFG

O *Paracoccidioides* spp é um fungo caracterizado por dimorfismo térmico, sendo essa característica essencial para o mecanismo de virulência e de patogenicidade (San-Blas *et al.* , 1987). A forma de levedura cresce *in vitro* a 37°C e em tecidos infectados, apresentam formato oval ou esférico (CARBONELL, 1969; FRANCO, 1993), paredes bi-refringentes e crescem por brotamento multipolar caracterizando a aparência de roda de leme. (CARBONELL & RODRIGUEZ, 1965; MARTINEZ, 2004; BRUMMER *et al.*, 1993). Já a miceliana, é evidente ao cultivá-lo mediante temperaturas inferiores a 28°C ou em condições saprobióticas. (LACAZ, 1994; LACAZ *et al.*, 2002; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006).

A PCM é uma endemia das Américas Central e do Sul e os países com maior ocorrência de casos são o Brasil, Venezuela e Colômbia (BRUMMER *et al*, 1993). A inalação de propágulos advindos da forma miceliana de *Paracoccidioides* spp. é a rota de transmissão, onde atingem inicialmente o epitélio pulmonar e posteriormente podem atingir outros tecidos ou órgãos através das vias hematogênica e/ou linfática. (TORTORA; CAMARGO E FRANCO, 2012; MCEWEN *et al.*, 1987).

Durante o processo infeccioso, os microrganismos patogênicos, necessitam de uma variedade de elementos advindos do hospedeiro para o suprimento das suas necessidades e persistirem no organismo (BROCK, 2009). Dentre estes estão os micronutrientes metálicos essenciais e fundamentais em vários processos celulares. O cobre é um metal de transição que é capaz de atuar entre dois estados redox, Cu^{+2} oxidado e Cu^{+1} reduzido. Esse íon atua como cofator de diversas enzimas atuantes em processos biológicos como, respiração, crescimento celular, aquisição de ferro, proteção contra estresse oxidativo, pigmentação (melanização) entre outros (PUIG & THIELE, 2002). O metal zinco não é redox-ativo, mas apresenta-se como um forte ácido de Lewis formando complexos com vários tipos de geometria (ALBERTS *et al*, 1998). Assim, esse elemento participa de vários processos bioquímicos, é utilizado por várias enzimas como cofator, por exemplo, a RNA polimerase, participa da transcrição de genes, atua no metabolismo de ácidos nucleicos, replicação e diferenciação celulares e estabilização do DNA. (MOCHEGANI AND MUZZIOLI, 2000; EIDE, 2003; KIM *et al.*, 2008).

Assim a identificação e caracterização do metaloproteoma do fungo pertencente ao gênero *Paracoccidioides* tem por finalidade o melhor entendimento das funções desempenhadas por estes metais na patogenicidade desses fungos,

sendo que esses resultados ainda permitirão o melhor conhecimento das metaloproteínas envolvidas na virulência do fungo.

2. METODOLOGIA

Foi utilizado o isolado 01 (ATCCMYA-826) *P. brasiliensis*. O fungo foi cultivado no meio de cultura Fava-Netto por 7 dias (FAVA-NETTO, 1955) à 37°C para a cultura leveduriforme e a forma miceliana a 22°C por 15 dias. Os extratos protéicos de levedura e micélio foram obtidos através do cultivo do fungo em meio Fava-Netto (FAVA-NETTO, 1955) semi-sólido durante 7 dias, após, as células foram transferidas para o meio Fava-Netto líquido e incubado por 72 horas a 37°C para levedura e 7 dias a 22°C para micélio, sob agitação, a 150 rpm e após, foi realizado o processo de extração protéica. O extrato protéico foi quantificado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) e o perfil qualitativo analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida acrescido de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) corado com Commassie blue.

Resinas de IMAC foram preparadas para a purificação de proteínas da fase leveduriforme ligantes a cobre e zinco. Colunas foram carregadas com 50 mM de CuSO₄ ou ZnSO₄. Resina não ligada a íons metálicos foi utilizada como controle. Em seguida adicionou-se em cada coluna 3,75 mg de extrato proteico que foram incubadas por 15 minutos para ligação das metaloproteínas. Posteriormente, centrifugou e armazenou o sobrenadante. Em seguida as colunas Cu e Zn foram tratadas com 2 M de uréia, 2 mM de imidazol, 20 mM de imidazol, 200 mM de imidazol e 50 mM de EDTA (ácido etileno-diamino-tetraacético), respectivamente e foram armazenados os sobrenadantes. As amostras foram concentradas com filtros Amicon® Ultra 0.5 mL a 14000 x g por 40 minutos. Após foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida, realizando posteriormente, a coloração por prata.

Em seguida, as amostras foram submetidas à digestão trípica e os peptídeos identificados por LC-MS/MS. As metaloproteínas foram classificadas funcionalmente usando o catálogo de classificação Funcat2 presente no Pedant3 database (<http://www.pedant.gsf.de>). A localização celular foi obtida pelo WOLF PSORT um programa de predição da localização subcelular das proteínas (<http://www.wolfpsort.seq.cbrc.jp>).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

No total foram identificadas 689 proteínas leveduriformes ligantes a Cu e Zn, 600 ligantes a Cu e 89 a Zn. Em cada condição foi analisado o número de proteínas específicas, sendo que em Cu 2mM imidazol, Cu 20mM imidazol, Cu 200mM imidazol e Cu EDTA 50mM foram identificadas 95, 106, 14 e 80 proteínas, respectivamente. Enquanto que no zinco a única condição em que foi identificada proteínas foi a 2mM imidazol, com 89.

A principal função exercida pelas proteínas ligantes ao Cu foi destino proteína com cerca de 30%, seguida de metabolismo 25%, não classificada 20%, 10% processamento do DNA, 5% biossíntese de compostos e 5% outros. Já as proteínas ligantes ao zinco foram representadas por 45% metabolismo, destino proteína 20%, energia 15%, processamento do DNA 10% e outras 15%. Sendo que as metaloproteínas ligantes a Cu e Zn da fase de micélio estão em análises. A localização mais evidente das proteínas ligantes ao cobre foi a citoplasmática, cerca de 45% , seguida de não classificadas com 20% , mitocondrial 20% e 15% nuclear. A localização das Zn-proteínas foi representada por cerca de 35% citoplasmática, 30% mitocondrial, 20% nuclear, 10% não classificada e 5% outros.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dessas observações foi possível verificar que:

- 1- Cerca de 70% a 80% das proteínas ligantes a metais de *Paracoccidioides* spp identificadas apresentaram funções biológicas conhecidas, indicando que o papel desses metais nos sistemas biológicos ainda estão desconhecidos.
- 2- Os resultados mostram que estes metais são cofatores de enzimas relacionadas ao metabolismo, sendo assim, essenciais para a biologia do *Paracoccidioides* spp.
- 3 - Há uma alta frequência de proteínas citoplasmáticas, aproximadamente 40% de ambos os metais.
- 4 - A ligação do zinco com as proteínas é mais instável e fraca.

5. REFERÊNCIAS

ALBERTS, K.NADASSY, S.J. WODAK, Analysis of zinc binding sites in protein crystal structures, *Protein science* 7, 1700-1716 (1998).
BRADFORD, M.M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.

- BROCK, M. (2009). Fungal metabolism in host niches. *Curr Opin Microbiol.*
- BAGAGLI, E.; BOSCO, S. M.; THEODORO, R. C.; FRANCO, M. 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(5): 344-351, 2006.
- BRUMMER, E., CASTANEDA, E., RESTREPO, A. 1993. Paracoccidioidomycosis: in update. *Clin. Microbiol.* 6:89-117.
- CARBONELL, L.M., AND RODRIGUEZ, J. (1965). Transformation of Mycelial and Yeast Forms of *Paracoccidioides brasiliensis* in Cultures and in Experimental Inoculations. *J Bacteriol* 90, 504-510.
- CARBONELL, L.M. 1969. Ultrastructure of dimorphic transformation in *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Bacteriol.* 100: 1076-1082.
- EIDE, D.J. (2003). Multiple regulatory mechanisms maintain zinc homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Nutr.* 133:1532S-1535S.
- FAVA-NETTO, C. (1955). Estudos quantitativos sobre a fixação do complemento na blastomicose sul-americana com antígeno polissacarídeo: 56.
- FRANCO, M., M.T. PERACOLI, A. SOARES, R. MONTENEGRO, R.P. MENDES, D. A. MEIRA. 1993. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *Curr. Top. Med. Mycol.* 5:115-149.
- KIM, BE, NEVITT, T AND THIELE, DJ (2008). Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation.
- LACAZ, C.S. (1994). *Paracoccidioides brasiliensis*: morphology; Evolutionary cycle; Maintenance during Saprophytic Life; Biology; Virulence; Taxon. In *Paracoccidioidomycosis*, L.C.Franco MF, Restrepo A, Del Negro G, ed. (Boca Raton, USA, CRC Press), pp.13-25.
- LACAZ, C.S., Porto, E., Martins, J.E.C., Heins-Vaccari, E.M., and Takahashi, M.N. (2002). *Tratado de Micologia Médica* (São Paulo, Savier).
- MARTINEZ, R. (2004). Paracoccidioidomycosis. In *Micologia Médica à luz de autores contemporâneos*, J.J.C.Sidrim, and M.F.G.Rocha, Eds. (Rio de Janeiro – RJ Brasil), pp.202-221
- MCEWEN, J.G., BEDOYA, V., PATINO, M.M., SALAZAR, M.E. E RESTREPO, A. (1987). Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. *J Med Vet Mycol* 25(3): 165-75.
- MOCCHIGIANI, E. AND MUZZIOLI, M. (2000). Therapeutic application of zinc in human immunodeficiency virus against opportunistic infections. *J Nutr* 130(5S Suppl): 1424S-1431S.
- PUIG, S., LEE, J., LAU, M. & THIELE, D.J. (2002). Biochemical and genetic analyses of yeast and human high affinity copper transporters suggest a conserved mechanism for copper uptake. *J. Biol. Chem.* 260:21-26030.
- SHIKANAI-YASUDA, M.A., TELLES FILHO, F.D.E., MENDES, R.P., COLOMBO, A.L., AND MORETTI, M.L. (2006). Guidelines in paracoccidioidomycosis. *Rev Soc Bras Med Trop* 39, 297-310.
- SAN-BLAS, G., NINO-VEGA, G. & ITURRIAGA, T. (2002). *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med Mycol* 40 (3): 225-42.
- TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. *Microbiologia*. 10.ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 967 p.
- UNTEREINER, W. A.; SCOTT, J. A.; NAVEAU, F. A.; SIGLER, L.; BACHEWICH, J.; ANGUS, A. The Ajellomycetaceae, a new family of vertebrate-associated Onygenales. **Mycologia** 96(4): 812-821, 2004.