



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PATOLOGIA MOLECULAR**

**Transcritoma e proteoma do fungo *Paracoccidioides*
em condições de privação de glicose ou hipóxia**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Patologia Molecular.

**Candidata: Patrícia de Sousa Lima
Orientadora: Dra. Célia Maria de Almeida Soares**

Brasília- DF, 2013

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade de
Brasília. Acervo 1013385.

L732t Lima, Patrícia de Sousa.
Transcritoma e proteoma do fungo *Paracoccidioides*
em condições de privação de glicose ou hipóxia / Patrícia
de Sousa Lima. -- 2013.
xix, 218 f. : il. ; 30 cm.

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

Inclui bibliografia.

1. *Paracoccidioides brasiliensis*. 2. Glicose. 3. Patologia
molecular. I. Soares, Célia Maria de Almeida. II.
Título.

CDU 616.993.192.1

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

APOIO FINANCEIRO: CAPES/ CNPq/ FAPEG/ PRONEX.

BANCA EXAMINADORA

TITULARES:

Profa. Dra. Célia Maria de Almeida Soares

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, UFG.

Profa. Dra. Rosely Maria Zancopé Oliveira

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz,
FIOCRUZ.

Profa. Dra. Izabela Marques Dourado Bastos

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, UnB.

Prof. Dr. Carlos André O. Ricart

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, UnB.

Prof. Dr. Sébastien Olivier Charneau

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, UnB.

SUPLENTE:

Prof. Dr. Sinji Borges Ferreira Tauhata

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, UFG.

*Feliz o homem que acha a sabedoria e
adquire o conhecimento porque são mais
preciosos do que pérolas e melhores do
que ouro mais fino. Tudo o que desejares
não se compara a tais bens!*

Provérbios 3: 13-15

*Dedido este trabalho aos meus queridos familiares que são reflexo do
cuidado de Deus na minha vida!*

*... Ao meu pai José Marcos que nunca mediu esforços para minha
formação no âmbito intelectual e pessoal. É meu grande exemplo. Amo
você!*

*... À minha mãe Sandra, que sempre me preparou para as adversidades
da vida e me ensina as verdadeiras dádivas de Deus. Tem um coração
imenso. Também te amo!*

*... À minha irmã Débora que sempre me mostrou força, competência e
fé, em tudo que faz! Você me anima a seguir em frente sem medo!
Agradeço pelo companheirismo em todas as fases da minha vida! Amo
pra sempre!*

*... Ao meu querido esposo Rodrigo que nunca me impediu de crescer.
Sempre quer meu bem e está disposto a viver comigo por mais uns 80
anos. Sinto orgulho de conviver com alguém tão inteligente, alegre e que
nunca me desampara! Obrigada pelo apoio... Te amo muito!*

*... Ao meu cunhado Gustavo, que apesar de novo integrante da família já
tem meu reconhecimento de pessoa corajosa e muito sábia. Deus tem
grandes planos para você!*

*Tudo que sou e tenho sou grata à vocês! Recebo amor, carinho,
atenção, paciência e zelo todos os dias da minha vida. Deus me deu
vocês para que as preciosidades Dele possam ser impressas em mim!*

Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

Agradeço de forma especial à Profa. Dra. Célia Soares pela oportunidade em me orientar e suprir meios para que este trabalho fosse desenvolvido. Admiro a extrema competência e sabedoria em tudo que a senhora faz, resultando em um trabalho científico brilhante que serve de exemplo a todos que querem seguir a mesma carreira. Mesmo com toda adversidade, a senhora construiu um ambiente de trabalho de excelência, superior a muitos lugares dentro e fora do nosso país. Contribuiu para que eu conhecesse outros países, outros laboratórios e fizesse cursos que foram extremamente importantes para minha formação. Sou eternamente grata à você!

Ao Prof. Dr. Alexandre Bailão por toda contribuição que me foi dada, científica e pessoal. Além de proporcionar suporte científico, se revelou um verdadeiro amigo, uma pessoa dedicada a fazer todos ao seu redor se sentirem bem e felizes! Admiro seu trabalho, dedicação, inteligência e otimismo!

Aos Professores. Dr. Clayton Borges e Dra. Juliana Rocha que sempre estiveram dispostos em me auxiliar. Obrigada pelo apoio e por desempenharem um papel fundamental na formação de todos dentro do laboratório!

Às Professoras Maristela e Sílvia pela gentileza na qual sempre fui tratada. Obrigada pela colaboração!

Ao Prof. Dr. Robert A. Cramer e seus alunos Dawoon, Arsa, Kristin e Kelly por me darem suporte no laboratório durante o doutorado sanduíche. Aos demais colaboradores, Profa. Dra. Ana Tereza Vasconcelos e Prof. Dr. Gabriel da Rocha Fernandes, por suas valiosas contribuições e sugestões.

Aos professores Carlos André Ricart, Sebastián Charneau, Rosely Oliveira, Izabela Bastos e Sinji Tauhata por aceitaram participar da banca e contribuir para nosso trabalho.

Às alunas de pós-doutorado Luciana Casaletti, Lilian e Ana Flávia, meu muito obrigada! À Lú nem se fala! Trabalhar com você sempre foi uma felicidade pra mim. Você é uma pessoa extremamente competente e que tem um futuro brilhante pela frente. Pra mim, você é uma verdadeira amiga que completa nosso “clube da Luluzinha”. Surpreendo-me a cada dia o quanto você é bondosa e paciente com todos, como se fosse uma mãe mesmo... é a nossa Lú! Você sempre me deu muitos conselhos e vou levá-los por toda vida! Obrigada por me auxiliar sempre que necessário, inclusive quando estive fora do país! Você e o Sinji são muito especiais pra mim.

À Lilian, que mesmo recente no laboratório me conquistou com sua competência e disposição em ajudar! Você faz diferença onde está e isso é dom de Deus. Adoro ouvir suas histórias doidas e isso acaba tornando meu dia mais feliz. Você nos trouxe mais confiança e alegria de que tudo vai dar certo! Te peço pra não sair pra comprar cigarro...(risos).

À Ana Flávia que sempre se mostrou uma pessoa forte e objetiva! Agradeço por ajudar na implantação da proteômica no nosso laboratório e estar sempre pronta a ajudar à todos!

Às minha queridas amigas Mirelle e Elisa Flávia... A nossa amizade é muito valiosa pra mim! Durante a iniciação científica, mestrado e doutorado passamos momentos muito felizes e também difíceis! Dividimos alegrias e aflições tanto pessoais quanto profissionais! Depositamos umas nas outras a fé de que tudo iria terminar bem e sempre funcionou. Agradeço toda ajuda, companheirismo e peço à Deus que as ilumine muito! Amo vocês...

À Mariana Tomazetti, minha amiga de longa data. Você é um exemplo pra mim de objetividade, força, luta pela vida. Admiro sua sinceridade, dedicação em tudo que faz e disposição em ajudar. É muito bom saber que tenho mais uma pessoa em quem posso confiar e dividir experiências. Torço muito pra que tudo se encaminhe bem na sua vida. Obrigada por ser essa pessoa maravilhosa!

Aos alunos de mestrado e iniciação científica Lucas Nojosa e Rafaela Borges no qual tento auxiliar. Vocês me trouxeram alegria e são verdadeiros pequenos cientistas.

Fico surpresa com o compromisso, inteligência e esperteza que têm e isso é reflexo do caráter e formação intelectual de cada um. Plantem para que colham frutos dignos e agradáveis! Não parem com os obstáculos que virão pois serão degraus para o sucesso!

À Marielle e Jú de Curcio por serem pessoas agradáveis e simpáticas em todo tempo. Obrigada por toda ajuda!

À Laurine por ser um exemplo de superação e dedicação em tudo que faz. Sucesso ...

À Sheyla, Lucas Oliveira e Leandro Nascimento pela companhia na sala de estudo e sentimentos sinceros em relação à mim ... sorte na caminhada de vocês!

Ao Neto, Renata e Pati Zambuzzi por tantos momentos legais que passamos juntos...

Aos alunos que iniciam carreira no LBM: Fabiana, LeLeandro, Luís Paulo, André, Gabriel, Dani, Alessandro, Amanda, Alex, Hanna, Paulo Henrique, Edilânia, Vanessa, Igor, Rebecca, Thaty, Paula, Zairo, Diandra, Felipe, Karla, Carla, Livia e Joyce. Acredito que vocês podem fazer diferença como pesquisadores, caso queiram!

Aos alunos que fizeram parte do meu convívio no laboratório, mas que não trabalham mais conosco como a Day, Pri, Simone Weber, Dacie, Kelly, Luciane, Fabi, Tereza Cristina, Ronney, Rod e Wesley Brito. Vocês foram excelentes companhias...

Aos professores de Brasília que contribuíram no meu trabalho ou participaram da minha avaliação em algum momento do doutorado tais como Sônia Bão, Jaime Santana, Sébátien Charneau, Izabela Bastos e Edivaldo Filho. 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 e atualmente o Dênis que sempre me ajudaram. Só tenho a agradecer!

À minha cunhada Lariza e concunhado Péricles que sempre estiveram de braços abertos a me receber em Brasília durante meu mestrado e doutorado. Vocês fazem parte da minha formação e agradeço pela ajuda na minha carreira. Amo vocês...

Às minhas amigas Fernanda, Theyssa e Janaína que sempre me deram apoio pra continuar. Nunca me deixaram sozinha e nossos bate-papos me ajudaram a lidar com a solidão em momentos difíceis. Obrigada Thê pela estadia em Brasília em muitos momentos das minhas idas e vindas de lá durante disciplinas e experimentos. Muito obrigada meninas...

Enfim, à todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho!

Meu muito obrigada!

PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O DOUTORAMENTO

Artigo completo publicado em periódico

1- Lima, PS; Bailão, EFLC; Silva, MG; Castro, NS; Bão, SN; Orlandi, I; Vai, M; Soares, CMA. Characterization of the *Paracoccidioides* beta-1,3-glucanosyltransferase family. *FEMS Yeast Research*. 12: 685–702, 2012.

Artigo submetido para publicação

1- Lima, PS; Casaletti, L; Bailão, AM; Vasconcelos, ATR; Fernandes, G; Soares, CMA. Transcriptional and proteomic responses to glucose deprivation in *Paracoccidioides*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. (submetido), 2013.

Manuscrtos em preparação

1- Lima, PS; Chung, D; Bailão, AM, Cramer, RA; Soares, CMA. Characterization of *Paracoccidioides* responses to hypoxia stress.

2- Casaletti, L; Lima, PS; Bailão, AM; Bão, SN; Soares, CMA. Proteomic analysis of mitochondria enriched fraction of *Paracoccidioides* under glucose deprivation.

3- Oliveira, LN; Lima, PS; Casaletti, L; Bailão, AM; Borges, CL; Soares, CMA. Proteomic analysis of the *Paracoccidioides* nucleus.

Trabalhos apresentados em eventos internacionais

Lima, PS; Casaletti, L; Bailão, AM; Cerdeira, L; Vasconcelos, ATR; Soares, CMA. Transcriptional and proteomic analysis of *Paracoccidioides* in response to glucose starvation. In: 18th Congress of International Society for Human and Animal Mycology, Berlin, Germany, 2012. **Apresentação oral.**

Lima, PS; Bailão, AM; Parente, AFA; Borges, CL; Soares, CMA. Proteomic analysis of the response of *Paracoccidioides* to hypoxia. In: 18th Congress of International Society for Human and Animal Mycology, Berlim, Germany, 2012. **Pôster.**

Lima, PS; Bailão, AM; Parente, AFA; Borges, CL; Soares, CMA. Proteomic analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* during hypoxic condition. In: XI International Meeting on Paracoccidioidomycosis, Taubaté-SP-Brazil, 2011. **Pôster.**

Trabalhos apresentados em eventos nacionais

Oliveira, LN; **Lima, PS;** Casaletti, L, Bailão, AM; Borges, CL; Soares, CMA. Proteomic analysis of the *Paracoccidioides* nucleus. 27^o Congresso Nacional de Microbiologia, 2013. **Pôster.**

Casaletti, L; **Lima, PS;** Bailão, AM; Soares, CMA. Analysis of the mitochondrial response of *Paracoccidioides* to glucose starvation: a proteomic approach. In: 28^a Reunião de Genética de Microrganismos (REGEM) Foz do Iguaçu-PR, 2012. **Pôster.**

Lima, PS; Casaletti, L; Bailão, AM; Soares, CMA. *Paracoccidioides brasiliensis* response to glucose starvation stress. In: 26^o Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2011, Foz do Iguaçu-PR-Brasil. Revista Microbiologia in foco, 2011. v. 16^a Ed. **Pôster.**

Lima, PS; Parente, AFA; Borges, CL; Bailão, AM; Soares, CMA. Proteomic view of *Paracoccidioides brasiliensis* under hypoxic stress. In: 26^o Congresso Brasileiro de Microbiologia, Foz do Iguaçu-PR-Brasil. Revista Microbiologia in foco, 2011. v. 16^a Ed. **Apresentação oral.**

SUMÁRIO

	Páginas
LISTA DE ABREVIATURAS	XV
RESUMO	XVIII
ABSTRACT	XIX

CAPÍTULO 1

Introdução

1- Aspectos Gerais

1.1 - O fungo <i>Paracoccidioides</i>	21
1.2 - Aspectos morfológicos de <i>Paracoccidioides</i>	25
1.3 - Paracoccidioidomicose (PCM)	28
1.4 - Condições de estresse enfrentadas por patógenos durante a infecção	
1.4.1 - Privação de glicose	32
1.4.2 – Hipóxia	36

2- Justificativa	41
-------------------------------	----

3- Objetivos	42
---------------------------	----

CAPÍTULO 2

Transcritoma e proteoma do fungo *Paracoccidioides* em privação de glicose

1- Manuscrito	44
2- Conclusões	102

CAPÍTULO 3

Respostas de *Paracoccidioides* à condição de hipóxia

1- Introdução	105
1.1- Regulador hipóxico em mamíferos	109
1.2- Principais reguladores hipóxicos em fungos: SREBPs e Upc2	111
1.3- Outros reguladores hipóxicos em fungos	116
1.4- Hipóxia e patogênese	119
2- Materiais e métodos	
2.1- Condições de cultivo de <i>Paracoccidioides</i> (Pb01) e <i>A. fumigatus</i>	121

2.2- Análises <i>in silico</i> de proteínas da família SREBP.....	121
2.3- Análise de PCR quantitativa em tempo real em <i>Paracoccidioides</i> (Pb01) e em <i>A. fumigatus</i>	122
2.4- Ensaio de complementação gênica de <i>PbsrbA</i> em células de <i>A. fumigatus</i>	123
2.5- Condições de crescimento de linhagens de <i>A. fumigatus</i> em normóxia e hipóxia	124
2.6- Análise por <i>western blot</i> em <i>Paracoccidioides</i> (Pb01) e <i>A. fumigatus</i>	125
2.7- Susceptibilidade de <i>A. fumigatus</i> à antifúngicos	126
2.8- Produção de biomassa por linhagens de <i>A. fumigatus</i> em condições de privação do metal ferro.....	126
2.9- Análises do crescimento, viabilidade e dosagem de glicose em <i>Paracoccidioides</i> (Pb01) sob condições de hipóxia (CoCl ₂)	127
2.10- Análises do crescimento, viabilidade e dosagem de glicose em <i>Paracoccidioides</i> (Pb01) sob condições de hipóxia (CoCl ₂)	127
3- Resultados	
3.1- Condições de cultivo de <i>Paracoccidioides</i> (Pb01) e <i>A. fumigatus</i>	129
3.2- <i>PbsrbA</i> é funcional na linhagem mutante nulo para <i>srbA</i> (Δ <i>srbA</i>) de <i>A. fumigatus</i>	132
3.3- Inserções de <i>PbsrbA</i> e <i>pyrG</i> no genoma de <i>A. fumigatus</i> e restauração do crescimento radial da linhagem Δ <i>srbA</i> por <i>PbsrbA</i>	135
3.4- Linhagem de <i>A. fumigatus</i> complementada com <i>PbsrbA</i> expressa transcrito e proteína	138
3.5- Linhagem de <i>A. fumigatus</i> complementada com <i>PbsrbA</i> mostra resistência à drogas antifúngicas	140
3.6 - Linhagem de <i>A. fumigatus</i> complementada com <i>PbsrbA</i> restaura a produção de biomassa em condição de privação de ferro	140
3.7- <i>Paracoccidioides</i> , Pb01, responde à condição de hipóxia	143
3.8- Respostas proteômicas de <i>Paracoccidioides</i> , Pb01, às condições de hipóxia	145
3.9- <i>Paracoccidioides</i> , Pb01, consome menos glicose em condições de hipóxia	148
4- Discussão	149
5- Conclusões	152
6- Tabelas	154

CAPÍTULO 4

Artigo completo publicado em periódico

1- Artigo	165
2- Figuras Suplementares	185

PERSPECTIVAS	192
---------------------------	------------

CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	194
----------------------------------	------------

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Capítulo 1	197
Capítulo 2	206
Capítulo 3	211

LISTA DE ABREVIATURAS

$\Delta srbA$	mutante para o gene <i>srbA</i>
2DE	Eletroforese bidimensional
ANOVA	análise de variância
API	aspergilose pulmonar invasiva
ATP	adenosina trifosfato
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato
BHI	infusão de coração e cérebro
bHLH	duas α -hélices com resíduos de aminoácidos básicos conectadas por um laço
cDNA	DNA complementar
CEA10	linhagem selvagem de <i>Aspergillus fumigatus</i>
CFEM	comuns em membranas celulares fúngicas
CFUs	unidades formadoras de colônia
CHAPS	3-[(3-Colamidopropil)dimetilamônio]-1 propanosulfonato
CoA	Coenzima A
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindole
DNA	ácido desoxirribonucléico
DTT	ditiotreitól
EBP	proteína de ligação ao estradiol
FBS	soro fetal bovino
Fe ⁺²	íon ferro reduzido
Fe ⁺³	íon ferro oxidado
- Fe	depleção de ferro
+ Fe	repleto de ferro
<i>g</i>	força centrífuga
GABA <i>shunt</i>	rota aminobutirato
GCPSR	reconhecimento de espécies filogenéticas por concordância genealógica
GMM	meio mínimo com glicose
GPI	glicosilfosfatidilinositol
HIF-1	fator de transcrição 1 induzível por hipóxia
HIV	vírus da imunodeficiência humana
IDs	identidades
IDV	valores de densidade integrada
IFN-gamma	interferon gama
INSIG	gene induzido por insulina
ITS	sequência espaçadora interna
J774 A.1	linhagem celular de macrófagos
kDa	kilodáton
Log 2	logaritmo na base 2

mmHg	milímetros de mercúrio
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionization
Mb	mega bases
MMcM	meio mínimo Mc Veigh Morton
MS	espectrometria de massas
NAD ⁺	nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NanoUPLC-MS ^E	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 ₄ HCO ₃	tampão bicarbonato de amônio
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
PAMPs	padrões moleculares associados aos patógenos
<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
<i>PbSrbA</i>	proteína SrbA de <i>Paracoccidioides</i>
<i>PbsrbA</i>	gene <i>srbA</i> de <i>Paracoccidioides</i>
PCM	paracoccidioidomicose
PCR	reação em cadeia da polimerase
PEG	polietilenoglicol
PFAM	banco de dados de famílias de proteínas
pH	potencial hidrogeniônico
PHB	proteína fosforilase B
PMSF	fenilmetilsulfonilfluoreto
pO ₂	pressão parcial de oxigênio
ppm	partes por milhão
PS2	espécie filogenética 2
PS3	espécie filogenética 3
<i>pyrG</i>	gene orotidina-5'-fosfato descarboxilase
RNA	ácido ribonucléico
RNA-seq	sequenciamento de RNA em larga escala
ROS	espécies reativas de oxigênio
S1	espécie 1
SCAP	proteína de ativação da clivagem de SREBP
SDS	dodecil sulfato de sódio
SP1	protease sítio-1
SP2	protease sítio-2
<i>srbAKO</i>	mutante nulo para o gene <i>srbA</i> de <i>A. fumigatus</i>

SRE	região promotora de genes regulados pelas SREBPs
SREBP	proteína de ligação ao elemento responsivo esterol
TBS-T	solução salina tamponada com TRIS
TCA	ciclo do ácido tricarbóxico
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
TRIS	tris(hidroximetil) aminometano
UV	ultravioleta
wt	tipo selvagem

Paracoccidioides spp. causa a paracoccidioidomicose, uma das micoses mais frequentes na América Latina. O fungo cresce como micélio no meio ambiente, e como levedura, no hospedeiro. A fim de sobreviver no corpo humano, patógenos devem se adaptar nos microambientes os quais são frequentemente caracterizados por baixas disponibilidades de nutrientes e oxigênio. Uma das primeiras linhas de defesa deste fungo durante invasão no hospedeiro são os macrófagos residentes nos pulmões, considerados pobres em aminoácidos e nutrientes. Durante a doença sistêmica, o fungo também pode atingir órgãos e tecidos onde o patógeno é exposto a variações nas concentrações de oxigênio. Neste estudo, as respostas de *Paracoccidioides*, *Pb01*, sob condições de privação de glicose e de oxigênio foram obtidas a partir de abordagens transcricionais (RNAseq), proteômicas (NanoUPLC-MS^E e 2D-PAGE) e ensaio de complementação gênica. Os resultados revelaram que *Pb01* muda seu metabolismo em resposta à privação de glicose. O fluxo de carbono é centrado na produção de etanol e gliconeogênese pela modulação de outras vias tais como β -oxidação e ciclos do glioxilato e ácido tricarbóxico. Mais ainda, as células privadas de glicose foram mais susceptíveis à morte por macrófagos indicando que a glicose proporciona vantagem na sobrevivência do fungo dentro dos macrófagos. Em relação à hipóxia, as respostas do *Pb01* possivelmente são mediadas pelo fator de transcrição *SrbA*, uma proteína da família de ligação ao elemento regulatório esterol (SREBP). A *PbsrbA* é funcional no mutante nulo para o gene *srbA*, de *A. fumigatus* (Δ *srbA*), e também restaura ambos, a susceptibilidade do Δ *srbA* à classe de azóis de drogas antifúngicas e a produção de biomassa em resposta às condições de privação de ferro. Além disso, os níveis de transcritos e proteínas de células leveduriformes do *Pb01* mostraram que, em hipóxia, o fungo aumenta a expressão de transcritos associados com a glicólise e biossínteses de ergosterol e ácidos graxos. Um aumento na abundância de proteínas envolvidas com o metabolismo de aminoácidos, carboidratos, lipídios/ ácidos graxos, produção de etanol e destino protéico foi detectado por análises em gel bi-dimensional além da redução daquelas relacionadas a processos oxidativos (de aminoácidos, ácidos graxos e acetaldeído), TCA e transporte de elétrons. Desde que estudos têm mostrado a importância do metabolismo de carbono e adaptação à hipóxia nos fungos, concluímos que a caracterização das respostas de *Pb01* às condições de privação de glicose e de oxigênio é importante para elucidação de importantes moléculas e processos relevantes para o entendimento do estabelecimento fúngico no hospedeiro.

ABSTRACT

Paracoccidioides spp. represent the causative agent of paracoccidioidomycosis, one of the most frequent systemic mycoses in Latin America. The fungus grows as mycelium in the environmental, and as yeast form, in the host tissue. To survive in the human body, pathogens must adapt to microenvironments which are often characterized by low nutrient and oxygen availability. One of the first lines of defense during *Paracoccidioides* spp. host invasion are the lung resident macrophages, considered a glucose- and amino acid-poor environment. During the systemic disease, it also can reach organs and tissues where the pathogen is exposed to variations in oxygen concentrations. In this study, a comprehensive response of *Paracoccidioides*, isolate *Pb01*, under glucose and oxygen deprivation was accessed by transcriptional (RNAseq), proteomic (NanoUPLC-MS^E and 2D-PAGE) and genetic complementation approaches. The results revealed that *Pb01* changes its metabolism to responds to glucose deprivation. The carbon flow is focused in gluconeogenesis and ethanol production through β -oxidation, glyoxylate and tricarboxylic acid cycles modulations. Moreover, the glucose deprived cells are more susceptible to macrophages killing indicating that the glucose provides a survival advantage to *Pb01* inside macrophages. Regarding hypoxia, the responses of *Pb01* showed that it is possibly mediated by a highly conserved transcription factor, SrbA, a protein of the sterol regulatory element binding protein family. Our results showed that the *PbsrbA* is functional in a null mutant of *srbA* of *A. fumigatus* ($\Delta srbA$) and also restore both, the susceptibility of $\Delta srbA$ to the azole class of antifungal drugs and the biomass production in response to low iron conditions. Furthermore, the transcripts and proteins levels of the *Pb01* yeast cells under hypoxia showed that *Pb01* increases the expression of transcripts associated with glycolysis and ergosterol/ fatty acid biosynthesis. In addition, as detected by 2D-PAGE, the fungus also increases the abundance of proteins involved in amino acid, carbohydrate and lipid/fatty acids metabolism, ethanol production and protein fate and reduce of those related to oxidative processes (amino acids, fatty acid and acetaldehyde), TCA and electron transport. Because studies have highlighted the importance of carbon metabolism and hypoxia adaptation in fungi, we conclude that the characterization of glucose and oxygen deprivation responses in *Pb01* is important to elucidate molecules and processes relevant in the understanding of the fungal establishment in the host.



Capítulo 1
Introdução

1) Aspectos gerais

1.1. O fungo *Paracoccidioides* spp.

O fungo patogênico humano do gênero *Paracoccidioides* foi primeiramente observado pelo pesquisador brasileiro Adolpho Lutz em 1908 quando estudava novos casos de coccidioidomicose, tendo observado um caso diferente de blastomicose (LUTZ, 1908). O pesquisador descreveu o observado como “uma nova enfermidade pseudococcídica”, caracterizada como sul-americana e diferente da norte-americana, bem estabelecida até aquele momento. Depois, estudos detectaram lesões na mucosa e culturas celulares com as mesmas características descritas anteriormente por Lutz (1908) e, em 1912, o nome *Zymonema brasiliensis* foi proposto para designá-lo (SPLENDORE, 1912). Porém, muitos casos foram relatados por pesquisadores brasileiros ao longo dos anos e o fungo foi erroneamente confundido com *Coccidioides immitis*. Em 1930, Floriano de Almeida observou características que distinguiam o fungo observado por Lutz (1908) de *C. immitis* e criou o gênero *Paracoccidioides*, entretanto mantendo o termo *brasiliensis* de Splendore (2012) para a espécie (ALMEIDA, 1930).

Paracoccidioides spp. pertence ao filo Ascomycota, família Ajellomycetaceae, ordem Onygenales, nos quais incluem fungos tais como *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Emmonsia parva*, *Emmonsia crescens* e *Lacazia loboi*. Estes organismos se desenvolveram em associação com hospedeiros vertebrados apresentando um fase saprobiótica no solo e/ou fezes e outra parasítica nos tecidos do hospedeiro. Análises filogenéticas agruparam *Paracoccidioides* spp. e *L. loboi* como irmãs quando considerado o gênero *Coccidioides* como um grupo externo (TEIXEIRA et al, 2009; UNTEREINER et al, 2004). *Paracoccidioides* spp. tem sido recuperado de amostras clínicas de humanos, porém já foi detectada em espécies de tamanduás tais como os da espécie *Dasybus novemcinctus* e ocasionalmente de *Cabassus centralis* (BAGAGLI et al, 2003; CORREDOR et al, 2005). Além disso, o fungo já foi detectado em isolados provenientes de cachorros no qual a doença paracoccidioidomicose (PCM) foi diagnosticada pelas técnicas de imunohistoquímica e nested PCR, ambos relacionados com anticorpo e amplificação gênica da *gp43*, respectivamente (RICCI et al, 2004) e

ainda em bichos preguiça e em fezes de morcego (GROSE & TAMSITT, 1965; TREJO-CHÁVEZ et al, 2011).

O fungo *P. brasiliensis* era considerado uma única espécie até o ano de 2006 quando estudos sugeriram uma nova espécie, *Paracoccidioides lutzii* (CARRERO et al, 2008; MATUTE et al, 2006; TEIXEIRA et al, 2009). Matute e colaboradores (2006), em estudos de polimorfismo genético, descreveram a existência de três diferentes espécies filogenéticas de *Paracoccidioides* spp.: espécies filogenética 1 (S1), 2 (PS2) e 3 (PS3). A espécie filogenética 1 (S1) está distribuída no Brasil, Argentina, Paraguai, Peru e Venezuela enquanto que alguns isolados da S2 foram encontrados somente no Brasil, nos estados de São Paulo e Minas Gerais, e na Venezuela. Por outro lado, a espécie filogenética 3 (PS3) é geograficamente restrita à Colômbia (Figura 1). Carrero e colaboradores (2008), em continuidade aos estudos filogenéticos envolvendo o gênero *Paracoccidioides*, realizaram análises comparando sequências codantes, não codantes e ITS (*internally transcribed sequence*) de isolados de *Paracoccidioides* spp. pelo método GCPSR (*genealogical concordance phylogenetic species recognition*). As análises revelaram que algumas linhagens, por exemplo, a *Pb01*, apresentaram-se distantes das outras três espécies filogenéticas descritas anteriormente (CARRERO et al, 2008). Na tentativa de intensificar os estudos sobre a taxonomia do isolado *Pb01*, Teixeira e colaboradores (2009) usaram o método de GCPSR para investigar as particularidades dessa linhagem. Um total de 122 isolados foi analisado e o *Pb01* exibiu divergência em relação aos três grupos (S1, S2 e PS3), inclusive morfológicas (Figura 2). Assim, foi sugerido que esta espécie juntamente com outras do mesmo grupo fosse denominada como uma nova espécie, *Paracoccidioides lutzii*, em homenagem ao pesquisador Adolpho Lutz, o primeiro a descrever o fungo, em 1908 (TEIXEIRA et al, 2009). A localização da espécie também tem sido caracterizada indicando que *P. lutzii* é encontrado nas regiões central, oeste e noroeste do Brasil assim como no Equador (Figura 1) (MARQUES-DA-SILVA et al, 2012; RICHINI-PEREIRA et al, 2009; TEIXEIRA et al, 2009; THEODORO et al, 2012).

Dificuldades em produzir conídeos em laboratórios e as exclusividades morfológicas entre as espécies são motivos da escolha comum entre os micologistas em utilizar diagnósticos moleculares na identificação de espécies de *Paracoccidioides* spp. Vários marcadores moleculares já foram aplicados em estudos de populações do gênero, porém os *loci* *gp43* e *hsp70* tem se mostrado os melhores para o delineamento das espécies devido as altas frequências de sítios polimórficos divididos entre as espécies

(MATUTE et al, 2006; TEIXEIRA et al, 2009; THEODORO et al, 2012). Recentemente, análises baseadas em sequências parciais do gene *gp43* foram realizadas e revelaram mais um grupo filogenético, o PS4, no qual parece ser uma população monofilética de isolados clínicos recuperados da Venezuela (BOCCA et al, 2013; SALGADO-SALAZAR et al, 2010). Além disso, uma análise comparativa do proteoma de membros das quatro linhagens filogenéticas de *Paracoccidioides* spp. mostrou aspectos metabólicos diferenciais entre as linhagens. Este foi o primeiro estudo em nível protéico que investigou diferenças bioquímicas entre os membros do gênero (PIGOSSO et al, 2013).

Mesmo com todos estes estudos, a história evolutiva de *Paracoccidioides* spp. não tem sido facilmente construída devido a constante migração de hospedeiros humanos, período longo de latência da doença, a falta de informação sobre a história clínica dos pacientes e pelo fato de que os isolados são pouco amostrados, dificultando a informação da localização exata dos fungos (MATUTE et al, 2006).

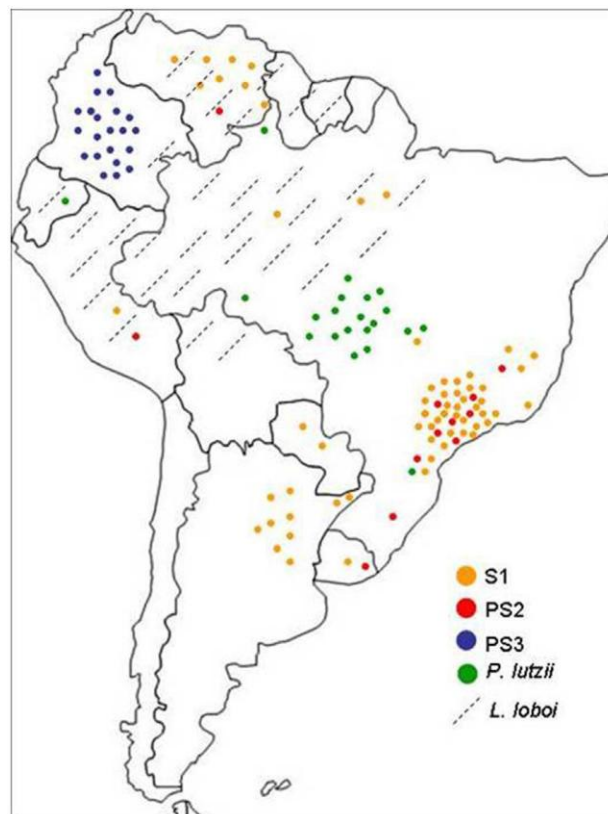


Figura 1. Distribuição geográfica atual do gênero *Paracoccidioides* e *L. loboi*. As espécies de *Paracoccidioides* S1, PS2, PS3 and *P.lutzii*, e sua espécie irmã *L. loboi* são mostradas na América do Sul (THEODORO et al, 2012).

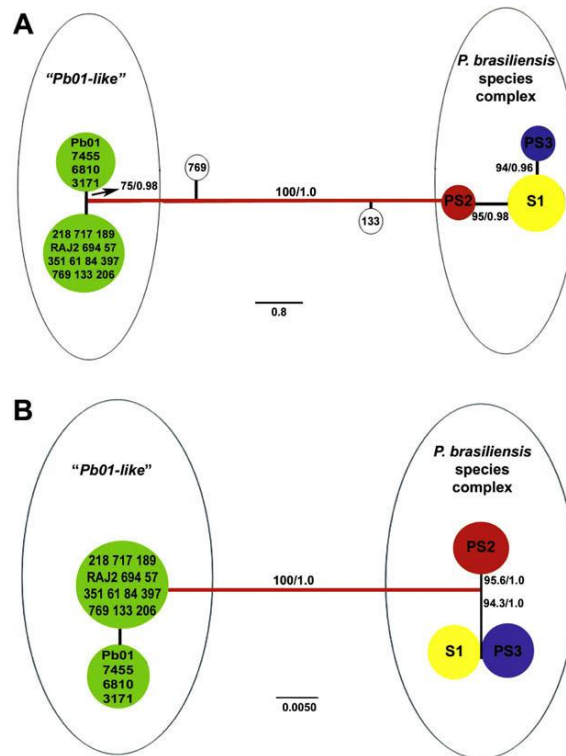


Figura 2. Filograma baseado na metodologia de inferência bayesiana mostrando a relação entre as três espécies filogenéticas S1, PS2, PS3 e os isolados do grupo “Pb01-like”. (A) Um total de 8 *loci* foram concatenados, correspondendo à 3565 nucleotídeos, do banco de dados 1 (*fks*-éxon2, *fks*-éxon 3, *chs2*-éxon 1, *chs2*-éxon 2-4, *gp43*-promoter-éxon 1, *gp43*-éxon2, *arf* e *a-tubulin*). (B) Um total de 5 *loci* foram concatenados, correspondendo à 1662 nucleotídeos, do banco de dados 2 (*hidrofobina*-3’UTR, *hidrofobina*-5’UTR, *hsp70*-5’UTR and íntron 1, íntron 1 *kex* e ITS 1/2 + 5.8S). Ambas as analyses mostram a distância do grupo “Pb01-like” das espécies filogenéticas de *P. brasiliensis* (TEIXEIRA et al, 2009).

A organização genômica também tem sido investigada em espécies do gênero *Paracoccidioides*. Os genomas estruturais dos isolados *Pb01*, *Pb03* e *Pb18*, representantes das diferentes espécies filogenéticas foram depositados (<http://www.broad.mit.edu/science/projects/msc/data-release-summary>). Os resultados confirmaram a presença de 5 cromossomos em cada isolado. O genoma do isolado *Pb01* é composto de 32,94 Mb, 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). Essas informações, além de auxiliar a elucidar as diferenças existentes entre os isolados, são importantes na caracterização de genes e regiões

promotoras e, conseqüentemente, na melhor caracterização da biologia de *Paracoccidioides* (DESJARDINS et al, 2011).

1.2. Aspectos morfológicos de *Paracoccidioides* spp.

Paracoccidioides spp. é um fungo dimórfico que cresce em temperaturas próximas a 25°C no meio ambiente ou a 36°C no hospedeiro humano. À 25°C no meio ambiente ou em condições que simulam esta temperatura *in vitro*, o fungo apresenta aspecto algodinoso e estruturas celulares características de micélio, com formação de hifas septadas, multinucleadas, com filamentos finos e artroconídios intercalares (BRUMMER et al, 1993; SAN-BLAS, 1993) (Figura 3). O habitat do fungo sempre foi motivo de investigação (RESTREPO et al, 2001). Acredita-se que este seja saprobíótico no meio ambiente onde, por conseqüência, vive no solo obtendo energia da matéria orgânica em decomposição (SILVA-VERGARA et al, 1998; TERÇARIOLI et al, 2007; THEODORO et al, 2005). Terçarioli e colaboradores (2007) realizaram o cultivo de vários isolados de *Paracoccidioides* spp. em diferentes tipos de solo e observaram que este fungo apresenta a capacidade de crescimento em solos arenosos e argilosos, com alta umidade. Neste caso, a produção de conídios, esporos assexuais dos fungos, e que são importantes na disseminação destes organismos na natureza, foi observada em alguns isolados (TERÇARIOLI et al, 2007). Apesar da ausência do estágio telemórfico, dados morfológicos e moleculares revelaram a possibilidade do ciclo sexual no gênero *Paracoccidioides* (TEIXEIRA et al, 2013).

À temperatura de 36°C no hospedeiro ou em condições *in vitro*, o fungo transita para forma leveduriforme apresentando forma globular e brotamentos múltiplos (Figura 3) com característica de uma membrana birrefringente e cromatina evidente quando observado no microscópio óptico. As células têm tamanhos heterogêneos caracterizando-se por células-mãe ovais ou arredondadas circundadas por brotamentos heterogêneos múltiplos também arredondados ou ovais (ALMEIDA et al, 2009; SAN-BLAS, 1993).

Em relação às espécies filogenéticas *P. lutzii* e *P. brasiliensis*, características morfológicas particulares em relação aos conídios e células leveduriformes são observadas. Os conídios da espécie *P. lutzii* são mais alongados do que os da espécie *P. brasiliensis*. As células leveduriformes de ambas as espécies não mostram variação significativa no tamanho e forma, com exceção do isolado *Pb01* de *P. lutzii*, no qual

exibem células maiores, e espécies PS2 de *P. brasiliensis* nas quais comumente apresentam células alongadas similares à pseudohifas (TEIXEIRA et al, 2009; THEODORO et al, 2012).

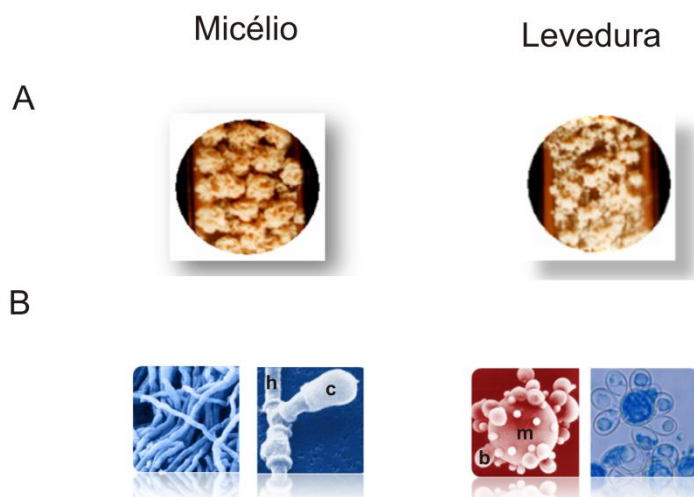


Figura 3. Aspectos morfológicos de *Paracoccidioides* spp.. As fases miceliana, à direita, e leveduriforme, à esquerda, de *Paracoccidioides* spp. são mostradas. **(A)** Visão macroscópica do fungo na forma miceliana e leveduriforme cultivado *in vitro* em temperaturas próximas à 25 e 36°C, respectivamente. **(B)** Visão microscópica do fungo na forma miceliana e leveduriforme. **h:** hifas; **c:** formação do conídio; **m:** célula-mãe e **b:** brotos. Figura construída a partir de dados do Laboratório de Biologia Molecular, Universidade Federal de Goiás – UFG e do banco de dados genômico de *Paracoccidioides* spp. - http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html.

A conversão morfológica de *Paracoccidioides* spp. constitui uma etapa inicial para o estabelecimento da doença e invasão dos tecidos tornando-se um mecanismo de defesa importante para a adaptação dos fungos ao ambiente hostil encontrado nos tecidos do hospedeiro. A variação de temperatura parece ser o principal fator responsável pela diferenciação celular de *Paracoccidioides* spp., porém o hormônio feminino 17- β -estradiol também influencia nesta característica (NEMECEK et al, 2006; RAPPLEYE & GOLDMAN, 2006; SAN-BLAS et al, 2002).

Estudos prévios mostraram que o hormônio feminino 17- β -estradiol inibe a transição de micélio para levedura de maneira dose-dependente, *in vitro* (RESTREPO, 1985) e *in vivo* (SANO et al, 1999). A inibição não ocorre somente devido a presença do hormônio e sim pela sua interação com a proteína fúngica denominada EBP (*Estradiol Binding Protein* ou *E₂-Binding Protein*) na qual atrasa e bloqueia a transição

da fase infectiva para a patogênica de *Paracoccidioides* spp. (SHANKAR et al, 2011). Além disso, a proteção da doença também é relacionada ao tipo de resposta imunológica desencadeada por cada gênero sexual. Camundongos machos e fêmeas infectados com células de *Paracoccidioides* spp. mostraram diferença no desenvolvimento da doença, fato este, atribuído em parte, aos hormônios sexuais. Estes, por sua vez, modulam a resposta imune via estimulação da paracoccina, uma lectina presente na superfície do fungo que se liga à laminina da superfície dos macrófagos. Esta ligação induz a produção de altos níveis de TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) e óxido nítrico pelos macrófagos, os quais estão envolvidos na atividade fungicida destas células. Desse modo, as fêmeas se mostraram mais resistentes à infecção pelo fungo (PINZAN et al, 2010).

Análises transcricionais e proteômicas têm ajudado na compreensão do dimorfismo em *Paracoccidioides* spp. por elucidarem mapas metabólicos regulados pelo fungo durante a transição. Bibliotecas de cDNA das fases de levedura e micélio foram construídas e os resultados mostraram que de 6022 genes expressos, 38% dos transcritos foram mais induzidos na levedura do que no micélio. O estudo elucidou moléculas envolvidas no processo de 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 α -1,3-glicana sintase (FELIPE et al, 2005). Outra análise transcricional durante a transição da fase miceliana para leveduriforme de *Paracoccidioides*, *Pb01*, 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 durante a transição, sugerindo que o fungo favorece o remodelamento da membrana e da parede celulares nos estágios iniciais da morfogênese. A detecção de genes envolvidos em vias metabólicas como a do glioxilato e transdução de sinal mostraram a importância de tais processos na adaptação do fungo ao ambiente hostil do hospedeiro durante este processo dimórfico (BASTOS et al, 2007). Em nível protéico, mapas metabólicos dos três estágios de *Paracoccidioides*, *Pb01*, foram construídos baseados nos níveis de expressão diferencial das proteínas das fases miceliana, transição e leveduriforme. Os resultados mostraram que o metabolismo da fase miceliana é mais aeróbico do que a leveduriforme e que os metabolismos de carboidrato, aminoácidos, nitrogênio e a via do glioxilato foram modulados durante a transição. O estudo enfatizou as mudanças metabólicas do processo de dimorfismo no

Pb01, proporcionando mais informações a respeito deste processo importante para o estabelecimento da paracoccidioidomicose (REZENDE et al, 2011).

1.3. Paracoccidioidomicose

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica granulomatosa causada por fungos do gênero *Paracoccidioides* e caracteriza uma enfermidade de alta prevalência e morbidade, limitadas a alguns países da América central e sul do México à Argentina. Países como o Brasil, Colômbia, Venezuela e Argentina a doença é altamente prevalente (BOCCA et al, 2013; BRUMMER et al, 1993; MARQUES, 2012). O fungo infecta hospedeiros, inclusive humanos, a partir da inalação de propágulos do micélio e artroconídeos no qual caracteriza o início da patogênese pelas vias respiratórias (BAGAGLI et al, 2006). Principalmente sob estímulo da temperatura, ocorre a transição dimórfica do fungo para a fase leveduriforme iniciando o processo infeccioso. Nos alvéolos pulmonares e a partir dos pulmões, o fungo pode disseminar-se pelas vias hematogênica ou linfática acometendo outros órgãos e sistemas como fígado, baço, ossos e sistema nervoso central (CAMARGO & FRANCO, 2000; SAN-BLAS, 1993; VALERA et al, 2008).

O grande fator de risco para aquisição da infecção são as profissões ou atividades relacionadas ao manejo do solo contaminado com o fungo, como por exemplo, atividades agrícolas, terraplenagem, preparo de solo, práticas de jardinagens, transporte de produtos vegetais, entre outros. Observa-se que a grande maioria dos pacientes exerceu atividade agrícola nas duas primeiras décadas de vida, tendo nessa época provavelmente adquirido a infecção, embora as manifestações clínicas tenham surgido muitos anos depois. A maioria destes pacientes, quando procuram atenção médica, já saiu da área endêmica, residindo em centros urbanos onde exercem outras atividades, não ligadas ao trato do solo (SHIKANAI-YASUDA et al, 2006). Ao contrário de outras micoses, como a criptococose, a histoplasmose disseminada e a candidíase, a PCM não é usualmente relacionada a doenças imunodepressoras. Entretanto, há casos desta micose associados à infecção pelo HIV, neoplasias e, mais raramente, a transplantes de órgãos (SHIKANAI-YASUDA et al, 2008; ZAVASCKI et al, 2004). Mais além, elevadas porcentagens de co-infecção com tuberculose (28,4%) e HIV (4,9%) além da taxa de 14,7% de mortes entre a população estudada também já foram descritas mostrando a severidade da PCM e a possibilidade de co-infecções que

interferem no tratamento e prognóstico da doença (LOTH et al, 2011). A transmissão da PCM de pessoa para pessoa não tem sido relatada e a ingestão de álcool e o uso de tabaco tem aumentado o risco da PCM (SANTOS et al, 2003).

A progressão da doença varia de assintomática à severa podendo ser fatal. As formas clínicas da PCM foram estabelecidas em um encontro em Medellín, Colômbia, em 1986 e são utilizadas até hoje. A doença pode ser dividida em forma subclínica (infecção), detectada somente por teste positivo na pele, e nas formas clínicas onde aparecem sinais e sintomas. A fase clínica se divide em aguda/ subaguda (tipo juvenil), no qual pode ser classificada como moderada ou severa, e na forma crônica (tipo adulto), que pode ser classificada baseada nas lesões uni ou multifocais e sequelas (BOCCA et al, 2013; FRANCO, 1987).

Aproximadamente 5% dos casos de paracoccidioidomicose são classificados como aguda. Esta fase tem como característica envolver do sistema mononuclear fagocítico e afetar principalmente crianças, adolescentes, jovens adultos (até 35 anos de idade) de forma semelhante entre homens e mulheres. Os sintomas incluem febre, perda de peso e anemia moderada por 2 – 3 meses ou mais. Gânglios inguinais, axilares e cervicais são os comumente aumentados. Quando gânglios linfáticos hepáticos são afetados podem surgir sintomas e sinais de icterícia. Dos órgãos, o fígado e baço são moderadamente aumentados e a medula óssea pode estar envolvida neste processo. Múltiplas lesões na pele e mucosas podem ocorrer (BOCCA et al, 2013; MARQUES, 2012, 2013). No sangue, algumas alterações são observadas nos primeiros meses tais como alta taxa de sedimentação de eritrócitos e marcadores inflamatórios. Após tratamento estes parâmetros decresceram (SHIKANAI-YASUDA et al, 2006).

A fase crônica da doença responde por mais de 90% dos pacientes, e apresenta-se principalmente em adultos entre os 30 e 60 anos, predominantemente, do sexo masculino. A incidência da doença em homens foi de 13: 1 quando comparada a das mulheres (PRADO et al, 2009). O trabalho com solo e plantações em área rural, citado anteriormente, é fator ocupacional predisponente para a aquisição da PCM (FRANCO, 1987). Acredita-se, que provavelmente, a menor taxa de incidência entre as mulheres, seja pela presença do hormônio β -estradiol que proporciona proteção para o sexo feminino por inibir a transição dimórfica do fungo dificultando o estabelecimento da doença (PINZAN et al, 2010; RESTREPO, 1985) e/ou pela ausência ou até mesmo menor contato com as fontes de infecção (MARQUES et al, 1983). A doença nesta fase crônica progride lentamente, de forma silenciosa, podendo levar anos até que seja

diagnosticada. As manifestações pulmonares estão presentes em 90% dos pacientes. Os pulmões podem ser o único órgão afetado em até 25% dos casos. Geralmente, a doença envolve mais de um órgão simultaneamente (apresentação multifocal e/ou disseminação hematogênica da doença), sendo pulmões, mucosas e pele os sítios mais acometidos pela infecção. Caso acometa um único órgão é chamada de apresentação unifocal (SHIKANAI-YASUDA et al, 2006). Porém, gânglios linfáticos, glândulas adrenais e outros órgãos ou tecidos podem estar envolvidos. Menos frequentemente, o intestino, o sistema nervoso central (cérebro, cerebelo e meninges), ossos, baço, olhos, sistema genital ou cardiovascular também podem ser acometidos (BOCCA et al, 2013; SHIKANAI-YASUDA et al, 2006).

Considerando que a PCM é uma doença sistêmica cuja resposta do hospedeiro ao agente infectante consiste de processo inflamatório granulomatoso crônico resultando em fibrose, as sequelas da doença consistem no acúmulo de colágeno e formação de fibroses que podem levar à alterações anatômicas e funcionais dos órgãos acometidos durante a infecção, particularmente os pulmões. Fibrose pulmonar foi descrita por imagem em cerca de 50% dos pacientes com infecção crônica deste órgão, evoluindo em menor porcentagem com doença pulmonar obstrutiva crônica e suas complicações. Além das sequelas relacionadas às lesões pulmonares, lesões adrenais e do sistema nervoso central além de fibrose decorrente do acometimento das mucosas e pele também podem acontecer. Nas mucosas e pele as sequelas podem causar alterações crônicas de voz (disfonia por lesão de corda vocal), obstrução laríngea com necessidade de traqueostomia, redução da rima bucal e sinéquia de nádegas. Na forma aguda da doença, as sequelas mais comuns são obstrução de linfáticos abdominais com síndrome de má absorção e perda de proteínas (linfangiectasia intestinal) além de quadros de icterícia obstrutiva (SHIKANAI-YASUDA et al, 2006).

As micoses sistêmicas estão em décimo lugar entre as doenças parasitárias e infecciosas que causam mais mortes no Brasil. Dados isolados mostraram que a paracoccidioidomicose 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 taxas de mortalidade mais altas, mais concentradas em São Paulo e Paraná (PRADO et al, 2009). A paracoccidioidomicose foi fatal até o ano de 1940 quando sulfonamidas (sulfadiazina, sulfadoxina, sulfametoxipiridazina, cotrimazina e trimetoprim-sulfametoxazol) foram utilizadas no tratamento. O tratamento com anfotericina B

iniciou-se em 1958 e a primeira geração de azóis (cetoconazol, itraconazol, fluconazol, voriconazol e posaconazol) foi usada na terapia com sucesso em 1980. A opção de tratamento considera a severidade da doença (BOCCA et al, 2013; LACAZ, 1994). Para as formas clínicas leve à moderada, o itraconazol é utilizado no tratamento da PCM em menor período de tempo. Entretanto, considerando que o medicamento não está disponível na rede pública na maioria dos Estados, a combinação sulfametoxazol-trimetoprim é a alternativa mais utilizada na terapêutica ambulatorial dos pacientes com PCM. Pacientes com formas graves, necessitando de internação hospitalar, devem receber anfotericina B ou associação sulfametoxazol/ trimetoprim por via intravenosa. Usualmente, o tratamento é de longa duração, para permitir o controle das manifestações clínicas da micose e evitar as recaídas. Além dos azóis clássicos, aqueles de segunda geração tal como o voriconazol, também tem sido utilizado no tratamento da doença, principalmente para neuroPCM. O paciente deve permanecer em tratamento e acompanhamento até a obtenção dos critérios de cura, com base nos parâmetros clínicos, radiológicos e sorológicos. Além do tratamento antifúngico específico, o paciente deverá receber assistência para as condições gerais como desnutrição, tratamento odontológico, doença de Addison e co-morbidades (tuberculose, aids, enteroparasitoses, infecções bacterianas pulmonares) (SHIKANAI-YASUDA et al, 2006).

Apesar do tratamento existente, muitos problemas ainda devem ser contornados para que a doença seja totalmente controlada e deixe de ser de alta prevalência e morbidade como tem se caracterizado. Muitos pacientes possuem a doença em sua forma crônica, muitas vezes não diagnosticada. Quando a doença manifesta, problemas com as formas severa da PCM podem resultar, por exemplo, em um tratamento não eficiente e, mesmo se adequado, também gerar a chamada “reação paradoxical” concernente principalmente à resposta imunológica do paciente devido a intensa reação inflamatória (GRYSCHKI et al, 2010). Neste contexto, a PCM é ainda uma doença de grande relevância principalmente pela variedade de manifestações clínicas, novos dados epidemiológicos e constante evolução da etiopatogênese (MARQUES, 2013). Além disso, há cada vez mais necessidade de estudos da biologia do fungo, pois a elucidação de potenciais fatores de virulência, os que podem surgir através de análises das respostas do fungo frente a estresses encontrados pelo mesmo nos nichos do hospedeiro, pode resultar em futuras estratégias co-adjuvantes para o tratamento da doença

resultando em formas mais efetivas, com menor tempo e reação do hospedeiro na busca por erradicação da doença.

1.4. Condições de estresse enfrentadas por patógenos durante a infecção

1.4.1. Privação de glicose

A interação patógeno-hospedeiro é um complexo de ação recíproca entre os mecanismos de defesa do hospedeiro e a tentativa dos micro-organismos patogênicos em driblar essas defesas. Em bactérias, por exemplo, no modelo de interação entre *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* e o sistema imune bovino, as respostas citotóxicas e pró-inflamatórias dos macrófagos no hospedeiro são essenciais para o controle da infecção. A bactéria, por sua vez, expressa proteínas de membrana que interagem com proteínas de células intestinais (células M) resultando em infecção do animal (COUSSENS, 2004). Além das bactérias, as espécies fúngicas também parecem apresentar vários mecanismos de invasão de células epiteliais os quais podem ser considerados como um dos processos mais importantes durante o início da infecção (FILLER & SHEPPARD, 2006). Uma vez que as condições do hospedeiro permitem o início da infecção, os fungos enfrentam mudanças drásticas nas condições ambientais (BROWN et al, 2007a). Os estresses enfrentados pelos patógenos incluem aqueles que impedem o crescimento tais como temperatura, pH, anoxia e privação de nutrientes e aqueles que são potencialmente tóxicos como espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e cloro (BROWN et al, 2007b).

Existem aproximadamente 1,5 milhões de espécies fúngicas (HAWKSWORTH, 2004), porém somente um pequeno número consegue causar doenças em humanos possuindo mecanismos de adaptações particulares (ASKEW, 2008). Patógenos fúngicos de diversos hospedeiros tais como plantas, insetos ou vertebrados têm no mínimo um desafio em comum: nutrição durante a patogênese. A infecção no hospedeiro está envolvida com o cruzamento da barreira epitelial, disseminação em diferentes locais no hospedeiro, invasão de vários tecidos assim como a resistência ao ataque do sistema imune do hospedeiro. Sem a habilidade em consumir nutrientes disponíveis em respectivos locais no hospedeiro o fungo não tem sucesso como patógeno. O sucesso na infecção, entretanto, requer uma adaptação rápida à diferentes condições microambientais (BROCK, 2009).

A molécula de glicose pode muitas vezes servir como principal recurso de carbono, mas proteínas e lipídeos provavelmente também servem de alimento à patógenos durante a infecção (BROCK, 2009). Em fungos patogênicos, como a *Candida albicans*, por exemplo, a disponibilidade de glicose durante a infecção tem sido investigada. Seguindo invasão no hospedeiro, a glicose pode ser uma das principais fontes de carbono para o patógeno desde que, na corrente sanguínea, a concentração de glicose pode variar de 6 à 8 mM (EGI et al, 2008). Porém, células do sistema imune tais como neutrófilos e macrófagos podem fagocitar as leveduras e a disponibilidade de nutrientes torna-se consideravelmente diminuída resultando em privação de nutrientes. A fim de escapar dos macrófagos, as células de *C. albicans* transitam para a forma de hifa e por força mecânica destroem o fagócito. Genes envolvidos com o metabolismo de lipídeos, ciclo do ciclo do glioxalato e da via gliconeogênica foram induzidos nesta condição (LORENZ et al, 2004). Nos tecidos, a glicose pode novamente se tornar escassa para *C. albicans*. Um estudo mostrou que diferentes populações de *C. albicans* enfrentam microambientes distintos com diferentes níveis de açúcares durante a infecção. A expressão do gene isocitrato liase (*icl*), representante do ciclo do glioxilato, e de genes gliconeogênicos foi aumentada somente em uma das subpopulações demonstrando que a assimilação de carbono pode ser diferente durante a infecção (BARELLE et al, 2006).

Apesar da indução da *icl* durante várias fases da infecção, sua importância para virulência de *C. albicans* vêm sendo investigada. Ao contrário de fungos patogênicos de plantas tais como *Magnaporthe grisea*, *Colleotrichium lagenarium* e *Leptosphaeria maculans*, nos quais dependem da *icl* para virulência fúngica porque utilizam os lipídios como nutrientes durante a patogênese (ASAKURA et al, 2006; IDNURM & HOWLETT, 2002; WANG et al, 2003), em *C. albicans* estudos demonstram que a *icl* não é requerido exclusivamente para o metabolismo de fontes lipídicas. A deleção deste gene alterou o crescimento do fungo em fontes alternativas de carbono tais como acetato, etanol, ácidos graxos, glicerol e citrato (BROCK, 2009), assim como em *A. fumigatus* (EBEL et al, 2006), mas também em fontes de lactato, piruvato e peptídeos/ aminoácidos (PIEKARSKA et al, 2008; RAMIREZ & LORENZ, 2007). Desse modo, a *icl* não pode ser considerada um marcador para o metabolismo lipídico e sim para utilização de recursos gliconeogênicos e durante condições de privação de carbono (BROCK, 2009). Apesar da virulência atenuada do mutante para *icl* de *C. albicans* em condições de infecção em camundongos (LORENZ & FINK, 2001) e da indução da *icl*

e de genes da β -oxidação por *C. albicans* após fagocitose por macrófagos (LORENZ et al, 2004), os lipídeos não são utilizados como fonte preferencial de carbono durante a infecção em *C. albicans* (BROCK, 2009). A fim de confirmar ainda mais esta hipótese, um estudo recente com mutantes para genes da via de β -oxidação mostrou que os mutantes não atenuaram a virulência de *C. albicans* enfatizando que os lipídeos não são mesmo utilizados como fonte preferencial energética em *C. albicans* durante a patogênese (OTZEN et al, 2013). A indução da *icl* e da β -oxidação durante infecção por macrófagos pode então ser explicada pelas condições de estresse nutricional ou limitação de glicose preferencialmente à utilização de ácidos graxos pelo fungo como fonte energética (OTZEN et al, 2013). De fato, a atividade enzimática da *icl* aumentou em *C. albicans* crescida em condições de privação de carbono, somente em acetato e em fontes de aminoácidos (BROCK, 2009). Portanto, a indução diferencial do gene da *icl* e de genes da via de degradação lipídica pode ser explicada devido às diferentes condições de privação de nutrientes encontradas pelo fungo quando enfrenta diferentes nichos no hospedeiro (BARELLE et al, 2006) preferencialmente à indução específica da utilização de ácidos graxos (OTZEN et al, 2013). Existem diferenças entre a preferência por assimilar fontes alternativas de carbono, por exemplo, entre *Saccharomyces cerevisiae* e *C. albicans* o que reflete seus nichos contrastantes. *S. cerevisiae* evoluiu explorando açúcares fermentáveis para posteriormente utilizar fontes alternativas de carbono (JOHNSTON, 1999). *C. albicans*, como citado anteriormente, frequentemente habita nichos que são limitados em glicose, porém ricos em fontes alternativas de carbono. A robustez fisiológica deste patógeno *in vivo* provavelmente é aumentada por sua habilidade em assimilar fontes alternativas de carbono preferencialmente à um uso sequencial de fontes de carbono fermentáveis ou não (BROWN et al, 2007a).

A molécula de glicose é essencial como precursora de macromoléculas além de fonte energética (LORENZ et al, 2004). A parede celular fúngica, por exemplo, é composta por polissacarídeos tais como glicana e quitina assim como lipídeos e proteínas (ENE et al, 2012b; KANETSUNA et al, 1969) e é afetada pela disponibilidade de fontes de carbono. A parede celular é um dos principais pontos de contato com o hospedeiro, moduladora ativa das defesas imune do organismo infectado além de alvo de drogas antifúngicas. Estudos recentes demonstram que fontes alternativas de carbono afetam esta estrutura em *C. albicans* remodelada em resposta à ambos, soro e fontes de carbono (ENE et al, 2012b). O crescimento de *C. albicans* em lactato afeta a arquitetura das camadas de glicana e manana na parede celular e seu remodelamento resulta em

diferenças significativas na adaptação das células à estresses osmóticos, na parede celular e drogas antifúngicas (ENE et al, 2012a) .

A adaptação a diferentes disponibilidades de nutrientes durante o processo infeccioso também tem sido observada em outros fungos patogênicos humanos. Em *Cryptococcus neoformans*, por exemplo, as células rapidamente se adaptam à privação de glicose durante a patogênese e distúrbios nessa adaptação atenuam a sua virulência. Durante a infecção, a glicose não está disponível em grande quantidade como fonte de carbono sendo o etanol e o acetato, fontes preferenciais de carbono durante este processo (HU et al, 2008). A habilidade de *C. neoformans* sensoriar glicose e, responder remodelando vias metabólicas, pode ser crítica para o início da colonização no hospedeiro (WILLIAMS & DEL POETA, 2011). A expressão da proteína antifagocítica 1 (App1) é dependente da disponibilidade de glicose. A expressão aumentada de App1 não é somente aumentada sob condições de baixos níveis de glicose, mas também no lavado bronquialveolar, soro e sistema nervoso central. A proteína inibe a fagocitose por macrófagos de maneira dose dependente contribuindo para a virulência de *C. neoformans* (LUBERTO et al, 2003). Mutantes nulos para as enzimas glicolíticas hexoquinases I e II e para piruvato quinase mostraram que a utilização de glicose foi afetada e a virulência de *C. neoformans* foi atenuada em modelo murino de infecção (PRICE et al, 2011). Além disso, a expressão aumentada de genes das vias glicolítica e gliconeogênica durante interações de *C. neoformans* com células fagocíticas e de tecidos do hospedeiro é similar ao já observado em *C. albicans*. O processo de fagocitose e crescimento no hospedeiro resulta em aparente mudança de utilização de carbono além da glicose e indução de transcritos para enzimas das vias do glioxilato, β -oxidação e gliconeogênese (BARELLE et al, 2006; LORENZ et al, 2004; PIEKARSKA et al, 2008; RAMIREZ & LORENZ, 2007). O mutante para o gene da isocitrate liase (*icl*) não mostrou atenuação da virulência de *C. neoformans* após modelos de infecção, mas a expressão deste mesmo gene aumentou após fagocitose do fungo por macrófagos (RUDE et al, 2002). Isso indica respostas similares às obtidas para *C. albicans* onde não há evidências de utilização de lipídeos durante a patogênese (BROCK, 2009; OTZEN et al, 2013), apesar da indução de genes das vias do glioxilato e defeitos na virulência do mutante para *icl* (LORENZ et al, 2004; LORENZ & FINK, 2001).

Recentemente, as respostas do protozoário *Entamoeba histolytica* à privação de glicose também foram caracterizadas. Os resultados mostraram que a virulência do

patógeno aumentou durante a baixa disponibilidade do nutriente resultando na modulação de vias alternativas de obtenção de energia (TOVY et al, 2011). Em protozoários, dados transcricionais e proteômicos em larga escala foram obtidos no organismo modelo, *Bacillus subtilis*, sob privação de glicose. Diversas frações celulares foram estudadas demonstrando que a bactéria alterna vias metabólicas de adaptação para sua sobrevivência (OTTO et al, 2010).

A sobrevivência em ambientes hostis do hospedeiro tais como em tecidos necróticos ou em fagossomos é um pré-requisito para o patógeno persistir no hospedeiro. O conhecimento das vias metabólicas essenciais durante a patogênese pode resultar na identificação de novos alvos de drogas ajudando a combater infecções fúngicas. A maioria dos alvos antifúngicos tem como alvo a membrana e parede celulares dos fungos, mas distúrbios no metabolismo podem fornecer alvos adequados. Entretanto um dos maiores problemas na identificação de determinantes de patogenicidade relacionados à nutrição é que as interações patógeno-hospedeiro são processos dinâmicos e não estáticos. Porém, estudos são focados em alvos específicos dos fungos e não das células do hospedeiro visto que vias metabólicas centrais são comuns para ambos. A isocitrate liase, por exemplo, não é um marcador para o metabolismo lipídico em *C. albicans*, mas preferencialmente para gliconeogênese e privação. Estudos moleculares de outras enzimas que atuem como “marcadores metabólicos” auxiliarão na construção de um mapa mais completo do metabolismo dos patógenos, especificamente dos fungos, durante a infecção. Entretanto, apenas um número limitado de estudos recentes tem focado no metabolismo primário durante a infecção (BROCK, 2009).

1.4.2. Hipóxia

Outra condição enfrentada por patógenos e que é relevante para o desenvolvimento das infecções são os baixos níveis de oxigênio encontrados no hospedeiro. Geralmente, considera-se que a condição de hipóxia (redução dos níveis de oxigênio comparada ao nível atmosférico) ocorre nos locais de infecção resultando em significativo estresse microambiental para a maioria das células dos patógenos microbianos e do hospedeiro (CRAMER et al, 2003; NIZET & JOHNSON, 2009). Estudos de monitoramento utilizando o fator de transcrição 1 induzível por hipóxia (HIF-1) indicam que as respostas à baixos níveis de oxigênio, em células de mamíferos,

se iniciam em teores do gás de aproximadamente 6% (pO₂, 40 mmHg) (RUPP et al, 2007). Em tecidos saudáveis no corpo humano, os níveis de oxigênio de 2,5 à 9% são considerados normais enquanto que níveis \leq 1%, descrito em tumores e feridas, são tipicamente considerados hipóxia (ARNOLD et al, 1987; DEWHIRST, 1998; SIMMEN et al, 1994). Até mesmo nos pulmões, local de intensa troca gasosa e ponto de partida para muitas infecções fúngicas, a pressão de oxigênio é considerada bem menor que a atmosférica, em torno de 14% (pO₂, 100 à 110 mmHg) (JAIN & SZNAJDER, 2005).

Os mecanismos de adaptação à hipóxia têm sido amplamente estudados em células de mamíferos e micro-organismos não patogênicos, porém há pouca informação na influência dessa condição na infectividade e virulência de patógenos (ERNST & TIELKER, 2009). Quando micro-organismos invasores interagem com células hospedeiras, lesões nos tecidos devido a processos inflamatórios, trombozes e necroses resultam em diminuição das tensões de oxigênio pelo decréscimo da perfusão do gás nos locais de infecção (ELTZSCHIG & CARMELIET, 2011; NIZET & JOHNSON, 2009). Consequentemente, os patógenos devem se adaptar à essa condição de estresse a fim de estabelecerem a infecção (GRAHL et al, 2012).

Os mecanismos de adaptação à hipóxia são variáveis entre fungos patogênicos humanos (BARKER et al, 2012; SHIMIZU et al, 2009; SYNNOTT et al, 2010) e são considerados fatores chave na virulência destes patógenos (CHANG et al, 2007; CHUN et al, 2007; ERNST & TIELKER, 2009; GRAHL & CRAMER, 2010; HALL & DENNING, 1994; SETIADI et al, 2006; WEST, 1985; WILLGER et al, 2008). As respostas frente às baixas tensões de oxigênio encontradas pelos micro-organismos se baseiam no sensoriamento de oxigênio com a finalidade de ativar sistemas complexos de respostas a essa condição. O sensoriamento de oxigênio nos fungos foi primeiramente caracterizado na levedura de fissão *Schizosaccharomyces pombe*, sendo recentemente caracterizada em outros fungos (CHANG et al, 2007; LANE et al, 2001; WILLGER et al, 2008) como, por exemplo, *C. neoformans* e *A. fumigatus*. As células de *S. pombe* respondem à baixa disponibilidade de oxigênio no ambiente controlando a transcrição de genes envolvidos na síntese de esteróis das membranas celulares a partir do fator de transcrição denominado Sre1, uma proteína homóloga às SREBPs (*sterol regulatory element binding protein*) de mamíferos nas quais controlam a transcrição de genes somente em resposta à depleção de esteróis nas células. Em *C. neoformans* e *A. fumigatus* os homólogos da Sre1 de *S. pombe* também tem sido caracterizado sendo denominados Sre1 e SrbA, respectivamente (BLATZER et al, 2011; CHANG et al,

2007; CHUN et al, 2007; WILLGER et al, 2008). As leveduras de fissão controlam as respostas tanto à hipóxia quanto a depleção de esteróis da membrana pelo mesmo fator de transcrição provavelmente pela incapacidade das células importarem esteróis do meio extracelular, dependendo exclusivamente da via de biossíntese de ergosterol na qual requer oxigênio (BIEN & ESPENSHADE, 2010; HUGHES et al, 2005). Assim, Sre1 de *S. pombe* e seus homólogos em outros fungos parecem ser o principal regular hipóxico nas células fúngicas. Apesar de regular dois terços de todos os genes responsivos à hipóxia nas leveduras de fissão, o fator de transcrição Sre1 não controla diretamente genes para as atividades glicolítica e respiratória. Somente 22% dos genes regulados hipoxicamente dependem da regulação por Sre1 de forma direta (TODD et al, 2006).

A aplicação de abordagens transcricionais e proteômicas vem crescendo gradativamente no estudo de fungos patogênicos humanos na tentativa de desvendar ainda mais os mecanismos moleculares de adaptação destes fungos nos microambientes do hospedeiro durante a patogênese. Por exemplo, cada vez mais têm sido descrito as respostas dos fungos à limitação de oxigênio e sugerido mecanismos de adaptação à esta condição. A importância desta adaptação para patogênese fúngica também tem sido investigada pelos cientistas. Em *C. neoformans*, as respostas transcricionais à hipóxia revelaram que o fungo aumenta a expressão de transcritos associados com a biossíntese do grupo heme e de ergosterol, metabolismo de ácidos graxos, de respostas a estresse e respiração celular. Por outro lado, o fungo diminuiu a expressão de transcritos envolvidos com parede celular e biossíntese da cápsula (CHUN et al, 2007). Os principais reguladores das respostas à hipóxia neste fungo são o fator de transcrição Sre1, membro da família SREBPs, mas também a proteína Tco, membro da família das histidina quinases específicas de fungo (CHUN et al, 2007). Como explicado anteriormente, Sre1 tem sido caracterizado como o principal fator envolvido no sensoriamento de oxigênio nos fungos, mas não o único. Em *C. neoformans* isto tem sido demonstrado. Sre1 regula genes associados à biossíntese de ergosterol e captação de metal em resposta à hipóxia e o mutante para este gene interfere no crescimento do fungo nesta condição. Por outro lado, o mutante para o outro regulador, Tco, não afeta os níveis de expressão de genes em resposta à hipóxia. Assim, os autores acreditam que a proteína Tco atua pós-transcricionalmente para mediar os impactos no crescimento hipóxico de *C. neoformans* (CHANG et al, 2007; CHUN et al, 2007).

No fungo *A. fumigatus*, respostas transcricionais e proteômicas em resposta à hipóxia têm sido conduzidas (BARKER et al, 2012; VODISCH et al, 2011). Um dos estudos focam nas respostas iniciais do fungo à hipóxia (BARKER et al, 2012) enquanto o outro nas respostas mais tardias (VODISCH et al, 2011). O fungo, inicialmente em resposta à hipóxia, induz a transcrição de genes envolvidos com a glicólise, fermentação, biossíntese de ergosterol, captação do íon ferro e da rota aminobutirato (GABA *shunt*). A rota aminobutirato tem sido descrita como envolvida nas respostas à hipóxia somente em *A. fumigatus*, em relação aos fungos patogênicos humanos. Esta rota contribui para a formação de glutamato e acredita-se estar envolvida na prevenção do acúmulo de NADH devido a ausência de aceptores de elétrons terminal tais como o oxigênio (FAIT et al, 2005). Isso indica que as espécies de *Aspergillus* não somente fermentam para reabastecer recursos de NAD⁺ para o fluxo glicolítico continuado, mas também parecem usar esta rota para prevenir a acumulação de NADH (GRAHL et al, 2012). Por outro lado, o fungo reduz a expressão de transcritos do ciclo do ácido cítrico e cadeia mitocondrial durante a resposta inicial à hipóxia (BARKER et al, 2012). Ao contrário dos estudos iniciais à hipóxia, as respostas tardias de *A. fumigatus* à hipóxia em níveis protéicos, revelaram que a abundância de proteínas relacionadas à glicólise, ciclo do ácido cítrico e respiração, aumentou, enquanto que as envolvidas com a fermentação, diminuiu, sugerindo que a fermentação pode ser utilizada nas etapas iniciais do fungo em hipóxia enquanto que a respiração oxidativa nas etapas mais tardias (VODISCH et al, 2011). Assim como em *C. neoformans*, *A. fumigatus* apresenta o homólogo do fator de transcrição Sre1 de *S. pombe*, denominado SrbA. A falta deste fator significativamente interfere no crescimento do fungo em hipóxia e muitos transcritos foram encontrados ser dependentes desta SREBP tais como aqueles envolvidos com a biossíntese de ergosterol e captação de metais (BLATZER et al, 2011; WILLGER et al, 2008).

No fungo *C. albicans*, estudos transcricionais revelaram que a condição de hipóxia eleva a expressão de genes envolvidos com metabolismo de ferro, biossíntese do grupo heme, metabolismo de ácidos graxo, de ergosterol, glicólise e fermentação, estruturas da parede e membrana celulares além de transcritos específicos da hifa. Ao contrário, transcritos envolvidos com respiração oxidativa (síntese geral de ATP) foram decrescidos em abundância (ASKEW et al, 2009; SETIADI et al, 2006; SYNNOTT et al, 2010). Desse modo, semelhanças são detectadas entre as vias reguladas pelos três fungos citados anteriormente assim como diferenças. Em *C. neoformans*, a respiração

foi aumentada em resposta à hipóxia e em *C. albicans* ocorreu o oposto, ambos em níveis transcricionais. Em *A. fumigatus* esta via só foi detectada ativada, em níveis protéicos, após longos períodos do fungo sob hipóxia. Por outro lado, *C. albicans* não tem o homólogo da família das SREBPs presente em *C. neoformans* e *A. fumigatus*. O homólogo do fator de transcrição de *S. cerevisiae* Upc2 foi encontrado para *C. albicans* e parece regular os níveis de ergosterol em resposta à hipóxia (MACPHERSON et al, 2005; SILVER et al, 2004; SYNNOTT et al, 2010) assim como Sre1 em *S. pombe*, *C. neoformans* e *A. fumigatus* (CHANG et al, 2007; HUGHES et al, 2005; WILLGER et al, 2008). Outros reguladores também têm sido descritos em *C. albicans* em resposta à hipóxia tais como a proteína Efg1, crítico para biossíntese de ácidos graxos em hipóxia (SETIADI et al, 2006), os fatores de transcrição Tye7 e Gal4, envolvidos com a indução de genes glicolíticos sob hipóxia (ASKEW et al, 2009) e o regulador transcricional Ace2 requerido para a transcrição de genes envolvidos na separação celular sob condições de hipóxia (MULHERN et al, 2006).

Além dos reguladores da resposta à hipóxia em fungos patogênicos citados acima, outros mutantes nulos para genes regulados por hipóxia ou reguladores da adaptação à hipóxia mostram que a virulência de vários fungos foi atenuada em modelos murinos de infecção como revisto em Butler (2013). Muitas destas moléculas requerem o oxigênio molecular para processos biossintéticos e conseqüentemente participam do sensoriamento dos níveis deste gás. Em teoria, muitas das moléculas nas quais a biossíntese é reduzida ou inibida em condição de hipóxia podem ser utilizadas na invasão do fungo às células hospedeiras. Dessa forma, de forma indireta, tais sensores dos teores de oxigênio estimulam mudanças no metabolismo geral das células permitindo a adaptação à hipóxia (BUTLER, 2013) tornando extremamente relevante o estudo deste estresse em fungos patogênicos humanos, pois o sucesso da infecção pode ser influenciado por tal adaptação.

*Justificativa
e
Objetivos*

2) Justificativa

Estudos da interação do fungo *Paracoccidioides* spp. com seu hospedeiro revelam que este patógeno possui estratégias de sobrevivência nos sítios de infecção e se adapta às diferentes condições de estresse enfrentadas pelo patógeno, regulando a expressão de genes e proteínas de forma nicho específica (BAILAO et al, 2006; BAILAO et al, 2007; COSTA et al, 2007; DERENGOWSKI et al, 2008; GROSSKLAUS et al, 2013; PARENTE et al, 2013; TAVARES et al, 2007). Nos fagócitos ou mesmo em outros nichos ecológicos, os fungos patogênicos humanos enfrentam estresses nutricional, térmico, nitrosativo, oxidativo além daqueles decorrentes de alterações de pH, variações na tensão de oxigênio e exposição à agentes tóxicos (BROWN et al, 2007b). *Paracoccidioides* spp. possivelmente se adapta às condições de estresse nutricional e baixas tensões do gás oxigênio durante a sua patogênese. O estudo dos aspectos metabólicos e a caracterização dos mecanismos moleculares utilizados pelo fungo frente à estes estresses tornam-se relevantes no contexto da interação e adaptação de *Paracoccidioides* spp. aos microambientes do hospedeiro desde que são importantes durante o estabelecimento da doença e ainda não foram elucidados.

A aplicação de abordagens transcricionais e proteômicas, ainda escassa em fungos patogênicos humanos, vem crescendo gradativamente. A proteômica vem acompanhada do desenvolvimento dos bancos de dados que, no gênero *Paracoccidioides*, disponibilizou a anotação dos genomas das linhagens fúngicas *Pb01*, *Pb18* e *Pb03* permitindo que genes e proteínas sejam rapidamente identificados.

Embora evidências de que *Paracoccidioides* spp. enfrenta condições de privação de nutrientes durante interação com células fagocíticas do hospedeiro (TAVARES et al, 2007) e regula a expressão diferencial de genes durante a disseminação sistêmica do fungo (BAILAO et al, 2007; COSTA et al, 2007), condições onde podem ser encontradas condições de hipóxia, as respostas do fungo em condições de privação de glicose e de baixas tensões de oxigênio não têm sido caracterizadas até o momento, ainda mais por análises de sequenciamento em larga escala e cromatografia líquida bi-dimensional acoplada à espectrometria de massas. Acreditamos que os dados obtidos possam ser relevantes na elucidação de mecanismos moleculares e moléculas importantes para o estabelecimento do fungo no hospedeiro, ainda bastante obscuros.

3) Objetivos

O objetivo do trabalho é caracterizar as respostas do fungo *Paracoccidioides*, *Pb01*, frente às condições de privação de glicose ou hipóxia. Para tal, os objetivos específicos são:

- Avaliar as respostas do fungo em níveis transcricionais e proteômicos nas condições de privação de glicose e controle, por meio de PCR em tempo real, *western blot*, sequenciamento em larga escala (RNAseq) e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (NanoUPLC-MS^E);
- Verificar a susceptibilidade de células do fungo previamente privadas ou não de glicose à morte por macrófagos;
- Caracterizar o homólogo do fator de transcrição da família das SREBPs, responsivos à hipóxia no *Pb01*, *PbsrbA*, por análises *in silico*, PCR em tempo real e ensaio de complementação gênica no mutante nulo para *srbA* de *A. fumigatus*;
- Verificar o crescimento, susceptibilidade à antifúngicos e privação do íon ferro das linhagens mutante para *srbA*, geneticamente complementada com *PbsrbA* e tipo selvagem de *A. fumigatus*;
- Analisar o perfil de expressão diferencial de transcritos e proteínas do *Pb01* em condições que mimetizam hipóxia e controle, por meio de PCR em tempo real e *western blot*;
- Caracterizar as respostas protéicas do *Pb01* em condições que mimetizam hipóxia por análise em gel bi-dimensional;
- Propor possíveis estratégias moleculares e adaptativas enfrentadas pelo fungo em resposta a ambos os estresses, privação de glicose e de oxigênio.



Capítulo 2
Privação de glicose

Manuscrito

View Letter

[Close](#)

Date: Nov 7 2013 9:29PM
To: "Celia Maria de Almeida Soares" cmasoares@gmail.com
From: "PLOS Neglected Tropical Diseases" plosntds@plos.org
Subject: Your presubmission inquiry

Dear Dr. de Almeida Soares

Thank you very much for your presubmission inquiry to PLoS Neglected Tropical Diseases.

We are interested in your work, "Title - Transcriptional and Proteomic Responses of Paracoccidioides Facing Glucose Deprivation Short Title - Glucose Deprivation in Paracoccidioides," and its relevance to neglected tropical diseases. The Editorial Board would like to invite you to submit your manuscript for full consideration at:
<http://www.editorialmanager.com/pntd>

This decision reflects the Board's interest in the study you have described. However, please understand that the editorial decision to send a paper out for peer-review can only be made after we have the opportunity to evaluate the full-length manuscript.

When you do submit, please include mention of this presubmission inquiry and the manuscript number (PNTD-D-13-01786) in the "Previous Interactions" section of the submission form.

We look forward to receiving your paper.

Sincerely,

Peter Hotez
Editor-in-Chief

[Close](#)



**To the
PloS Neglected Tropical Diseases Editorial Board**

Goiânia, November 7th, 2013.

It is our pleasure to submit our article entitled “**Transcriptional and proteomic responses to glucose deprivation in *Paracoccidioides***” to the PLoS Neglected Tropical Diseases editorial board.

The genus *Paracoccidioides* comprises human thermal dimorphic fungi, causing paracoccidioidomycosis (PCM), an important mycosis in Latin America. This manuscript focuses in this dimorphic fungus, which causes a disease that commonly presents a respiratory chronic manifestation and eventually disseminated lesions. The disease is considered the most prevalent systemic fungal infection in Brazil and is present in Latin American countries from Mexico to Argentina.

Adaptation to environmental conditions is key to fungal survival during infection of human hosts. Macrophages are a poor- glucose and amino acid environment and it has been suggested that alternative carbon metabolism plays a role in survival and virulence of *Paracoccidioides* spp. within the host cells. Whereas the physiological and metabolic changes in *Paracoccidioides* spp. following their exposure to oxidative stress, iron and zinc deprivation have been investigated, the effects of glucose deprivation in this parasite is lacking.

For a complete understanding of physiological processes in an organism, the integration of approaches addressing different levels of regulation should be

relevant. We analyzed differences in transcripts and proteins levels in control and glucose-starved yeast cells, by quantitative large-scale transcriptome (RNAseq) and proteome (NanoUPLC-MS^E) analysis. A total of 2,437 transcripts and 421 proteins, were differentially regulated, providing a global view of metabolic reprogramming during glucose deprivation. The main changes were those related to cells shift to gluconeogenesis and ethanol production, supported by the degradation of amino acids and fatty acids and by the modulation of the glyoxylate and tricarboxylic cycles. This proposed carbon flow remodeling was reinforced by gene and protein expression profiles accessed by qRT-PCR and western blot analysis, respectively, as well as by enzymatic, cell dry weight and fungus-macrophage interaction assays. The obtained data comprise the first comprehensive profiling of changes of *Paracoccidioides* under glucose restriction and allow in-depth analysis of major physiological processes.

This article is part of our work on identification and characterization of molecules associated to the fungus host interaction as we had described in some recent publications. We believe that this article represents a great contribution for those involved in this area.

We hope to hear from you soon

Sincerely,

Célia Maria de Almeida Soares, PhD

*Laboratório de Biologia Molecular
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Goiás,
74001-970, Goiânia, Goiás, Brazil.
Tel/Fax:55-62-5211110
e-mail:<cmasoares@gmail.com >*

1 **Transcriptional and proteomic responses to glucose deprivation in**
2 ***Paracoccidioides***

3

4 Patrícia de Sousa Lima ^{1,2}, Luciana Casaletti ¹, Alexandre Melo Bailão ¹, Ana Tereza
5 Ribeiro de Vasconcelos ³, Gabriel da Rocha Fernandes ⁴, Célia Maria de Almeida
6 Soares ^{1,*}

7

8 ¹ Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade
9 Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil; ² Programa de Pós Graduação em Patologia
10 Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal,
11 Brazil. ³ Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC), Petrópolis, Rio de
12 Janeiro, Brazil. ⁴ Laboratório de Bioinformática, Universidade Católica de Brasília,
13 Brasília, Distrito Federal, Brazil.

14 * e-mail: cmasoares@gmail.com

15

16 **Abstract**

17

18 **Background**

19 The genus *Paracoccidioides* comprises human thermal dimorphic fungi, which
20 cause paracoccidioidomycosis (PCM), an important mycosis in Latin America.
21 Adaptation to environmental conditions is key to fungal survival during human host
22 infection. The adaptability of carbon metabolism is a vital fitness attribute during
23 pathogenesis.

24

25

26 Methodology/ Principal Findings

27 The fungal pathogen *Paracoccidioides* spp. is exposed to numerous adverse
28 conditions, such as nutrient deprivation, in the human host. In this study, a
29 comprehensive response of *Paracoccidioides*, Pb01, under glucose deprivation was
30 investigated using high-resolution transcriptomic (RNAseq) and proteomic
31 (NanoUPLC-MS^E) approaches. A total of 2,437 transcripts and 421 proteins, were
32 differentially regulated, providing a global view of metabolic reprogramming during
33 glucose deprivation. The main changes were those related to cells shifting to
34 gluconeogenesis and ethanol production, supported by the degradation of amino acids
35 and fatty acids and by the modulation of the glyoxylate and tricarboxylic cycles. This
36 proposed carbon flow hypothesis was supported by gene and protein expression profiles
37 assessed using qRT-PCR and western blot analysis, respectively, as well as using
38 enzymatic, cell dry weight and fungus-macrophage interaction assays. The glucose
39 provides a survival advantage to *Paracoccidioides* inside macrophages.

40

41 Conclusions/ Significance

42 For a complete understanding of the physiological processes in an organism, the
43 integration of approaches addressing different levels of regulation is important. To the
44 best of our knowledge, this report presents the first description of the responses of
45 *Paracoccidioides* spp., to host-like conditions using large-scale expression approaches.
46 The alternative metabolic pathways that could be adopted by the organism during
47 glucose deprivation can be important for a better understanding of the fungal adaptation
48 to the host, because systems for detecting and responding to carbon sources play a
49 major role in adaptation and persistence in the host niche.

50

51 **Author Summary**

52 The species of the *Paracoccidioides* genus, a neglected human pathogen,
53 represents the causative agents of paracoccidioidomycosis (PCM), one of the most
54 frequent systemic mycoses in Latin America. Despite being phagocytosed, the fungus
55 conidia differentiate into the parasitic yeast form that subverts the normally harsh
56 intraphagosomal environment and survives and replicates into murine and human
57 macrophages. It has been suggested that alternative carbon metabolism plays a role in
58 the survival and virulence of *Paracoccidioides* spp within host cells. We used large
59 scale transcriptome and proteome approaches to better characterize the responses of
60 *Paracoccidioides*, Pb01, yeast parasitic cells, to glucose deprivation. We aimed to
61 identify important molecules used by the fungus to adapt to these hostile conditions.
62 The shift to a starvation mode, including gluconeogenic and ethanol increases,
63 activation of fatty acids and amino acid degradation are the strategies used by the
64 pathogen to persist under this stress. Our study provides a detailed map of
65 *Paracoccidioides* spp. responses under glucose deprivation conditions and contributes
66 to further investigations of the importance of alternative carbon adaptation during
67 fungus pathogenesis.

68

69 **Introduction**

70 Metabolic adaptability and flexibility are important attributes for pathogens to
71 successfully colonize, infect, and cause disease in a wide range of hosts. Therefore, they
72 must be able to assimilate various carbon sources. Carbohydrates are the primary and
73 preferred source of metabolic carbon for most organisms and are used for generating
74 energy and producing biomolecules (ASKEW et al, 2009).

75 Studies have highlighted the importance of carbon metabolism in fungi (PRICE
76 et al, 2011; RAMIREZ & LORENZ, 2007). Pathogens such as *Candida albicans*
77 display sufficient metabolic flexibility to assimilate the available nutrients in diverse
78 niches such as the skin, mucous membranes, blood, and biofilms (CALDERONE, 2002;
79 ODDS, 1988). The mucosal surface of the lung may provide a more nutrient-limited
80 condition because it is not in direct contact with nutrients from food intake (TRAVIS et
81 al, 1999). Additionally, in the lungs, macrophages rapidly phagocytose inhaled
82 microorganisms supported by neutrophils and dendritic cells (IBRAHIM-GRANET et
83 al, 2010). Macrophages are considered a glucose- and amino acid-poor environment
84 (BARELLE et al, 2006; LORENZ et al, 2004) and may form extremely nutrient-limited
85 conditions causing severe starvation (FLECK et al, 2011). In *C. albicans* and
86 *Cryptococcus neoformans*, alternative carbon metabolism was detected after
87 internalization by macrophages playing a role in fungal survival in these host cells
88 (COONEY & KLEIN, 2008; FAN et al, 2005; LORENZ et al, 2004). In contrast, in the
89 case of systemic infections, pathogens can reach different internal organs such as the
90 liver, which is the main storage compartment of glucose in the form of glycogen. The
91 bloodstream, for example, is the major carrier of nutrients, glucose, proteins, amino
92 acids, and vitamins in larger quantities (FLECK et al, 2011). In this way, metabolic and
93 stress adaptation represent vital fitness attributes that have evolved alongside virulence
94 attributes in fungi (BARELLE et al, 2006; FLECK et al, 2011; FRADIN et al, 2005;
95 LORENZ et al, 2004).

96 Alternative carbon metabolism was also described to be important to protozoa
97 and bacteria (OTTO et al, 2010; TOVY et al, 2011). *Entamoeba histolytica* uses an
98 alternative source of energy when the microorganism is exposed to glucose starvation.
99 In the specific pyruvate-to-ethanol pathway in *E. histolytica*, acetyl-CoA is converted to

100 acetaldehyde, which is then reduced to ethanol (LO & REEVES, 1978). Reduced levels
101 of the long-chain fatty-acid-CoA ligase protein during glucose starvation conditions in
102 *E. histolytica* may explain a mechanism by which acetyl-CoA is shuttled from the fatty
103 acid metabolism into this pyruvate-to-ethanol pathway. In addition, the glucose
104 starvation modulates the protozoa virulence based on proteome analysis (TOVY et al,
105 2011). The transcriptome and large-scale proteome dynamics were also analyzed in
106 *Bacillus subtilis* from glucose-starved cells. A direct consequence of glucose depletion
107 on enzymes was the switch from glycolytic to gluconeogenic metabolism and elevated
108 abundance of proteins of the tricarboxylic cycle used for energy generation. Genes that
109 are involved in exponential growth, amino-acid biosynthesis, purine/ pyrimidine
110 synthesis and the translational machinery were down-regulated in the bacteria cells
111 under glucose starvation (OTTO et al, 2010).

112 The species of the *Paracoccidioides* genus represent the causative agents of
113 paracoccidioidomycosis (PCM), one of the most frequent systemic mycoses in Latin
114 America (RESTREPO & TOBON, 2005). The genus comprises four phylogenetic
115 lineages (S1, PS2, PS3, and Pb01-like). The phylogenetic analysis of many
116 *Paracoccidioides* isolates has resulted in the differentiation of the genus into two
117 species: *P. brasiliensis*, which represents a complex of three phylogenetic groups, and
118 *P. lutzii*, which represents the Pb01-like isolates (CARRERO et al, 2008;
119 DESJARDINS et al, 2011; MATUTE et al, 2006; TEIXEIRA et al, 2009).
120 *Paracoccidioides* spp. grows as a yeast form in the host tissue and *in vitro* at 36°C,
121 while it grows as mycelium under saprobic condition and in culture at room temperature
122 (18–23°C). As the dimorphism is dependent on temperature, when the mycelia/ conidia
123 are inhaled into the host lungs, the transition of the mycelia to the pathogenic yeast
124 phase occurs (SAN-BLAS et al, 2002).

125 One of the first lines of defense faced by *Paracoccidioides* spp. during host
126 invasion is the lung resident macrophages. Despite being phagocytosed, the fungus
127 conidia differentiate into the parasitic yeast form that subverts the normally harsh
128 intraphagosomal environment and survives and replicates into murine and human
129 macrophages (BRUMMER et al, 1989). It has been proposed for PCM and other
130 systemic mycoses that the fungal intracellular parasitism is a major event for disease
131 establishment and progression in susceptible hosts, by enabling fungal latency and/or
132 dissemination from the lungs to several organs such as observed in *C. neoformans*
133 (FELDMESSER et al, 2000; FRANCO, 1987). In this sense, *Paracoccidioides* spp. has
134 evolved defense mechanisms to survive under nutritionally poor environments. It has
135 been suggested that alternative carbon metabolism plays a role in the survival and
136 virulence of *Paracoccidioides* spp. within the host (DERENGOWSKI et al, 2008;
137 TAVARES et al, 2007), as occurs in *C. albicans* and *C. neoformans* (FAN et al, 2005;
138 LORENZ et al, 2004). The early transcriptome of *Paracoccidioides* spp. upon
139 internalization by macrophages showed that the fungus responds to the glucose-depleted
140 environment found in the macrophage phagosome. Genes involved in methionine
141 biosynthesis (cystathionine β -lyase), oxidative stress response (superoxide dismutase
142 and heat shock protein 60), and cytochrome electron transport system (cytochrome
143 oxidase c) were induced by the fungus. Moreover, *Paracoccidioides* spp. reduced the
144 expression of genes that are involved in the glycolysis pathway such as the key
145 regulatory phosphofructokinase (*pfkA*) and genes related to cell wall polysaccharides
146 such as β -glucan synthase (*fks*) (TAVARES et al, 2007). In addition, the transcriptome
147 profiling from yeast cells of *Paracoccidioides* spp. derived from mouse livers revealed
148 that the fungus most likely uses multiple carbon sources during liver infection. Genes
149 encoding enzymes, regulators, and transporters in carbohydrate and lipid metabolism

150 were significantly overexpressed. Ethanol production was also detected, indicating that
151 it may be particularly important during infection (COSTA et al, 2007).

152 Here, we described the response of *Paracoccidioides* facing glucose deprivation
153 using a high-throughput RNA sequencing (RNAseq) and quantitative proteome
154 NanoUPLC-MS^E, a two-dimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry
155 approach. RNAseq is a developed approach to transcriptome profiling that uses deep-
156 sequencing technologies and has already been applied to organisms such as
157 *Saccharomyces cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana*, mouse, and human cells (CLOONAN
158 et al, 2008; LISTER et al, 2008; MORTAZAVI et al, 2008; NAGALAKSHMI et al,
159 2008; WANG et al, 2009b). With regard to proteomic analysis, our group has developed
160 detailed proteome maps of the process of the fungus dimorphism, the response to iron
161 deprivation, the fungus exoproteome, and the response to oxidative stress as well as
162 comparative proteome maps of members of *Paracoccidioides* phylogenetic species
163 (GROSSKLAUS et al, 2013; PARENTE et al, 2011; PIGOSSO et al, 2013; REZENDE
164 et al, 2011; WEBER et al, 2012). In this study, a comprehensive response of
165 *Paracoccidioides*, isolate *Pb01*, under glucose deprivation was performed by
166 transcriptional and proteomic approaches. To the best of our knowledge, this is the first
167 description of high-resolution transcriptomics and proteomics applied to study the
168 response of *Paracoccidioides* spp. to glucose deprivation. We believe that the obtained
169 data can be relevant in the understanding of the fungal establishment in the host.

170

171

172

173

174

175 **Materials and Methods**

176

177 ***Paracoccidioides* maintenance**

178 *Paracoccidioides*, Pb01 (ATCC MYA-826), was used in the experiments. The
179 yeast phase was cultivated for 7 days, at 36°C in BHI semisolid medium added to 4%
180 (w/v) glucose. When required, the cells were grown for 72 h at 36°C in liquid BHI,
181 washed with PBS, and incubated at 36°C in McVeigh/Morton medium (MMcM)
182 (RESTREPO & JIMENEZ, 1980). Because amino acids in MMcM could be
183 gluconeogenic precursors, we modified it to cultivate *Paracoccidioides* with [4% (w/v)]
184 or without glucose in medium without cysteine and asparagine amino acids.

185

186 **Quantitative real time PCR (qRT-PCR) analysis**

187 Following *Paracoccidioides* yeast cells growth in glucose deprivation, cells
188 were centrifuged at 1500 x g, frozen in liquid nitrogen, and disrupted by maceration as
189 described in (PARENTE et al, 2011). Briefly, cells were treated with TRIzol reagent
190 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The manufacturer's protocol was followed to extract
191 total RNA. The RNA was reversibly transcribed using the high capacity RNA-to-cDNA
192 kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). We confirmed the specificity of each
193 primer pairs for the target cDNA by the visualization of a single PCR product following
194 agarose gel electrophoresis and melting curve analysis. The cDNA was quantified by
195 qRT-PCR using a SYBR green PCR master mix (Applied Biosystems Step One Plus
196 PCR System). qRT-PCR analysis was performed in triplicate for each cDNA sample as
197 previously described (PARENTE et al, 2011). The data were normalized using the
198 constitutive gene encoding the 60S ribosomal L34 gene as the endogenous control,
199 which was amplified in each set of qRT-PCR experiments and were presented as

200 relative expression in comparison to the experimental control cells value set at 1. Data
201 were expressed as the mean \pm standard deviation of the triplicates of independent
202 experiments. Standard curves were generated by diluting the cDNA solution 1:5.
203 Relative expression levels of genes of interest were calculated using the standard curve
204 method for relative quantification (BOOKOUT et al, 2006). Statistical comparisons
205 were performed using the student's t test and p-values ≤ 0.05 were considered
206 statistically significant. The specific primers, both sense and antisense, are described in
207 Table S5.

208

209 **Western blot analysis**

210 Proteins were fractionated by 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and
211 stained with Coomassie Blue R or transferred to HybondTM ECLTM membrane (GE
212 Healthcare). Membranes were blocked for 1 h at room temperature in a solution
213 containing 10% (w/v) skim milk powder and 0.1% Tween 20 in Tris-buffered saline
214 (TBS-T). The primary antibody (the rabbit polyclonal anti-isocitrate lyase) was diluted
215 in blocking solution and incubated with the membrane for 1 h at room temperature.
216 Membranes were washed in Tris-buffered saline and then incubated with alkaline
217 phosphatase conjugated secondary antibodies for another hour at room temperature.
218 Labeled bands were revealed with 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate/nitroblue
219 tetrazolium and negative controls were obtained with rabbit preimmune. Images from
220 western blots were acquired with ImageMasterTM 2D Platinum 6.0 (Geneva
221 Bioinformatics, GeneBio). Raw Tiff images were analyzed by Image J 1.45s (Wayne
222 Rasband). Pixel intensity for the analyzed bands was generated and expressed as
223 Integrated Density Values (IDV). Values were normalized considering 100% the
224 maximum IDV value for each experiment.

225 **High-throughput mRNA sequencing (RNA-seq)**

226 Following *Paracoccidioides* growth in glucose (control) or glucose deprivation
227 (treatment) for 6 h, cells were treated with TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA,
228 USA) to obtain RNA molecules. Aliquots from mRNA samples were used for
229 construction of the cDNA libraries. Total cDNAs sequencing from a pool of biological
230 triplicates was performed using the HiSeq™2000 Sequencing System from Illumina
231 (<http://www.illumina.com/>). As a result, approximately 40 million of reads of 100 bp
232 paired-end sequencing were obtained for each sample. The sequencing reads were
233 mapped to reference the *Paracoccidioides* genome (*Pb01*),
234 (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiH
235 [ome.html](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiH)), using the Bowtie 2 tool (LANGMEAD et al, 2009). Mapped reads data were
236 analyzed by the DEGseq package (WANG et al, 2009a). Briefly, each read was allowed
237 to alignment in just one site of the genome and the reads were counted. The fold change
238 selection method was used for differentially expressed genes selection using a Fisher
239 exact test, and a p-value of 0.001 was considered to select the genes. From the selected
240 genes, the 1.5-fold change cut-off was considered. Genes with log₂ (fold change) higher
241 than 0.58 or less than -0.58 were selected and classified as up- and down-regulated
242 genes, respectively. Gene's identifications and annotations were determined from the
243 *Paracoccidioides* genome database
244 (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiH
245 [ome.html](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiH)). The biological processes were obtained using the Pedant on MIPS
246 (<http://pedant.helmholtz->
247 [muenchen.de/pedant3htmlview/pedant3view?Method=analysis&Db=p3_r48325_Par_br](http://pedant3htmlview/pedant3view?Method=analysis&Db=p3_r48325_Par_br)
248 [asi_Pb01](http://pedant3htmlview/pedant3view?Method=analysis&Db=p3_r48325_Par_br)) which provides a tool to browse and search the Functional Categories
249 (FunCat) of proteins. All scripts can be obtained on request.

250 **Sample preparation, data acquisition and processing and protein identification by**
251 **mass spectrometry analysis**

252 Following *Paracoccidioides* cell growth in glucose depleted media for up to 48
253 h, the cells were centrifuged at 1500 x g, resuspended in a in homogenization buffer (2
254 mM CaCl₂, 20 mM Tris-HCl, pH 8.8) containing a mixture of nuclease and protease
255 inhibitors (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) and disrupted using glass beads and bead
256 beater apparatus (BioSpec, Oklahoma, USA) in 5 cycles of 30 sec, while on ice. The
257 cell lysate was centrifuged at 10000 x g for 15 min at 4 °C and the supernatant was
258 concentrated and subsequently washed three times using 50 mM ammonium
259 bicarbonate pH 8.5 solution via ultracentrifugation through a 10-kDa molecular weight
260 cut off in ultracel regenerated membrane (Amicon Ultra centrifugal filter, Millipore,
261 Bedford, MA, USA). Proteins were quantified using the Bradford reagent (Sigma-
262 Aldrich) (BRADFORD, 1976). The samples were analyzed using nanoscale liquid
263 chromatography coupled with tandem mass spectrometry. Sample aliquots (50 µg) were
264 prepared for NanoUPLC-MS^E as previously described (MURAD & RECH, 2012;
265 MURAD et al, 2011). Briefly, 50 mM ammonium bicarbonate was added and was
266 followed by addition of 25 µL of RapiGESTTM (0.2% v/v) (Waters Corp, Milford, MA).
267 The solution was vortexed and then incubated at 80°C for 15 min; 2.5 µL of a 100 mM
268 DTT solution was then added and incubated for 30 min at 60°C. The sample was then
269 cooled at room temperature, and 2.5 µL of 300 mM iodoacetamide was added followed
270 by sample incubation in a dark room for 30 min. A 10 µL aliquot of trypsin (Promega,
271 Madison, WI, USA) prepared with 50 mM ammonium bicarbonate to 50 ng/ µL, was
272 added. The sample was vortexed slightly and digested at 37°C overnight. Following the
273 digestion, 10 µL of 5% (v/v) trifluoroacetic acid was added to hydrolyze the
274 RapiGESTTM, followed by incubation at 37°C for 90 min. The sample was centrifuged

275 at 18000 x g at 6°C for 30 min, and the supernatant was transferred to a Waters Total
276 Recovery vial (Waters Corp). A solution of one pmol ul⁻¹MassPREP Digestion Standard
277 [rabbit phosphorilase B (PHB)] (Waters Corp) was used to prepare the final
278 concentration of 150 fmol ul⁻¹ of the PHB. The buffer solution of 20 mM ammonium
279 formate (AF) was used to increase the pH. The digested peptides were separated further
280 via NanoUPLC-MS^E and analyzed using a nanoACQUITYTM system (Waters
281 Corporation, Manchester, UK). Mass spectrometry data obtained from NanoUPLC-MS^E
282 were processed and searched using ProteinLynx Global Server (PLGS) version 3.0
283 (Waters Corp). Protein identifications were obtained by searching against the
284 *Paracoccidioides* database
285 (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiH
286 [ome.html](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiH)). Protein and peptides tables generated by PLGS were merged and the
287 dynamic range of the experiments, peptides detection type, and mass accuracy were
288 determined for each condition as described in (MURAD & RECH, 2012). In addition, a
289 constitutive protein detected in all replicates and with a low variance coefficient was
290 used to normalize the expression data and accurately compare the expression protein
291 level to control and glucose-deprived samples.

292

293 ***Paracoccidioides* cell dry weight assay**

294 *Paracoccidioides* yeast cells were grown for 72 h at 36°C in liquid BHI, washed
295 with PBS 1X, and filtered using a nylon mesh filter to yield small and non-aggregated
296 cells. A total of 5 x 10⁷ cells/ 50 mL were inoculated in modified MMcM medium
297 (RESTREPO & JIMENEZ, 1980) with (4%) or without (0%) glucose and were
298 incubated at 36°C. In each time-point, 10 mL of culture were centrifuged at 1500 x g
299 and the supernatants were carefully removed. The cells were resuspended in PBS1X up

300 to 500 μ l and submitted to 95°C heating for 1 h. The cells were centrifuged, frozen in
301 liquid nitrogen and lyophilized for 24 h. Dry weight was determined. Data are expressed
302 as the mean \pm standard deviation of the triplicates of independent experiments.
303 Statistical comparisons were performed using the Student's t test, and p-values \leq 0.05
304 were considered statistically significant.

305

306 **Ethanol measurement assay**

307 The concentration of ethanol was quantified by enzymatic detection kit
308 according to the manufacturer's instruction (UV-test for ethanol, RBiopharm,
309 Darmstadt, Germany). Ethanol is oxidized to acetaldehyde by the enzyme alcohol
310 dehydrogenase, in the presence of nicotinamide-adenine dinucleotide (NAD).
311 Acetaldehyde is quantitatively oxidized to acetic acid in the presence of aldehyde
312 dehydrogenase, releasing NADH, which is determined by means of its absorbance at
313 340 nm. *Paracoccidioides*, Pb01 yeast cells, were submitted or not to glucose
314 deprivation and 10^8 cells were used to assay. Briefly, cells were counted, centrifuged,
315 and lysed using glass beads and bead beater apparatus (BioSpec, Oklahoma, USA) in 5
316 cycles of 30 sec, keeping the samples on ice. The cell lysate was centrifuged at 10000 x
317 g for 15 min at 4 °C and the supernatant was used for enzymatic assay according to the
318 manufacturer's instructions. The concentrations of ethanol were obtained in triplicate.

319

320 **Macrophage infection assays**

321 To evaluate whether glucose deprivation influenced the internalization and
322 survival of *Paracoccidioides*, the survival rate (viable fungi after co-cultivation) was
323 determined by quantifying the number of colony-forming units (CFUs) recovered from
324 macrophage infection. Macrophages, cell line J774 A.1 (Rio de Janeiro Cell Bank –

325 BCRJ/ UFRJ, accession number: 0121), maintained in RPMI medium (RPMI 1640,
326 Vitrocell, Brazil), with 10% FBS (fetal bovine serum, [v/v]) were used in assays. A total
327 of 10^6 macrophages were seeded into each well of a 24-well tissue culture plate and 100
328 U/ ml of IFN-gamma (murine IFN- γ , PeproTech, Rocky Hill, New Jersey, USA) was
329 used for 24 hours at 37°C with 5% CO₂ for activation of macrophages (YOUSEFF et al,
330 2012). Prior to co-cultivation, *Paracoccidioides* yeast cells were grown in BHI liquid
331 medium (4% [w/v] glucose, 3.7% [w/v] brain hearth infusion, pH 7.2) for 72 h and
332 submitted to glucose deprivation in McVeigh/Morton medium (MMcM) for 48 h, with
333 (4% [w/v]) or without (0% [w/v]) of glucose at 36°C. The same ratio of 1:2.5
334 macrophage:yeast was used for infection of both the glucose-deprived and control yeast
335 cells. The cells were co-cultivated for 24 h with 5% CO₂ at 37°C to allow fungal
336 internalization. Prior to macrophages lysis, dilutions of the supernatant (culture from co-
337 cultivation) removed by aspiration, were plated in BHI medium supplemented with 5%
338 FBS (fetal bovine serum, [v/v]) incubated in 5% CO₂ at 37 °C for 10 days. The number
339 of viable cells was determined based on the number of CFUs. Infected macrophages
340 were lysed with distilled water and dilutions of the lysates were plated in BHI medium
341 supplemented with 5% FBS (fetal bovine serum, [v/v]). Colony-forming units (CFU)
342 were determined after growth at 37°C, in 5% CO₂, for 10 days. For both experiments,
343 the CFUs data were expressed as the mean value \pm the standard deviation from
344 triplicates and the statistical analyses were performed using Student's t test.

345 To analyze the kinetics of expression of genes from *Paracoccidioides* yeast cells
346 infecting macrophages, the same cell line described above was used. *Paracoccidioides*
347 yeast cells were cultivated in BHI liquid medium (4% [w/v] glucose, 3.7% [w/v] brain
348 hearth infusion, pH 7.2) for 72 h and incubated with macrophages for 24 h, followed by

349 washing with distilled water to promote macrophages lysis. RNAs and cDNAs were
350 obtained as previously described. Controls were obtained.

351

352 **Results**

353

354 **Effect of glucose deprivation on transcripts and proteins of *Paracoccidioides***

355 We first sought to set up a time-point to analyze the fungus response to glucose
356 deprivation at transcriptional and proteomic levels. Hence, we analyzed gene and
357 protein expression of genes known to be regulated under glucose-limited
358 microenvironments in other fungi (FAN et al, 2005; LORENZ et al, 2004), by using
359 qRT-PCR and western blot assays, in *Pb01* (Fig. 1A). Changes in the kinetics of
360 expression of genes encoding fructose-1,6-biphosphatase, isocitrate lyase, and 3-
361 ketoacyl-CoA thiolase, which are representatives of gluconeogenesis, the glyoxylate
362 cycle, and β -oxidation, respectively, were analyzed in the *Paracoccidioides*, *Pb01* yeast
363 cells, submitted under glucose deprivation. As depicted in Fig. 1A, glucose deprivation
364 promoted the increase of gene expression at 6 h and at 12 h for the treatments. At
365 protein level, the differential expression of isocitrate lyase suggested that
366 *Paracoccidioides*, *Pb01*, up-regulated the glyoxylate cycle after 48 h of glucose
367 deprivation (Fig. 1B). In this way, the 6 h and 48 h treatments were considered in
368 further transcriptional and proteomic analysis, using a high-throughput RNA Illumina
369 sequencing (RNAseq) and NanoUPLC-MS^E, respectively.

370

371 **Transcriptomic analysis**

372 The transcriptome analysis was performed using next generation sequencing and
373 the *Paracoccidioides*, isolate *Pb01*, genome database was used as a reference genome

374 for mapping the reads. For the control and glucose deprivation after 6 h, 58.48 and
375 55.89% of reads were mapped against the *Paracoccidioides* genome database
376 (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiH
377 [ome.html](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiH)), respectively, indicating satisfactory genome coverage for both. The mapped
378 reads data were analyzed by DEGseq package, and plotting graphs were performed for
379 global analysis of the data (Fig. S1). The scatter plot shows that the number of reads
380 mapped to each gene for both conditions was similar (Fig. S1A). This density of reads
381 for each gene can also be visualized in the MA-plot graph. This graph shows the
382 intensity of expression, density of mapped reads, and the significant expression ratio to
383 expressed genes. The fold change range (log₂) in the majority of genes shown is
384 between 2 and - 2 (Fig. S1B).

385 A cut-off of 1.5-fold change was applied to determine the up- and down-
386 regulated transcripts (Tables S1 and S2, respectively) totaling 2,437 differentially
387 expressed transcripts in *Pb01* yeast cells under glucose deprivation. A biological
388 process classification was performed to gain a general understanding of the functional
389 categories affected by glucose deprivation. A total of 57% (1388 transcripts) were
390 represented by miscellaneous and unclassified categories, and the other 43% (1049
391 transcripts) were represented by classified biological categories. The functional
392 classifications and the percentage of up- and down-regulated transcripts in each
393 classified category are shown in Fig. S2.

394 The transcriptome analysis showed that transcripts associated with metabolism
395 were the most represented during 6 h of glucose deprivation in *Pb01* (Fig. S2A). From
396 these, approximately 20% were represented by up-regulated and 12% by down-
397 regulated transcripts (Fig. S2B). Subcategories of metabolism related to amino acid,
398 nitrogen/ sulfur, C-compound/ carbohydrate, lipid/ fatty acid, purines, secondary, and

399 phosphate metabolisms were regulated under glucose deprivation stress, and all of them
400 showed a higher number of up- than down-regulated transcripts (Tables S1 and S2).
401 Other categories were also regulated in *Pb01* under glucose deprivation. The categories
402 associated with protein fate, cell cycle/ DNA processing, transcription, and cellular
403 transport were largely represented in the transcriptome (Fig. S2A). The number of
404 transcripts with increased or reduced expression was also investigated for these
405 categories and the results show that, in contrast to metabolism, the number of down-
406 regulated transcripts was generally higher than that of up-regulated transcripts for each
407 category (Fig. S2B). Down-regulated transcripts associated with cell cycle,
408 transcription, cell growth morphogenesis, and signal transduction could reflect the
409 reduced growth of this fungus submitted to glucose deprivation, as demonstrated in Fig.
410 2. The cellular transport process was also representative in our transcriptome analysis.
411 The abundance of specific transporters was elevated such as those of copper, hexoses,
412 and monosaccharides (Table S1 and S2) indicating that carbohydrate, amino acid and
413 metal-uptake processes are required for *Pb01* cells during glucose deprivation.

414 Thus, a large part of the transcription response to glucose deprivation in *Pb01* is
415 involved in an increase of transcripts levels of genes associated with metabolism and
416 reduction of those involved with core cellular processes.

417

418 **Proteomic analysis**

419 The proteomic approach was performed using NanoUPLC-MS^E as previously
420 described (MURAD & RECH, 2012; MURAD et al, 2011). This method has been
421 shown to improve protein and proteome coverage compared to the conventional LC-
422 MS/MS approach (MURAD et al, 2011). The resulting NanoUPLC-MS^E protein and
423 peptide data generated by PLGS process are shown in Fig. S3, S4, and S5. First, the

424 false positive rates of proteins from control and glucose deprivation data were 0.34 and
425 0.27%, respectively. The experiments resulted in 3,327 and 3,842 identified peptides,
426 where 45 and 57% of these were obtained from peptide match type data in the first pass,
427 and 19 and 14% from the second pass (LI et al, 2009) to control and glucose deprivation
428 conditions, respectively (Fig. S3). A total of 17 and 14% of total peptides were
429 identified by a missed trypsin cleavage in control and glucose deprivation conditions,
430 respectively, whereas an in-source fragmentation rate of the same 4% was obtained for
431 both (Fig. S3). Fig. S4 shows the peptide parts per million error (ppm) indicating that
432 the majority, 94.8 and 95.7%, from identified peptides were detected with an error of
433 less than 15 ppm for control and glucose deprivation conditions, respectively. Fig. S5
434 depicts the results obtained from dynamic range detection indicating that a 3-log range
435 concentration and a good detection distribution of high and low molecular weights were
436 obtained for the both conditions.

437 From the 603 identified proteins, 421 proteins were regulated in *Pb01* yeast cells
438 under glucose deprivation. Exactly 20% of them (86 proteins) were represented by
439 miscellaneous and unclassified categories, and the remaining 80% (335 proteins) were
440 represented by classified biological categories. The biological processes and the
441 percentage of up- and down- regulated proteins in each classified category are shown in
442 Fig. S6.

443 The proteome analysis showed that proteins associated with metabolism were
444 also the most represented during 48 h of glucose deprivation in *Pb01*. (Fig. S6A). The
445 metabolism was represented by amino acid, nitrogen/ sulfur, C-compound/
446 carbohydrate, lipid/ fatty acid, purines, secondary, and phosphate metabolisms. All of
447 these subcategories showed more up- than down-regulated proteins (Tables S3 and S4).
448 Interestingly, the nitrogen/ sulfur metabolism was detected as up-regulated only at

449 protein level (Table S3). Other categories presented a high number of regulated proteins
450 such as translation, protein fate and energy. On the other hand, processes involved with
451 transcription, cellular transport, cell growth/ morphogenesis, and signal transduction
452 presented a lower number of regulated proteins in which the majority was down-
453 regulated (Fig. S6A and B).

454

455 **An overview of the *Paracoccidioides* (Pb01) responses to glucose deprivation**

456 The responses of the *Paracoccidioides*, Pb01, to glucose deprivation, as revealed
457 by transcriptome and proteomic analysis, are summarized in Fig. 3, which depicts the
458 metabolic and energy adaptation of the fungus to this stress. Pathways associated with
459 ethanol, acetyl-CoA, oxaloacetate, and consequently glucose production were induced.
460 Moreover, amino acid degradation supply precursors such as pyruvate, oxaloacetate,
461 succinate, and also acetyl-CoA for glucose production pathways (Fig. 3).

462 Specific enzymes related to ethanol production were up-regulated in the absence
463 of glucose. The ethanol molecule is supported by pyruvate that, in turn, is not involved
464 directly in oxaloacetate production because the pyruvate carboxylase (PYC) enzyme is
465 down-regulated (Fig. 3). Ethanol measurement was performed, and the results showed
466 that after up to 48 h under glucose deprivation, a significantly higher level of ethanol
467 was produced compared with control cells (Fig. 4). Regarding the acetyl-CoA molecule,
468 several enzymes associated with its production from pyruvate, *via* the acetaldehyde
469 precursor, and β -oxidation were also up-regulated. Once produced, acetyl-CoA may be
470 used by the glyoxylate shunt to generate glyoxylate and succinate molecules. This is
471 reinforced by fact that the TCA cycle enzyme isocitrate dehydrogenase is repressed, so
472 the acetyl-CoA pool should be consumed by the glyoxylate cycle. Additionally,

473 succinate can be converted in oxaloacetate by enzymes from the tricarboxylic acid cycle
474 (Fig. 3).

475 The oxaloacetate molecule is a key intermediate of gluconeogenesis. Once
476 produced, gluconeogenic enzymes convert it into glucose. We detected up-regulated
477 specific enzymes that support this suggestion in *Pb01* under glucose deprivation, such
478 as phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), fructose-1,6-biphosphatase (FBPase),
479 and phosphoglucomutase (PGM) (Fig. 3).

480

481 **A comparative analysis of the transcriptome and proteome of *Paracoccidioides*** 482 **under glucose deprivation**

483 To compare similar aspects between transcriptome and proteome data, we
484 sought the same transcripts and proteins detected by both analyses. The transcripts and
485 proteins identities (ID), from the *Paracoccidioides*, *Pb01*, database, were shown
486 including their levels of abundance (Tables 1, 2, 3, and 4). One hundred and ten
487 identities (IDs) were matched of which 57 and 32 of them presented the same
488 abundance profile, up- or down-regulated in both data, respectively (Fig. 5, Tables 1
489 and 2). In this way, approximately 80% of the matches showed the same pattern of
490 transcript and protein levels. On the other hand, the minority of IDs showed discrepancy
491 in their abundance. Several of the transcripts in these groups were decreased in
492 abundance, while the protein levels were increased and *vice - versa* (Fig. 5, Tables 3 and
493 4).

494 A comparative analysis including all transcripts and proteins for metabolism and
495 energy categories from RNAseq and NanoUPLC-MS^E analysis was also performed
496 (Fig. 6). Metabolism, which was the most regulated category in our data and energy are
497 considered essential categories for understanding the carbon flow used by *Pb01* during

498 glucose deprivation. The results show that the amino acid, carbohydrate/ C-compound,
499 and lipid metabolism were similarly regulated in both approaches, showing the
500 consistency with the suggested carbon flow in *Paracoccidioides*, *Pb01*, under glucose
501 deprivation (Figs. 3 and 6A). Amino acids and lipids are supposed to be intensively
502 degraded (Tables S1 and S3) suggesting the production of precursors during glucose
503 deprivation, which include acetyl-CoA, pyruvate, oxaloacetate and succinate.
504 Furthermore, the percentage of transcripts and proteins related to energy categories such
505 as glycolysis/ gluconeogenesis, electron transport/ membrane associated energy
506 conservation, and TCA cycle are also similar, in accordance with suggested responses
507 of *Pb01* to glucose deprivation (Fig. 6B). Thus, the induction of gluconeogenesis, β -
508 oxidation, part of TCA, and glyoxylate cycles was required to compensate for the
509 absence of glucose and depicts the rearrangement of pathways when a carbon source
510 condition is changed.

511

512 **Fungus-macrophage interaction**

513 We investigated the response to macrophages in *Paracoccidioides*, *Pb01*, under
514 glucose deprivation. We analyzed whether the fungus differentially expresses genes
515 involved in gluconeogenesis, glyoxylate cycle, and β -oxidation pathways after
516 internalization by the J744 A.1 macrophages. The relative expression analysis of
517 transcripts encoding fructose-1,6-biphosphatase, isocitrate lyase, and 3-ketoacyl CoA
518 thiolase was performed using qRT-PCR. Fig. 7A demonstrates that genes encoding
519 isocitrate lyase and 3-ketoacyl CoA thiolase were induced, suggesting a response of
520 *Paracoccidioides* to glucose deprivation in phagosomes. Furthermore, whether yeast
521 cells under glucose deprivation were more susceptible to macrophage killing than cells
522 growing in plentiful glucose was analyzed. Plating of recovered yeast cells by aspiration

523 of culture supernatant (non-internalized yeast cells) and from lysis of macrophages
524 (internalized yeast cells) was performed (Fig. 7B). The result showed that glucose
525 deprivation influenced in *Paracoccidioides*, *Pb01*, survival inside the macrophages, as
526 demonstrated in Fig. 7B. The number of cells recovered from culture supernatant was
527 not significantly different between control and glucose deprived cells.

528

529 **Discussion**

530

531 In the current study, the responses of *Paracoccidioides*, *Pb01*, to glucose
532 deprivation were described using both, high-throughput transcriptome and proteomic
533 analysis. *Pb01* yeast cells were able to adapt to glucose deprivation conditions. We
534 show that the fungus regulates pathways that lead to glucose production to compensate
535 for the effect of stress. The fungus regulates transcripts and proteins that are mainly
536 associated with gluconeogenesis and ethanol production *via* precursors from β -
537 oxidation, glyoxylate and tricarboxylic acid cycles. Our study presents a detailed
538 response of *Paracoccidioides* spp. facing glucose deprivation and contributes to
539 investigations of the importance of alternative carbon adaptation during fungus
540 pathogenesis.

541 Changes in the kinetics of expression of representatives of gluconeogenesis, the
542 glyoxylate cycle, and β -oxidation as well as the differential expression of isocitrate
543 lyase at the protein level could establish a better time-point for our transcriptional (6 h)
544 and proteomic (48 h) analysis, using RNAseq and NanoUPLC-MS^E, respectively (Fig.
545 1). The transcriptome and proteomic analysis demonstrated that general metabolism and
546 energy was the most represented regulated categories. Transcripts/ proteins classified in
547 energy and cell rescue, defense, and virulence categories were also induced in both

548 approaches although less representative than metabolism (Fig. S2 and S6). Categories
549 involved in the cell cycle, transcription, cellular transport, growth/morphogenesis, and
550 signal transduction were predominantly down-regulated at transcription and protein
551 levels. Although *Pb01* yeast cells displayed no significant difference in cell viability
552 until 72 h under glucose deprivation (data not shown), the yeast biomass was
553 significantly reduced in glucose deprivation (Fig. 2). In addition, the abundance of
554 specific transporters was elevated such as those related to copper, hexose, and
555 monosaccharide uptake, suggesting a nutrient limitation and a hostile environment as
556 detected in other fungi (HU et al, 2008).

557 *Paracoccidioides, Pb01*, presented a complex mechanism to respond to nutrient
558 deprivation. The fungus uses a carbon flow (Fig. 3) through classical biochemical
559 pathways such as glyoxylate cycle, β -oxidation, and gluconeogenesis which is in
560 accordance with previous data on other fungi facing nutrient deprivation (BARELLE et
561 al, 2006; FAN et al, 2005; LORENZ et al, 2004). Fungi such as *C. albicans* and *C.*
562 *neoformans* appear to experience a nutrient limited and stressful environment in the
563 context of interaction with host cells. The elevated expression of the glyoxylate pathway
564 and gluconeogenesis genes during *Cryptococcus* interactions with host tissue and
565 phagocytic cells is similar to the regulation observed in *C. albicans*. These pathogenic
566 fungi present a niche dependent metabolism, with activation of an alternative carbon
567 source consuming process and the up-regulation of transcripts for enzymes of the
568 glyoxylate cycle, β -oxidation, and gluconeogenesis, (FAN et al, 2005; LORENZ et al,
569 2004) which was also detected in *Paracoccidioides, Pb01*. Our data suggest that *Pb01*
570 yeast cells facing glucose deprivation use the oxaloacetate molecule as a key
571 intermediate of gluconeogenesis. It is supported by β -oxidation and, in part, by
572 glyoxylate and TCA cycles activation. The glyoxylate cycle can allow the fungus to

573 assimilate two-carbon compounds, a relevant aspect to the viability and growth inside
574 macrophages (LORENZ & FINK, 2001; OLIVAS et al, 2008). Studies involving the
575 isocitrate lyase gene, representative of glyoxylate cycle, displayed that this gene is
576 important as a marker for gluconeogenic carbon source utilization and starvation rather
577 than a marker for lipid metabolism (BROCK, 2009; OTZEN et al, 2013). Despite
578 induction of isocitrate lyase and genes required for fatty acid utilization especially after
579 phagocytosis by macrophages (LORENZ et al, 2004), this induction may derive from a
580 general stress response due to nutrient or glucose limitation rather than a specific
581 induction from fatty acid utilization (OTZEN et al, 2013). In fact, null mutants to
582 isocitrate lyase in *C. albicans*, *A. fumigatus* and *C. neoformans* and for β -oxidation
583 genes in *C. albicans* revealed no virulence defects, showing that fatty acids do not
584 provide an essential nutrient source during infection (OTZEN et al, 2013; PIEKARSKA
585 et al, 2008; RAMIREZ & LORENZ, 2007; RUDE et al, 2002; SCHOBEL et al, 2007).
586 In addition, isocitrate lyase activity increased when *C. albicans* was submitted to carbon
587 starvation or other carbon sources such as acetate, glutamate and peptone as solely
588 carbon source (BROCK, 2009) reinforcing its importance as a marker for gluconeogenic
589 carbon source utilization and starvation. Then, the global characterization of the
590 responses of *Pb01* to glucose deprivation becomes relevant in this context especially by
591 flow of carbon used by the fungus during this stress.

592 The same transcripts and proteins detected by both analyses were identified
593 (Tables 1, 2, 3 and 4). Approximately 80% of the matches (a total of 110) showed the
594 same pattern of transcript and protein levels (Fig. 5). In this way, we believe that the
595 transcriptional and proteome time-points were enough to characterize the global
596 responses of the *Paracoccidioides* to glucose deprivation conditions. Similarly to
597 previous study in *A. fumigatus*, few times transcripts and proteins do not follow the

598 same trend of expression that could be explained, for example, by mRNA stabilization
599 process or by active post-transcriptional and translational regulatory mechanisms
600 (BARKER et al, 2012). In our data, in many metabolic aspects, transcripts and protein
601 levels were correlated. The identities to amino acid degradation, β -oxidation and ethanol
602 synthesis were increased in expression while those involved in pyruvate, fatty acid
603 synthesis and tricarboxylic acid cycles were down-regulated (Table 1 and 2). The results
604 corroborates our hypothesis of a well establish response to glucose poor environments
605 (Fig. 3). The pyruvate-acetyl-CoA conversion, for example, is diminished by repression
606 of pyruvate dehydrogenase enzyme. In addition, pyruvate carboxylase is repressed so
607 pyruvate is not been conversed in oxaloacetate. These observations strongly suggest that
608 the available pyruvate would end up in ethanol *via* acetaldehyde (Fig. 3). Moreover, the
609 isocitrate dehydrogenase enzyme was also down-regulated in both data (Table 2). The
610 activities of isocitrate dehydrogenase and isocitrate lyase enzymes, regulate the flow of
611 isocitrate into either the tricarboxylic acid cycle or the glyoxylate cycle (DEXTER &
612 GUNAWARDENA, 2013; GARNAK & REEVES, 1979). Here, while the isocitrate
613 dehydrogenase is down, the isocitrate lyase is up-regulated, in accordance with
614 suggested carbon flow in *Pb01* through glyoxylate shunt. As the same importance, the
615 phosphoenolpyruvate carboxykinase expression confirms that gluconeogenesis process
616 is ongoing (Table 3).

617 In addition, comparison of regulated molecules in transcriptome and proteome
618 data with focus in metabolism and energy categories can support the use of alternative
619 carbon sources by *Pb01* in glucose deprivation (Fig. 6). Metabolism of amino acids,
620 lipids, and carbohydrate/ C-compound was the most regulated in both used approaches
621 (Fig. 6A). The amino acids and lipids likely are been used as precursors to important
622 molecules involved in alternative carbon metabolism in *Pb01* as depicted in Fig. 3. In

623 fact, *Paracoccidioides* spp. can use a relatively wide range of amino acids and peptides
624 rather than carbohydrates (DESJARDINS et al, 2011). In addition to the structural
625 importance of lipids, these molecules provide an energy-rich nutrient source. β -
626 oxidation is a common pathway for the utilization of fatty acids (POIRIER et al, 2006)
627 in which of the 3-ketoacyl-CoA thiolases enzymes are important (OTZEN et al, 2013).
628 Recent studies have highlighted the relevance of the β -oxidation in response to nutrient
629 or glucose limitation rather than a specific induction from fatty acid utilization. In fact,
630 fatty acids do not provide an essential nutrient source during infection in *C. albicans* but
631 is important for coupling the glyoxylate cycle and fatty acid β -oxidation during host-
632 pathogen interactions regulating responses related to carbon starvation (BROCK, 2009;
633 OTZEN et al, 2013). Here, the induction of β -oxidation pathway in *Pb01* likely reflects
634 the requirement of this metabolic pathway for glucose deprivation adaptation, which is
635 consistent with previous data in *C. albicans* submitted to a poor-nutrition environment
636 (LORENZ et al, 2004). Regarding energy producing pathways, the gluconeogenesis,
637 tricarboxylic acid and glyoxylate cycles are well represented, which reinforces our
638 model of adaptation to glucose deprivation conditions (Fig. 6B). Moreover, the electron
639 transport and ethanol subcategories were also shown. Ethanol metabolism was
640 previously described in *Pb01* showing evidence for a more anaerobic metabolism of this
641 fungus compared with other isolates of *Paracoccidioides* (FELIPE et al, 2005;
642 PIGOSSO et al, 2013; REZENDE et al, 2011), and this metabolite has also been
643 described as relevant to pathogenic fungi such as *A. fumigatus* (BARKER et al, 2012;
644 GRAHL et al, 2011; TEUTSCHBEIN et al, 2010).

645 The responses of *Pb01* to macrophage infection shows that the fungus most
646 likely faces glucose starvation in macrophages, because a higher expression of genes
647 encoding fructose-1,6-biphosphatase, isocitrate lyase, and 3-ketoacyl-CoA thiolase was

648 detected. In fact, in terms of usable nutrients, the phagosome has been reported to not
649 have a rich environment evidenced by the unsubstantial quantities of glucose, other
650 sugars, and amino acids (COONEY & KLEIN, 2008; FAN et al, 2005; LORENZ et al,
651 2004; SILVA et al, 2008; TAVARES et al, 2007). Here, we showed that *Pb01* yeast
652 cells were more susceptible to macrophage killing when were previously deprived of
653 glucose. In this context, the expression of the *C. neoformans* antiphagocytic protein 1,
654 App1, is dependent of glucose availability and a critical component of fungus virulence
655 (WILLIAMS & DEL POETA, 2011).

656 Taken together, our data suggest that *Pb01* changes its metabolism under
657 glucose deprivation. This fungus reprograms several biological processes to facilitate its
658 maintenance under this condition; these programs are mainly related to
659 gluconeogenesis, β -oxidation, and the glyoxylate cycle to compensate for the poor
660 glucose environment. Considering a new perspective, the transcriptome and proteome
661 data could reinforce the responses of this fungus, which is able to survive in the hostile
662 environment during macrophage infection. This study may elucidate potential
663 molecules involved in host-fungus interactions, an important factor related to
664 pathogenic organisms.

665

666 **Acknowledgments**

667 This work at Universidade Federal de Goiás was supported by grants from
668 CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, FAPEG,
669 Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás, CAPES, Coordenação de
670 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior and PRONEX, Programa de Apoio a
671 Núcleos de Excelência. PSL was supported by a fellowship from CAPES.

672

673 **Competing interests**

674 The authors have declared that no competing interests exist.

675

676 **Author's Contributions**

677 Conceived and designed the experiments: CMAS. Performed the experiments:

678 PSL and LC. Analyzed the data: PSL, AMB, ATRV, GRF, CMAS. Contributed

679 reagents/materials/ analysis tools: CMAS. Wrote the paper: CMAS, PSL.

680

681 **Tables**

682

683

684

685

686

687

688

689

690

691

692

693

694

695

696

697

Table 1. Up-regulated proteins and transcripts of *Paracoccidioides (Pb01)* yeast cells under glucose deprivation detected by NanoUPLC-MS^E and RNAseq analysis.

ID ^a	Annotation ^b	Fold change (proteome) ^c	Fold change (transcriptome) ^d	Biological process ^e
METABOLISM				
Amino acid metabolism				
PAAG_08164	homogentisate 1.2-dioxygenase	1.00	0.60	tyrosine degradation
PAAG_05253	delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	0.87	1.26	glutamate degradation
PAAG_00966	L-threonine 3-dehydrogenase	0.74	1.20	threonine degradation
PAAG_08162	maleylacetoacetate isomerase	#	1.35	phenylalanine degradation
PAAG_08649	cysteine dioxygenase	#	1.15	cysteine degradation
PAAG_06416	alanine racemase family protein	#	0.69	D- alanine biosynthetic process
PAAG_01969	arginase	#	0.95	glutamate biosynthesis
PAAG_01365	choline dehydrogenase	#	1.64	glycine biosynthesis
PAAG_07317	PENR2 protein	#	0.97	methionine biosynthesis
Nitrogen and sulfur metabolism				
PAAG_03333	formamidase	2.05	4.39	nitrogen metabolism
C-compound and carbohydrate metabolism				
PAAG_06953	short chain dehydrogenase/reductase family	2.96	0.60	Carbohydrate metabolism_sugar epimerase family
PAAG_02162	lactam utilization protein LamB	#	2.54	C-compound and carbohydrate metabolism
PAAG_02653	acetyl-coenzyme A synthetase	#	1.67	C-compound and carbohydrate metabolism
PAAG_03765	NADP-dependent glycerol dehydrogenase	#	2.53	sugar, glucoside, polyol and carboxylate catabolism

PAAG_05416	NADP-dependent leukotriene B4 12-hydroxydehydrogenase	#	2.43	C-compound and carbohydrate metabolism
Lipid, fatty acid and isoprenoid metabolism				
PAAG_02664	3-ketoacyl-CoA thiolase	1.15	1.77	lipid and fatty acid metabolism_beta oxidation
PAAG_05249	aldehyde dehydrogenase	2.45	2.42	lipid and fatty acid metabolism_oxidation
PAAG_02163	acetyl-/propionyl-coenzyme A carboxylase alpha chain	3.03	2.09	lipid metabolism
PAAG_04142	NAD-dependent 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase	#	0.61	lipid metabolism
PAAG_01928	peroxisomal dehydratase	#	1.93	lipid, fatty acid and isoprenoid metabolism
Purin nucleotide/ nucleoside/ nucleobase metabolism				
PAAG_02633	ribose-phosphate pyrophosphokinase	#	0.63	nucleotide biosynthesis
PAAG_04974	adenylosuccinate lyase	#	0.92	purine biosynthesis
PAAG_09072	mitochondrial nuclease	#	0.60	polynucleotide degradation
Secondary metabolism				
PAAG_02336	nudix hydrolase	1.27	1.07	metabolism of vitamins, cofactors, and prosthetic groups
PAAG_08856	nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase	#	1.20	biosynthesis of vitamins, cofactors, and prosthetic groups
PAAG_00851	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase	#	0.72	biosynthesis of riboflavin
ENERGY				
Glycolysis and gluconeogenesis				
PAAG_01995	fructose-bisphosphate aldolase	1.30	1.28	glycolysis and gluconeogenesis
Tricarboxylic-acid pathway				
PAAG_04597	malate dehydrogenase	#	0.66	TCA cycle

Electron transport and membrane-associated energy conservation					
	PAAG_03599	formate dehydrogenase	#	0.89	electron transport
Ethanol production					
	PAAG_00403	alcohol dehydrogenase	1.83	3.92	alcohol fermentation
	PAAG_02050	pyruvate decarboxylase	1.30	0.79	alcohol fermentation
	PAAG_04541	alcohol dehydrogenase	0.97	2.77	alcohol fermentation
	PAAG_02512	pyruvate decarboxylase	#	1.33	alcohol fermentation
	PAAG_08248	alcohol dehydrogenase	#	0.98	alcohol fermentation
CELL CYCLE AND DNA PROCESSING					
	PAAG_00126	histone H4.2	#	0.87	DNA processing
TRANSCRIPTION					
	PAAG_06250	nuclear cap-binding protein	#	0.67	mRNA processing
	PAAG_02255	mRNA decapping hydrolase	#	0.59	mRNA processing
BINDING					
	PAAG_07038	APAF1-interacting protein	#	1.24	metal binding
SIGNAL TRANSDUCTION					
	PAAG_02377	rho GDP-dissociation inhibitor	#	0.92	regulator of G-protein signalling
CELL RESCUE, DEFENSE AND VIRULENCE					
	PAAG_02926	superoxide dismutase	#	2.49	detoxification
	PAAG_08277	nitroreductase family protein	#	1.30	detoxification
	PAAG_03502	cytochrome c peroxidase	#	3.03	oxidative stress response

PAAG_02548	hydroxyacylglutathione hydrolase	#	1.03	glutathione biosynthetic process/ stress response
PROTEIN FATE				
PAAG_02155	peroxisomal targeting signal 2 receptor (PTS2)	#	0.67	protein fate
PAAG_00768	peptidase family protein	#	0.97	proteolysis
CELL GROWTH/ MORPHOGENESIS				
PAAG_03624	Arp2/3 complex subunit Arc16	#	2.46	cell growth/morphogenesis
MISCELLANEOUS				
PAAG_06955	thiol methyltransferase	#	0.94	thiol methyltransferase activity
UNCLASSIFIED				
PAAG_00340	conserved hypothetical protein	1.96	0.96	-
PAAG_06083	dienelactone hydrolase family protein	1.40	3.34	-
PAAG_00297	conserved hypothetical protein	1.37	1.19	-
PAAG_01075	conserved hypothetical protein	#	0.79	-
PAAG_01254	predicted protein	#	1.24	-
PAAG_01399	NAD dependent epimerase/dehydratase family protein	#	1.21	-
PAAG_01455	hypothetical protein	#	3.07	-
PAAG_02985	hypothetical protein	#	1.24	-
PAAG_03092	hypothetical protein	#	0.60	-
PAAG_05856	conserved hypothetical protein	#	1.21	-

^a Identification of **the same** proteins and transcripts which were regulated in both analysis, proteome and transcriptome from *Paracoccidioides* genome database (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html);

- ^b Proteins and transcripts annotations from *Paracoccidioides* genome database or by homology in NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>);
- ^c Protein expression profiles in log₂ (fold change) obtained from ProteinLynx Global Server (PLGS) analysis normalized with internal standard. #: identified only in control condition.
- ^d Transcript expression profiles in log₂ (fold change) obtained from fold change selection method for differentially expressed transcripts using a Fisher exact test with a p-value of 0.001.
- ^e Biological process of differentially expressed transcripts and proteins from MIPS (http://pedant.helmholtz-muenchen.de/pedant3htmlview/pedant3view?Method=analysis&Db=p3_r48325_Par_brazi_Pb01) and Uniprot database (<http://www.uniprot.org/>).

Table 2. Down-regulated proteins and transcripts of *Paracoccidioides (Pb01)* yeast cells under glucose deprivation detected by NanoUPLC-MS^E and RNAseq analysis.

ID^a	Annotation^b	Fold change (proteome)^c	Fold change (transcriptome)^d	Biological process^e
METABOLISM				
Amino acid metabolism				
PAAG_02603	aspartate aminotransferase	-0.88	-0.89	aspartate biosynthesis
PAAG_07102	pentafunctional AROM polypeptide	*	-1.83	aromatic group biosynthesis
PAAG_05929	sulfate adenylyltransferase	*	-2.74	cysteine and methionine biosynthesis
PAAG_07813	cysteine synthase	*	-1.34	cysteine biosynthesis
PAAG_05328	3-isopropylmalate dehydrogenase A	*	-1.54	leucine biosynthesis
PAAG_03043	adenylyl-sulfate kinase	*	-0.89	methionine biosynthesis
C-compound and carbohydrate metabolism				
PAAG_00545	glycogen phosphorylase	-1.47	-1.68	carbohydrate metabolism
PAAG_02769	pyruvate dehydrogenase protein X component	*	-0.94	carbohydrate metabolism
Lipid, fatty acid and isoprenoid metabolism				
PAAG_01524	fatty acid synthase subunit beta dehydratase	*	-0.88	lipid and fatty acid biosynthesis
Purin nucleotide/ nucleoside/ nucleobase metabolism				
PAAG_06906	adenine phosphoribosyltransferase	*	-1.24	purin nucleotide/nucleoside/nucleobase metabolism
ENERGY				
Glycolysis and gluconeogenesis				
PAAG_00726	pyruvate carboxylase	-0.81	-1.63	pyruvate metabolism

Tricarboxylic-acid pathway					
PAAG_01463	succinyl-CoA ligase subunit beta	-1.92	-0.69		TCA cycle
PAAG_00856	isocitrate dehydrogenase subunit 1	-0.95	-0.75		TCA cycle
PAAG_07729	isocitrate dehydrogenase subunit 2	-1.00	-0.61		TCA cycle
Electron transport and membrane-associated energy conservation					
PAAG_00953	NADH-cytochrome b5 reductase	-0.59	-1.06		electron transport
Pentose Phosphate pathway					
PAAG_00633	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	*	-0.60		pentose-phosphate pathway
CELL CYCLE AND DNA PROCESSING					
PAAG_00106	histone acetyltransferase type B catalytic subunit	*	-0.72		DNA repair
TRANSCRIPTION					
PAAG_07957	pre-mRNA-splicing factor srp1	-1.50	-0.59		splicing
TRANSLATION and RIBOSSOME BIOGENESIS					
PAAG_00815	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	*	-0.68		translation
CELL RESCUE, DEFENSE AND VIRULENCE					
PAAG_03216	mitochondrial peroxiredoxin PRX1	*	-3.50		oxidative stress response
PAAG_01465	carbonic anhydrase	*	-3.66		stress oxidative response/ carbon utilization
PROTEIN FATE					
PAAG_04327	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	*	-0.95		protein deubiquitination
PAAG_03834	vacuolar sorting-associated protein	*	-0.68		protein sorting in cell division
TRANSPORT					

PAAG_04904	ATP-binding cassette sub-family F member 2	*	-0.78	ABC transport
UNCLASSIFIED				
PAAG_03152	CobW domain-containing protein	-1.31	-1.55	-
PAAG_07772	conserved hypothetical protein	-0.69	-1.70	-
PAAG_08103	EF hand domain-containing protein	*	-1.00	-
PAAG_00251	hypothetical protein	*	-2.70	-
PAAG_04793	LEA domain-containing protein	*	-1.76	-
PAAG_05037	HHE domain-containing protein	*	-6.18	-
PAAG_05181	conserved leucine-rich repeat protein	*	-1.70	-
PAAG_06914	conserved hypothetical protein	*	-0.77	-

^a Identification of **the same** proteins and transcripts which were regulated in both analysis, proteome and transcriptome from *Paracoccidioides* genome database (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html);

^b Proteins and transcripts annotations from *Paracoccidioides* genome database or by homology in NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>);

^c Protein expression profiles in log₂ (fold change) obtained from ProteinLynx Global Server (PLGS) analysis normalized with internal standard. *: identified only in control condition.

^d Transcript expression profiles in log₂ (fold change) obtained from fold change selection method for differentially expressed transcripts using a Fisher exact test with a p-value of 0.001.

^e Biological process of differentially expressed transcripts and proteins from MIPS

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

Table 3. Up- and down-regulated proteins and transcripts, respectively, of *Paracoccidioides (Pb01)* yeast cells under glucose deprivation detected by NanoUPLC-MS^E and RNAseq analysis.

ID^a	Annotation^b	Fold change (proteome)^c	Fold change (transcriptome)^d	Biological process^e
METABOLISM				
Amino acid metabolism				
PAAG_01568	glycine dehydrogenase	0.59	-0.70	glycine biosynthesis
PAAG_07998	glutamate synthase small chain	#	-1.54	glutamate biosynthesis
PAAG_02693	saccharopine dehydrogenase	#	-0.72	lysine biosynthesis
PAAG_02901	S-adenosylmethionine synthetase	#	-1.38	L-methionine biosynthesis
ENERGY				
Glycolysis and gluconeogenesis				
PAAG_08203	phosphoenolpyruvate carboxykinase	1.30	-0.63	gluconeogenesis
CELL CYCLE AND DNA PROCESSING				
PAAG_07608	DNA helicase	#	-0.77	DNA repair
TRANSCRIPTION				
PAAG_05609	C2H2 type zinc finger domain-containing protein	#	-0.79	transcriptional control
PAAG_05397	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB1	#	-0.83	rRNA synthesis
PROTEIN FATE				
PAAG_05583	cysteine protease PalB	#	-0.61	proteolysis
PAAG_04555	sarcosine oxidase	#	-1.20	protein modification
TRANSPORT				

PAAG_03577	ABC drug exporter AtrF	#	-1.89	drug/ toxin transport
MISCELLANEOUS				
PAAG_03233	oxidoreductase	#	-1.15	oxidation-reduction process
UNCLASSIFIED				
PAAG_04812	predicted protein	#	-0.71	-
PAAG_02242	hypothetical protein	#	-1.77	-
PAAG_07989	conserved hypothetical protein	#	-0.65	-
PAAG_05277	conserved hypothetical protein	#	-0.70	-
PAAG_05766	conserved hypothetical protein	#	-0.61	-

^a Identification of **the same** proteins and transcripts which were regulated in both analysis, proteome and transcriptome from *Paracoccidioides* genome database (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html);

^b Proteins and transcripts annotations from *Paracoccidioides* genome database or by homology in NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>);

^c Protein expression profiles in log₂ (fold change) obtained from ProteinLynx Global Server (PLGS) analysis normalized with internal standard. #: identified only in control condition.

^d Transcript expression profiles in log₂ (fold change) obtained from fold change selection method for differentially expressed transcripts using a Fisher exact test with a p-value of 0.001.

^e Biological process of differentially expressed transcripts and proteins from MIPS

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

Table 4. Down- and up-regulated proteins and transcripts, respectively, of *Paracoccidioides* (Pb01) yeast cells under glucose deprivation detected by NanoUPLC-MS^E and RNAseq analysis.

ID ^a	Annotation ^b	Fold change (proteome) ^c	Fold change (transcriptome) ^d	Biological process ^e
METABOLISM				
Lipid, fatty acid and isoprenoid metabolism				
PAAG_07013	enoyl-CoA hydratase/carnithine racemase	*	0.91	lipid, fatty acid and isoprenoid metabolism
TRANSCRIPTION				
PAAG_08234	transcription factor RfeF	*	0.76	transcription control
UNCLASSIFIED				
PAAG_00503	HAD-superfamily hydrolase	-0.78	1.41	-
PAAG_06624	predicted protein	*	1.41	-

^a Identification of **the same** proteins and transcripts which were regulated in both analysis, proteome and transcriptome from *Paracoccidioides* genome database (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html);

^b Proteins and transcripts annotations from *Paracoccidioides* genome database or by homology in NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>);

^c Protein expression profiles in log₂ (fold change) obtained from ProteinLynx Global Server (PLGS) analysis normalized with internal standard. *: identified only in control condition.

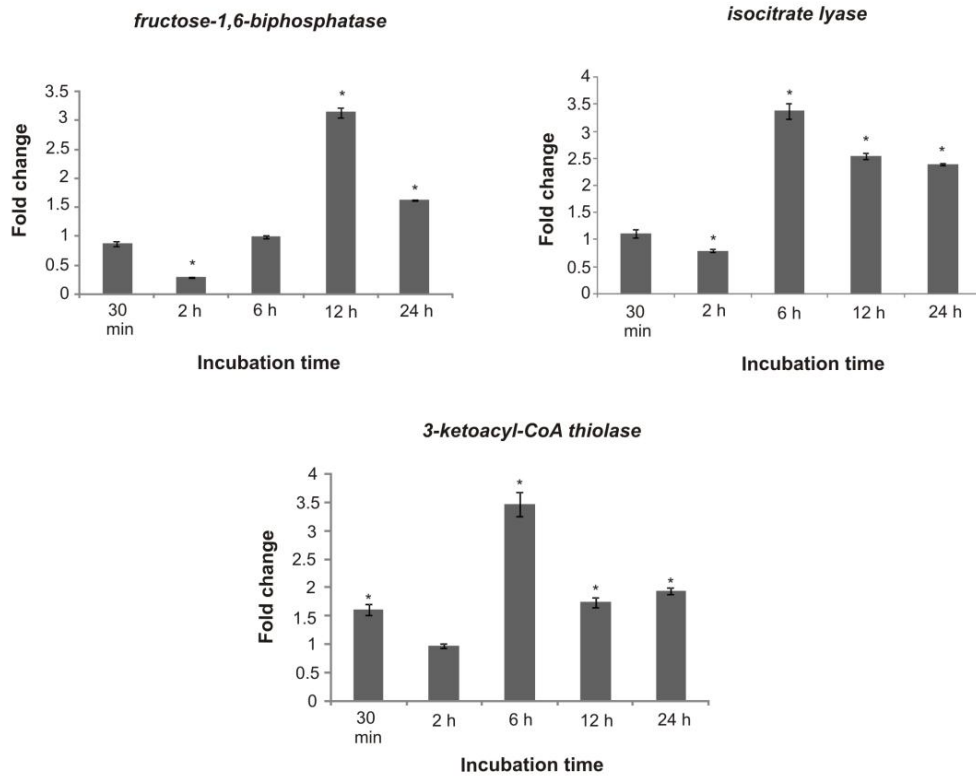
^d Transcript expression profiles in log₂ (fold change) obtained from fold change selection method for differentially expressed transcripts using a Fisher exact test with a p-value of 0.001.

^e Biological process of differentially expressed transcripts and proteins from MIPS

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

Figures

A



B

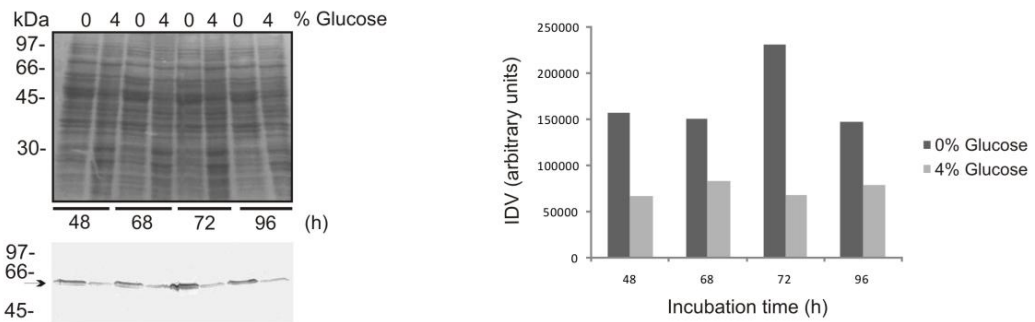


Figure 1. Effect of glucose deprivation in transcripts and protein expression in *Paracoccidioides* yeast cells. (A) The kinetics of *fructose-1,6-biphosphatase*, *isocitrate lyase* and *3-ketoacyl-CoA thiolase* gene expression in *Pb01* yeast cells grown in MMcM medium with 4% (control) or without glucose (0%) were analyzed. The cells were incubated at 36°C for several time intervals. The data were normalized using the constitutive gene encoding the 60S ribosomal L34 gene as the endogenous control and

are presented as relative expression in comparison to the experimental control cells value set at 1. Data are expressed as mean \pm standard deviation of the triplicates of independent experiments. *, significantly different from the control, at a P value of ≤ 0.05 . (B) Proteins (50 μ g) of *Pb01* yeast cells were incubated at 36°C using (4%) or (0%) glucose and the abundance of *PbIc1* was analyzed by western blotting. The proteins were fractionated by one-dimensional gel electrophoresis. The proteins were blotted onto a nitrocellulose membrane and the 63kDa protein species was detected by using the rabbit polyclonal antibody anti-*PbIc1*. Densitometric analysis of immunoblotting bands was performed using the software AphaEaseFC.

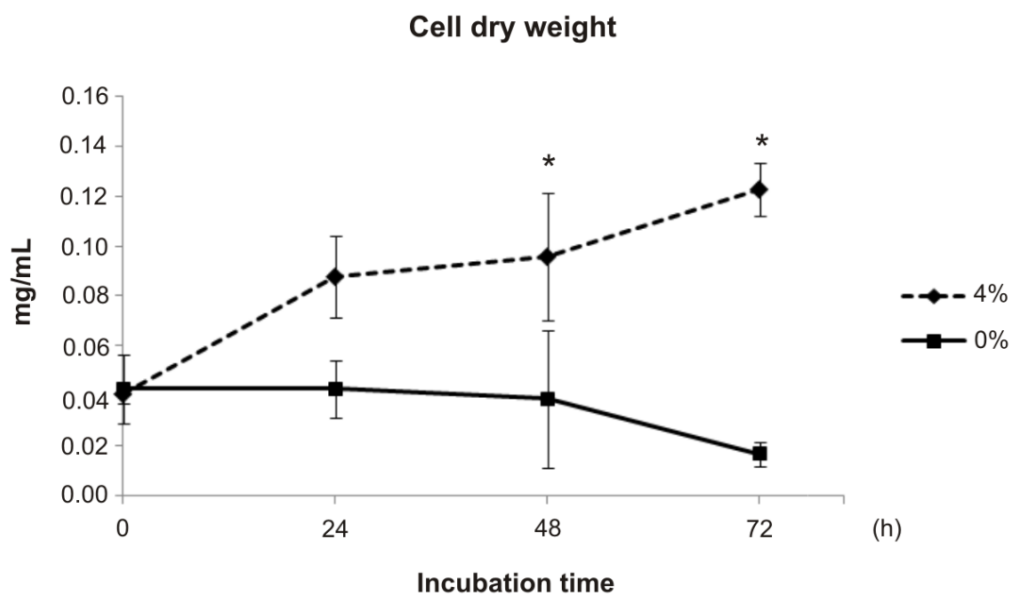


Figure 2. Growth of *Paracoccidioides* under glucose deprivation. A total of 5.10^7 *Paracoccidioides* yeast cells were incubated in minimal medium (MVM) with (4%) and without (0%) glucose up to 72 h. At time points 0, 24, 48 and 72 h cells were collected, killed by heat, and lyophilized to determine the cell dry weight. Data are expressed as mean \pm standard deviation of the triplicates of independent experiments. *, significantly different from the control, at a P value of ≤ 0.05 .

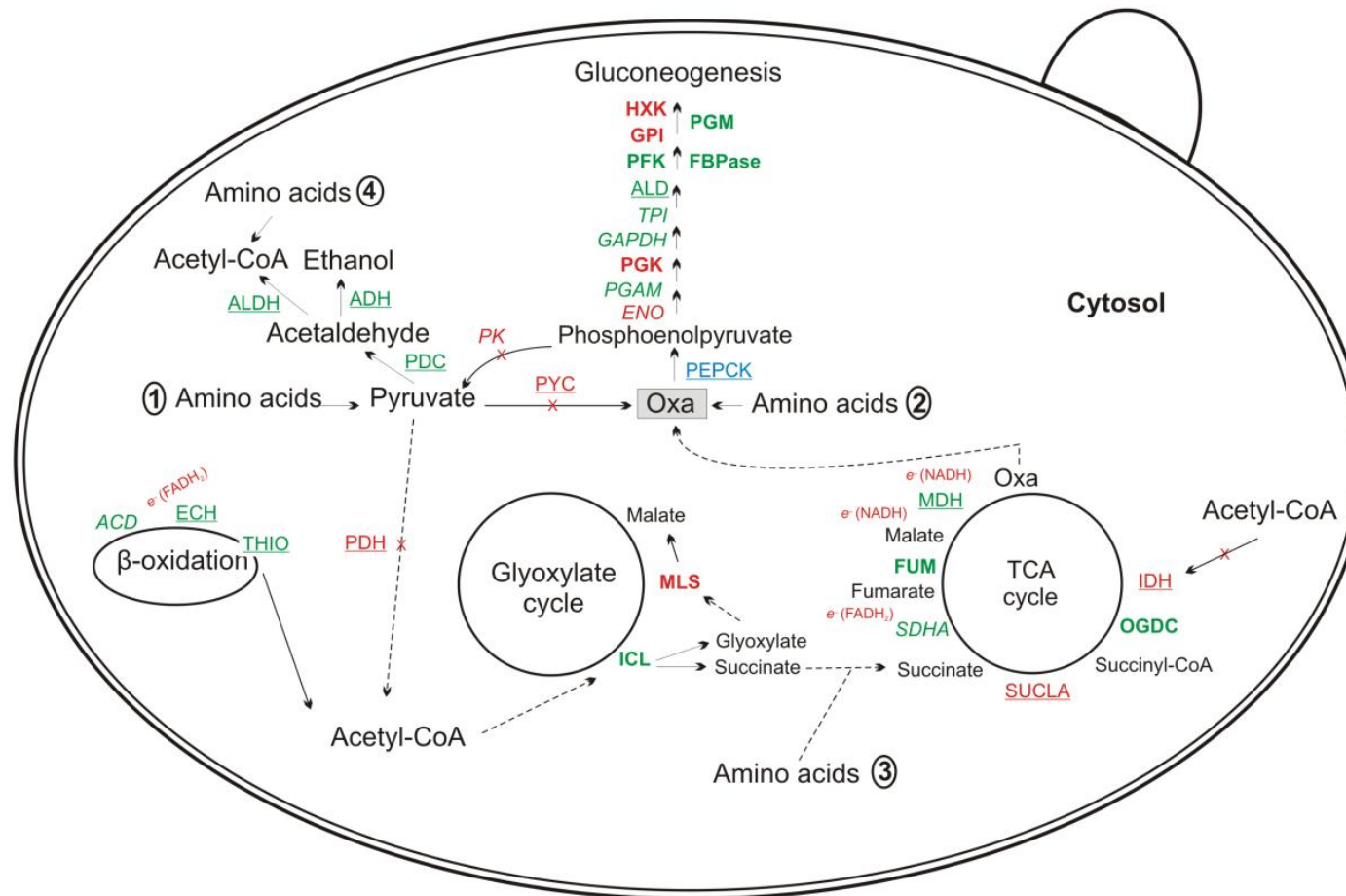


Figure 3. Overview of metabolic responses of *Paracoccidioides* to glucose deprivation. The figure summarizes the data from transcriptome and proteomic analyses and suggests the mechanism and the first flow of carbon used by this fungus to overcome the nutrient deprivation stress. GPH: glycogen phosphorylase; PGM: phosphoglucomutase; GPI: glucose-6-phosphate isomerase; HXK: hexokinase; FBPase: fructose-1,6-biphosphatase; ALD: fructose-bisphosphate aldolase; TPI: triosephosphate isomerase; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; PGK: phosphoglycerate kinase; PGAM: phosphoglyceratemutase; ENO: enolase; PEPCK: phosphoenolpyruvate carboxykinase; PYC: pyruvate

carboxylase; PK: pyruvate kinase; ICL: isocitrate lyase; MLS: malate synthase; IDH: isocitrate dehydrogenase; SUCLA: succinyl-CoA ligase; SDHA: succinate dehydrogenase; FUM: fumarate hydratase (fumarase); MDH: malate dehydrogenase; OGDC: 2-oxoglutarate dehydrogenase E1; PDC: pyruvate decarboxylase; ADH: alcohol dehydrogenase; ALDH: aldehyde dehydrogenase; ACD: acyl-CoA dehydrogenase; ECH: enoyl-CoA hydratase; THIO: 3-ketoacyl-CoA thiolase and PDH: pyruvate dehydrogenase. Enzymes were colored according to their differences in expression and and labelled to indicate if the data were obtained from transcriptome or proteomics. Italic, bold, and underlined labels indicate that the data were obtained from transcriptome, proteome, or both, respectively. Green or red colors indicate up- or down-regulated proteins, respectively. Blue color indicates down-regulated transcript and up-regulated protein. The numbers 1, 2, 3, and 4 indicate some up-regulated pathways for amino acids detected from transcriptome (italic), proteome (bold) or in both (underlined), indicated below, which can be involved in the production of the pyruvate, oxaloacetate, succinate, and acetyl-CoA, respectively. 1) pyruvate production: **tryptophan**, **alanine**, cysteine and **glycine**. 2) oxaloacetate production: phenylalanine, **glutamate** and tyrosine. 3) succinate production: threonine. 4) acetyl-CoA production: threonine, *tryptophan*, tyrosine and leucine. OXA: oxaloacetate; e^- : released electrons from enzymatic reaction.

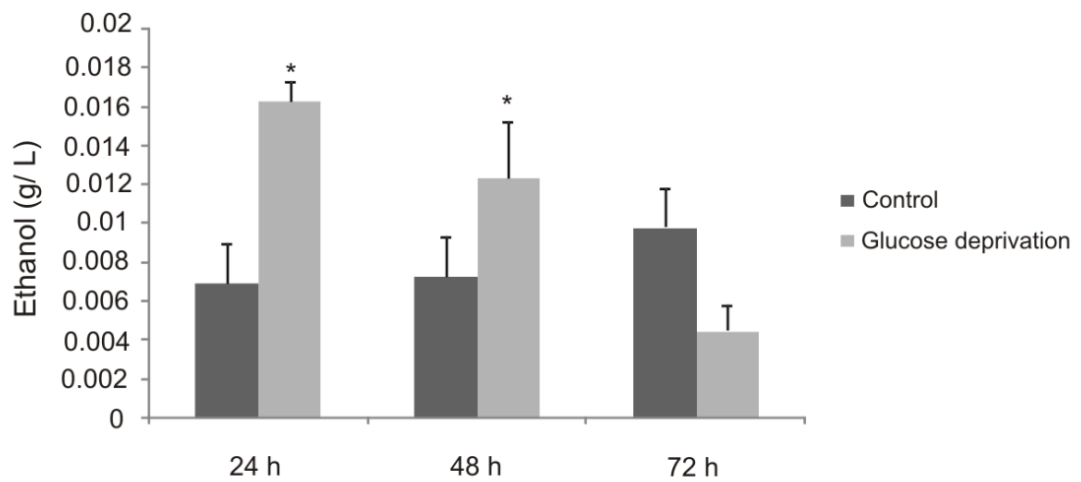


Figure 4. Ethanol detection in *Paracoccidioides Pb01* yeast cells under glucose deprivation. The concentration of ethanol (g/L) in *Paracoccidioides* yeast cells under or not (control) glucose deprivation was determined. A total of 10^8 cells was used for each sample and the ethanol compound was quantified using the enzymatic detection kit (UV-test for ethanol, RBiopharm, Darmstadt, Germany). Data are expressed as mean \pm standard deviation of the biological triplicates of independent experiments. Test t student was used. *, significantly different from the control, at a P value of ≤ 0.05 .

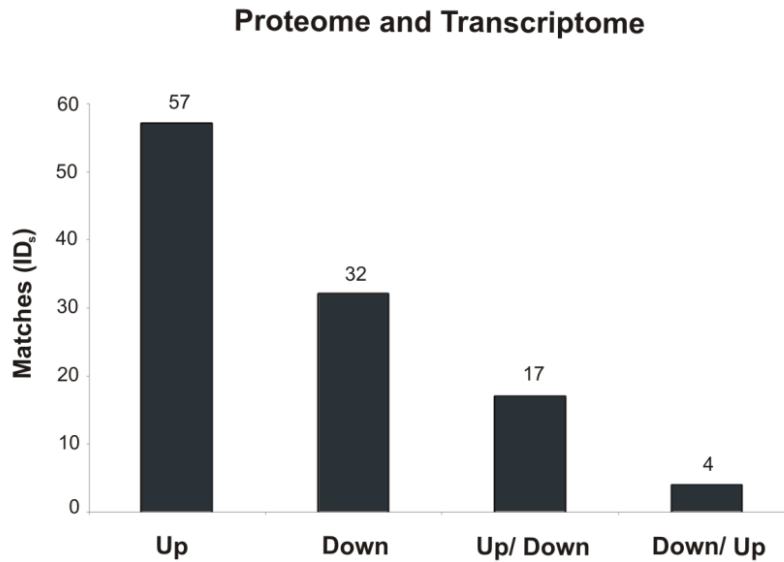


Figure 5. Number of proteins and transcripts in common from RNAseq and NanoUPLC-MS^E analysis. The number of the same proteins and transcripts matched from RNAseq and NanoUPLC-MS^E analysis is shown by IDs (identity from *Paracoccidioides*, Pb01, genome database). A total of 57 and 32 proteins and transcripts were up- and down-regulated in both analyses. The number of 17 IDs were up-regulated in proteome and down in transcriptome while a total of 4 IDs were down-regulated in proteome and up in transcriptome.

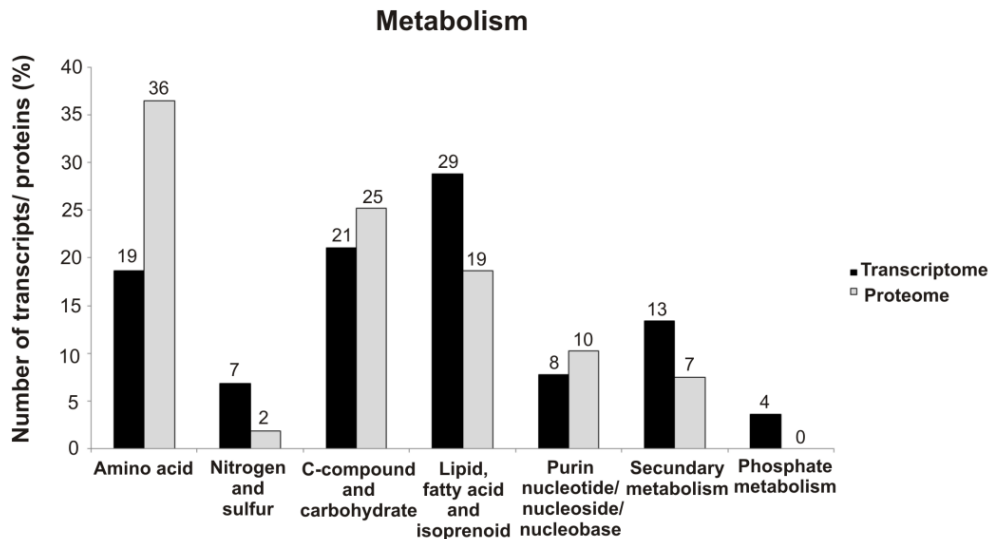
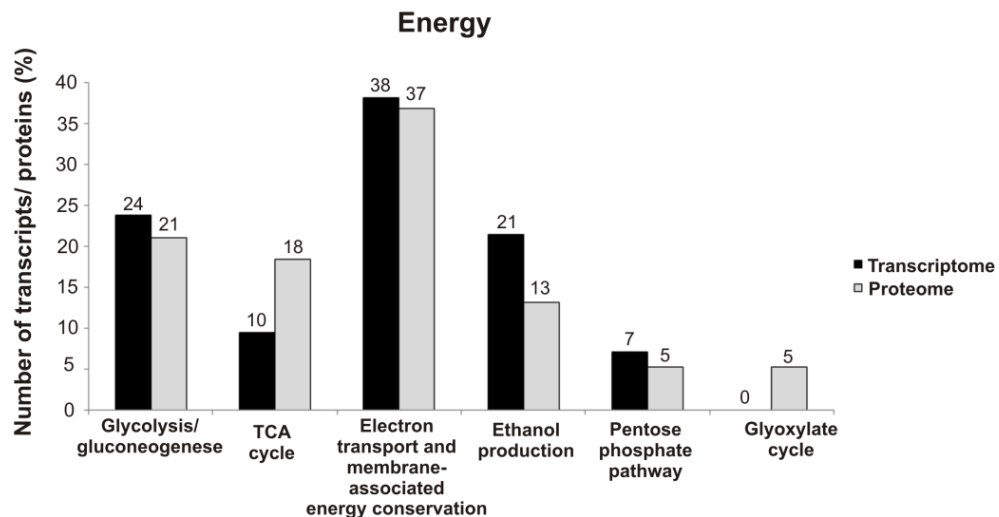
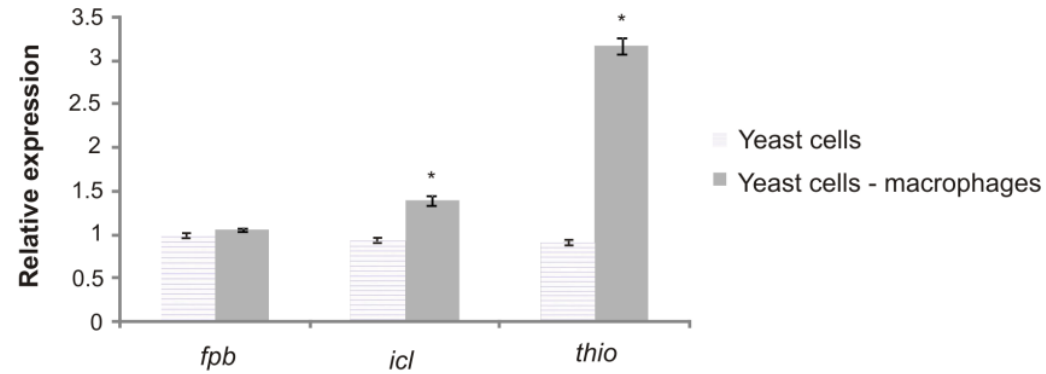
A**B**

Figure 6. Number of transcripts and proteins related to metabolism and energy subcategories regulated in *Paracoccidioides*, *Pb01*, under glucose deprivation. The number of transcripts and proteins, in percentage (%), regulated in *Paracoccidioides*, *Pb01*, under glucose deprivation was calculated based on number of transcripts/ proteins in each category shown in Figures S2 and S6, panels A. **(A)** Metabolism. The subcategories were represented by amino acid, nitrogen/ sulfur, C- compound and carbohydrates, lipid/ fatty acid, and isoprenoid, purin nucleotide/ nucleoside/ nucleobase, secondary and phosphate metabolisms. **(B)** Energy. The subcategories were represented by glycolysis/ gluconeogenesis, TCA cycle, electron transport and membrane associated energy, ethanol production, pentose phosphate pathway and glyoxylate cycle. Black and gray bars indicate genes and proteins, respectively.

A



B

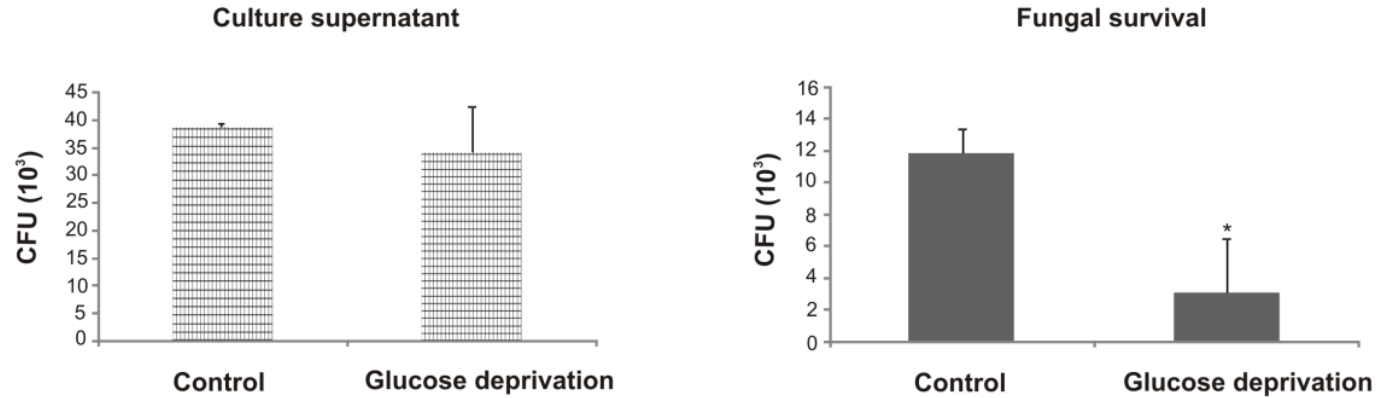


Figure 7. Kinetics of *Paracoccidioides fbp*, *icl* and *thio* expression and susceptibility of yeast cells to macrophages killing during infection. (A) *Pb01* yeast cells were grown without (yeast cells) and with macrophages (yeast cells-macrophages) for 24 h in RPMI medium, and the

relative expression of genes *fbp* (fructose-1,6-biphosphatase), *icl* (isocitratelase), and *thio* (3-ketoacyl-CoA thiolase) was determined. The data were normalized using the constitutive gene encoding the 60S ribosomal L34 gene as the endogenous control and are presented as relative expression in comparison to the experimental control cells value set at 1. **(B)** *Pb01* yeast cells were previously grown in MMcM medium with (4%), as control, or without (0%) of glucose up to 48 h and then were incubated with macrophages at a 1:2.5 macrophages: yeast ratio, for both conditions. As demonstrated, the number of viable cells was determined by quantifying the number of colony forming units/ mL (CFUs/ mL) during infection from culture supernatant (non internalized cells removed by aspiration prior to macrophages lysis) and after internalization. Data are expressed as mean \pm standard deviation of the biological triplicates of independent experiments. Test t student was used. *, significantly different from the control, at a P value of ≤ 0.05 .

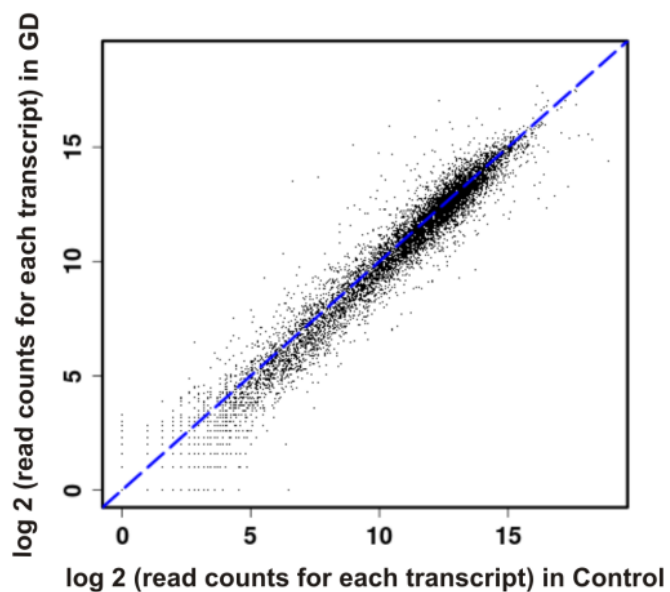
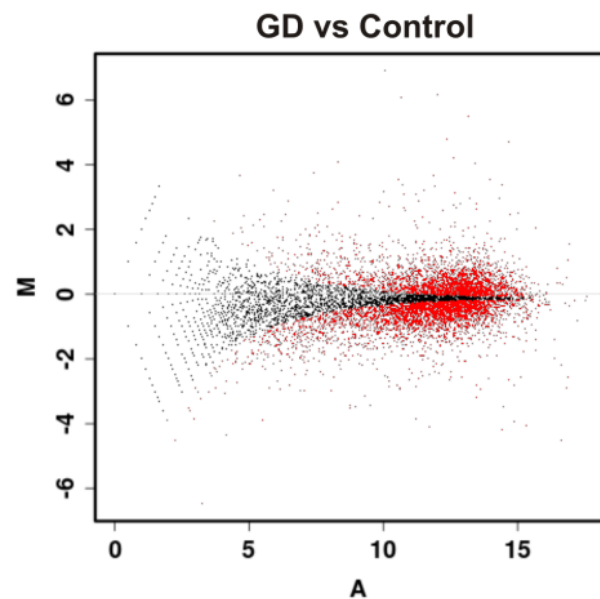
A**B**

Figure S1. Global analysis of RNAseq data. Mapped reads data were analyzed by DEGseq package and plotting graphs were obtained. The transcripts are represented by dots. **(A)** Scatter plot shows the number of reads (log₂) counts for each transcript in GD (glucose deprivation) and control conditions. **(B)** MA-plot of GD *versus* control conditions shows the intensity of expression of identified transcripts (log₂ of fold change) in the y axis [M] and the density of reads (log₂) in the x axis [A] mapped for each transcript. In addition, the graph shows the number of differentially expressed transcripts obtained from FET (Fisher Exact Test) using a P-value of 0.001 in red color.

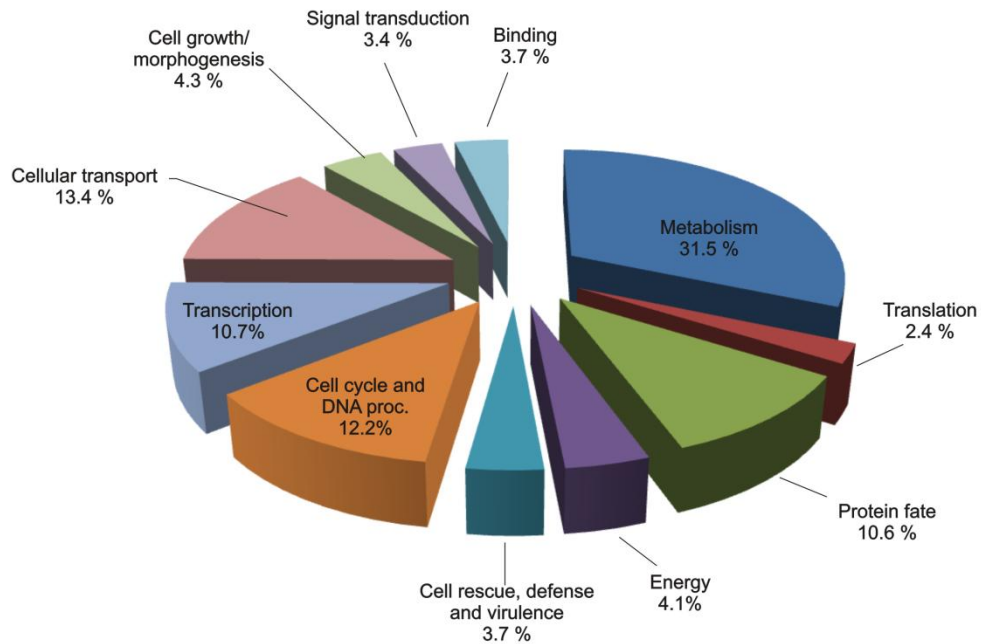
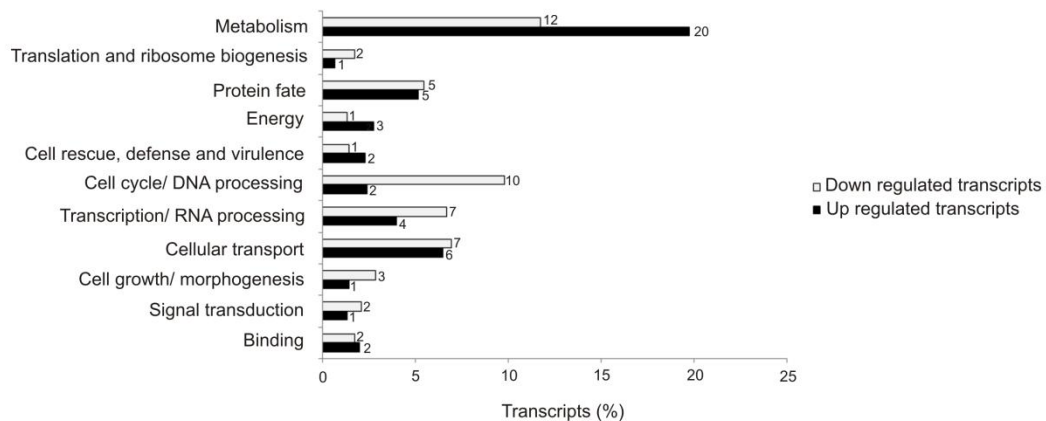
A**B**

Figure S2. Functional classification and abundance levels of transcripts regulated in *Paracoccidioides* under glucose deprivation obtained by RNAseq. (A) Biological processes of differentially expressed transcripts in *Paracoccidioides*, *Pb01*, under glucose deprivation are shown. The biological processes were obtained using the Pedant on [MIPS](http://pedant.helmholtz-muenchen.de/pedant3htmlview/pedant3view?Method=analysis&Db=p3_r48325_Parabradi_Pb01) (http://pedant.helmholtz-muenchen.de/pedant3htmlview/pedant3view?Method=analysis&Db=p3_r48325_Parabradi_Pb01) and Uniprot database (<http://www.uniprot.org/>). A total of 1049 transcripts are shown represented by the percentage (%) of regulated classified transcripts for each category. **(B)** The number of up and down-regulated transcripts in

Paracoccidioides, Pb01, under glucose deprivation stress is shown for each category depicted in (A). A total of 506 and 543 transcripts were up- and down-regulated and are depicted by light and dark gray colors bars, respectively. The percentages (%) show the number of up and down regulated transcripts for each category based on a total of them.

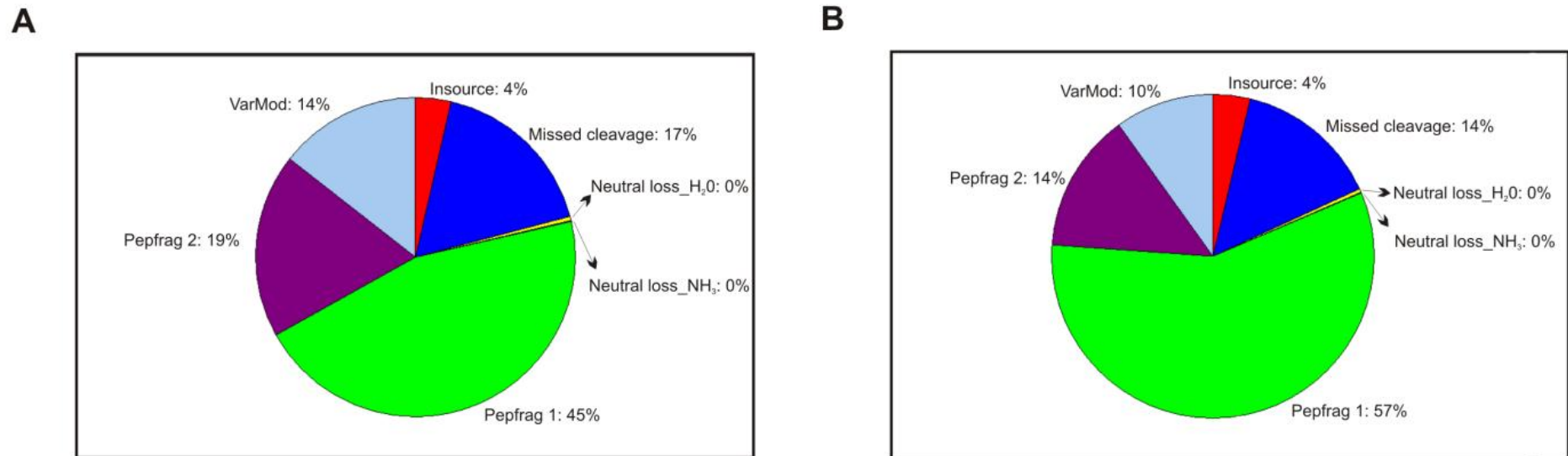


Figure S3. Peptide detection type to control and glucose deprivation samples. The pie graph show the percentage of peptides matched against the *Paracoccidioides* (Pb01) database by PLGS (PepFrag 1 and PepFrag 2), variables modifications (VarMod), fragmentation that occurred on ionization source (InSource), missed cleavage performed by trypsin (Missed Cleavage) and Neutral loss H₂O and NH₃ correspondent to water and ammonia precursor losses to control (A) and glucose deprivation (B) conditions. The SpotFire Decision Site 8.0 v program was used. The PepFrag parameters should be predominant, in contrast to insource and missed cleavage which should not reach 20%.

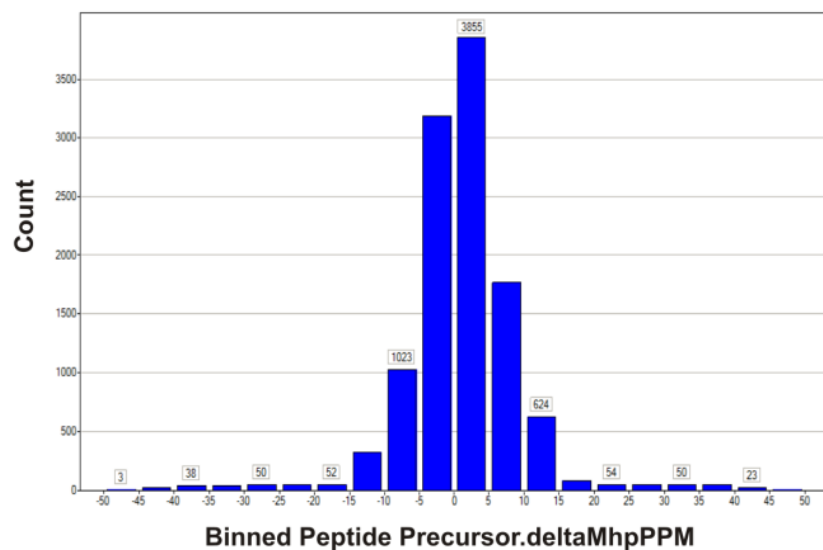
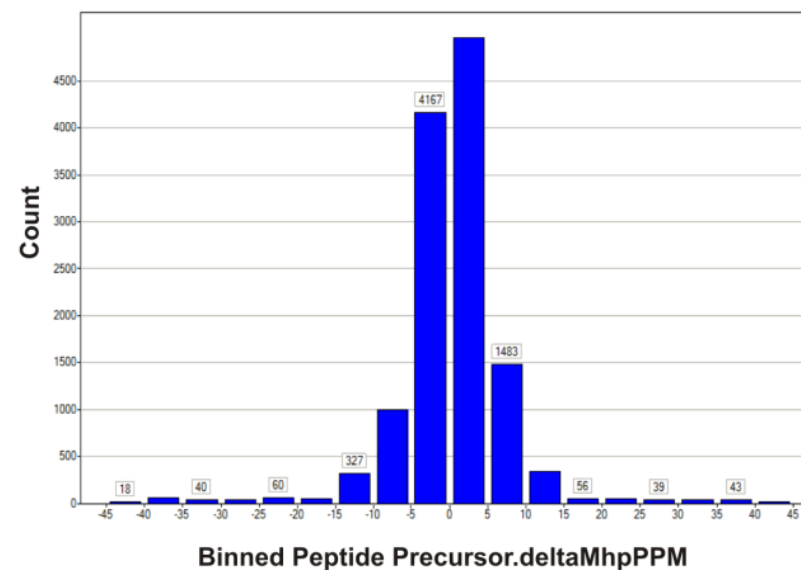
A**B**

Figure S4. Peptide mass accuracy analyses. Peptides data were used to make the bar graph showing the accuracy of mass for peptides in control and glucose deprivation samples. A total of 94.9 and 95.7% of identified peptides were detected in a 15 ppm error range in both samples, control (A) and glucose deprivation (B), respectively.

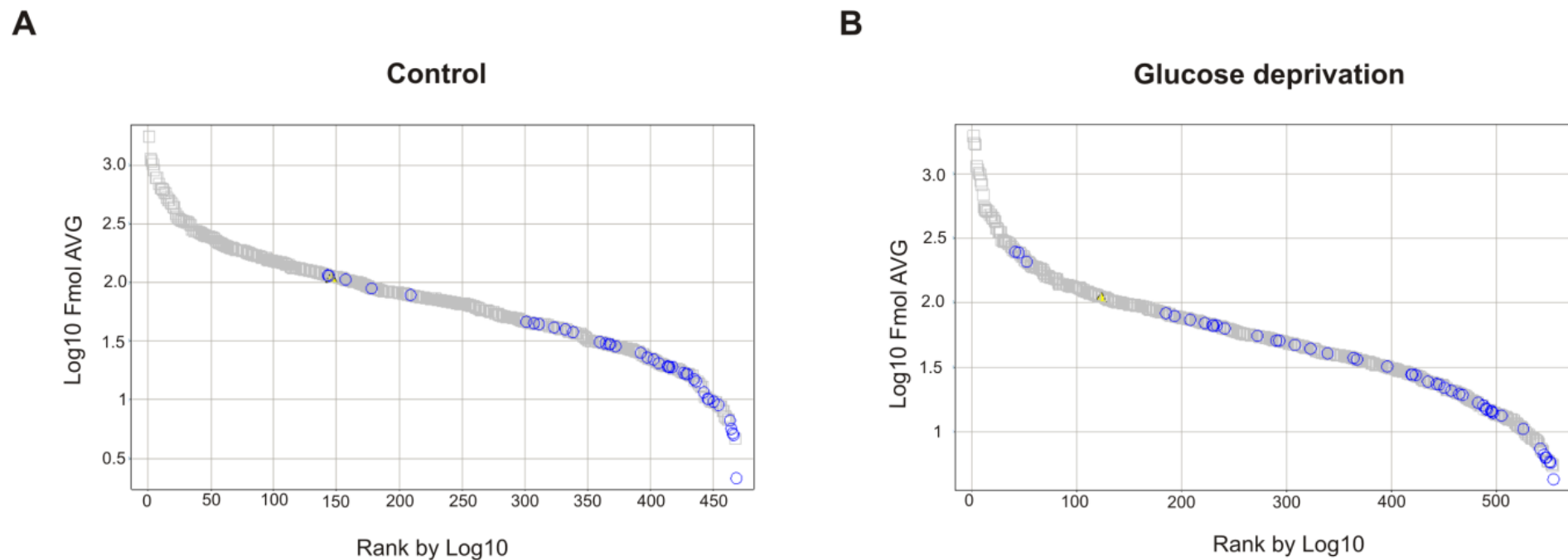
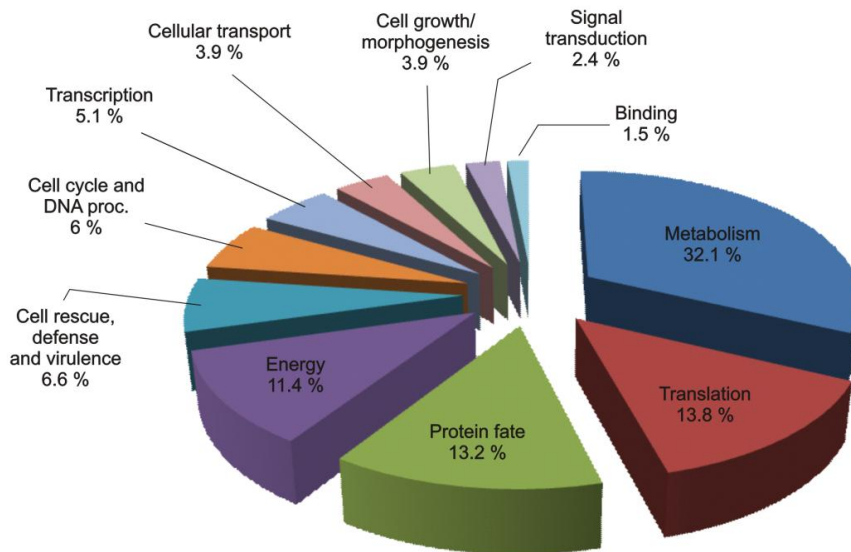


Figure S5. Detection of dynamic range of proteomic analysis. The dynamic range of proteomic experiment for each condition was performed. Graphs for control (**A**) and glucose deprivation (**B**) are shown. Regular, reverse, and standard proteins were indicated by gray/ square, blue/ circle and yellow/ triangle colors/ shape, respectively. The regular and reverse proteins indicate identified proteins using regular and reverse genomic database from *Paracoccidioides*, *Pb01*, respectively. The standard protein was used to normalize the expression data and compare the control and glucose deprivation proteins. Our data showed an acceptable quantification to standard protein between the both conditions.

A



B

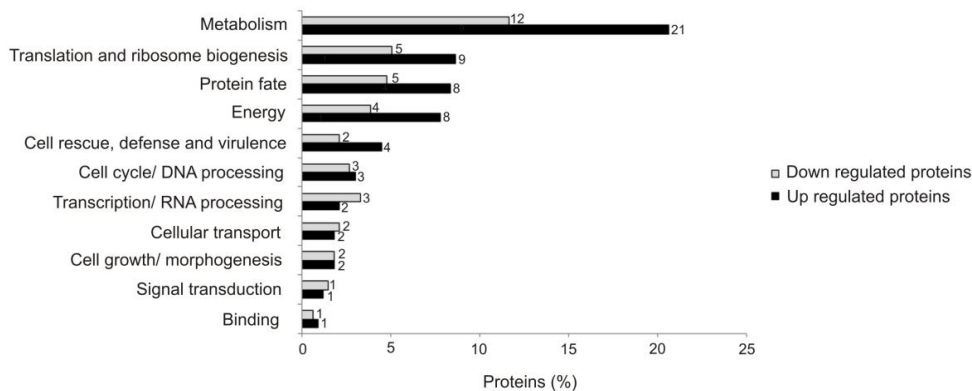


Figure S6. Functional classification and abundance levels of proteins regulated in *Paracoccidioides* under glucose deprivation obtained by NanoUPLC-MS^E data. (A) Biological processes of differentially expressed proteins in *Paracoccidioides*, *Pb01*, under glucose deprivation are shown. The biological processes were obtained using the Pedant on MIPS (http://pedant.helmholtz-muenchen.de/pedant3htmlview/pedant3view?Method=analysis&Db=p3_r48325_Parabraci_Pb01) and Uniprot databases (<http://www.uniprot.org/>). Three hundreds and thirty-five proteins are represented by the percentage (%) in each category. **(B)** The number of up- and down-regulated proteins in *Paracoccidioides*, *Pb01*, under glucose deprivation is shown for each category depicted in (A). Two hundreds and three proteins were up- regulated (dark gray) and one hundred and thirty-two proteins were down-regulated and are depicted by the light gray color bar.

2) Conclusões

A fim de sobreviver no corpo humano, patógenos devem se adaptar nos microambientes os quais são frequentemente caracterizados por baixas disponibilidades de nutrientes. Em *Paracoccidioides* spp. uma das primeiras linhas de defesa durante invasão no hospedeiro são os macrófagos residentes nos pulmões, considerados pobres em aminoácidos e nutrientes tais como a glicose. Neste estudo, as respostas de *Paracoccidioides*, isolado *Pb01*, sob condições de privação de glicose foram obtidas a partir de abordagens transcricional e proteômica em larga escala além de ensaio enzimático, peso seco celular e ensaios de interação macrófago-fungo. As análises revelaram que:

- ✓ *Pb01* muda seu metabolismo em resposta à privação de glicose, detectado por análises transcricionais e proteômicas em larga escala;
- ✓ O fluxo de carbono é centrado na produção de etanol e gliconeogênese pela modulação de vias tais como a beta-oxidação e ciclos do glioxilato e ácido tricarbóxico que, juntamente com a degradação de aminoácidos, geram precursores que alimentam tal fluxo;
- ✓ O aumento da quantidade de etanol em 24 e 48 h de privação de glicose comparada à condição controle corroboram o fluxo de carbono sugerido;
- ✓ A detecção da menor taxa de crescimento das células em privação de glicose estão de acordo com dados prévios em outros organismos e têm associação com a menor abundância de transcritos e proteínas associadas com a regulação do ciclo celular, transcrição, crescimento celular/morfogênese e transdução de sinal;
- ✓ As células que foram previamente privadas de glicose mostraram ser mais susceptíveis à morte por macrófagos indicando que a glicose proporciona uma vantagem de sobrevivência de *Paracoccidioides* dentro dos macrófagos;

- ✓ Neste estudo, vias metabólicas alternativas adotadas pelo fungo *Pb01* durante a privação de glicose foram elucidadas resultando no melhor entendimento da adaptação e persistência fúngica no ambiente hostil do hospedeiro. Desse modo, o estudo contribuiu nas investigações em relação à adaptação do fungo à privação da fonte preferencial de carbono, condição encontrada no hospedeiro e que se torna relevante para o estabelecimento da infecção.



Capítulo 3
Hipóxia

1) Introdução

Os níveis de oxigênio na atmosfera eram baixos até a evolução de organismos fotossintéticos (cianobactérias) a aproximadamente 2,5 – 3 bilhões de anos atrás e este cenário começou a mudar (SEMENZA, 2007). As concentrações de oxigênio aumentaram significativamente a cerca de 1,5 bilhão de anos atrás o que coincidiu com o aparecimento dos primeiros eucariotos aeróbios. Estes organismos puderam gerar energia por fosforilação oxidativa em organelas internas, as mitocôndrias (HEDGES et al, 2004), essenciais como acceptora de elétrons durante a respiração. Os primeiros fungos provavelmente surgiram neste período. Os níveis de oxigênio continuaram a oscilar particularmente durante a expansão dos metazoários (a 500 milhões de anos atrás). O oxigênio é uma molécula tóxica e não é surpreendente que os organismos desenvolveram mecanismos sofisticados para responderem a níveis alterados desta molécula (TAYLOR & MCELWAIN, 2010).

O oxigênio é uma molécula crítica para biossíntese de esteróis, ácidos graxos mono e poliinsaturado, NAD (dinucleotídeo de nicotinamida e adenina), porfirina para algumas vias metabólicas e biossintéticas (RAYMOND & SEGRE, 2006; SUMMONS et al, 2006). Assim, a disponibilidade de oxigênio é um fator crítico no metabolismo geral das células de aeróbios obrigatórios e facultativos. Alguns eucariotos fúngicos, tais como representantes do filo Neocallimastigales são anaeróbios obrigatórios e foram primeiramente isolados do rúmen de ovelhas (TRINCI et al, 1994) não utilizando o oxigênio nos processos de produção de ATP nas mitocôndrias. Por outro lado, as organelas denominadas hidrogenossomas produzem quantidades equimolares de CO₂, H₂ e acetato a partir do piruvato. Neste processo o ATP é formado sem a presença de oxigênio tendo esta organela, portanto, uma função também de respiração aeróbia (BENCHIMOL et al, 1997).

As diferentes tensões de oxigênio são descritas como anóxia ou anaeróbia (depletada ou ausência completa de oxigênio); hipóxia (condição em que há redução nos níveis de oxigênio) e normóxia (níveis de oxigênio atmosférico de aproximadamente 21% de O₂ ou uma pressão parcial de oxigênio [pO₂] de 159 mmHg no nível do mar) (GRAHL et al, 2012b). Como citado anteriormente, os organismos possuem mecanismos sofisticados para responderem a níveis alterados de oxigênio. Até mesmo os aeróbios obrigatórios e facultativos podem ser expostos à longos períodos ou

transientes condições de hipóxia. Muitos fungos crescem no solo onde teores de oxigênio são baixos e outros, tais como *Aspergillus fumigatus*, colonizam pilhas de compostagem onde as concentrações de oxigênio são próximas a 1,5% (WANG et al, 2007). Mais ainda, em relação aos patógenos humanos nos quais são em sua maioria considerados aeróbios obrigatórios, esta disponibilidade é essencial para o desenvolvimento da infecção visto que a adaptação à ambientes normóxicos, no meio ambiente, e hipóxicos, no corpo humano, é um desafio para tais organismos (ERNST & TIELKER, 2009; GRAHL et al, 2012b) com consequente produção de estresse ambiental na maioria das células dos patógenos e do hospedeiro (COONEY & KLEIN, 2008; PEYSSONAUX & JOHNSON, 2004).

O desafio de se adaptar às condições de hipóxia no hospedeiro é descrito até mesmo para patógenos dependentes do hospedeiro mamífero como o fungo patogênico humano *Candida albicans*. Este fungo enfrenta diversas tensões de oxigênio durante o processo infectivo tais como níveis atmosféricos (21% ou 160 mmHg), quando infecta cavidades orais e mucosas, e níveis mais baixos do gás quando penetra em órgãos, células e tecidos internos. De fato, no intestino, residência de muitos micro-organismos patógenos e comensais, os teores de oxigênio variam de 0 à 70 mmHg com picos em torno de 20 mmHg no duodeno. Concentrações similares são encontradas no fígado, pâncreas e cérebro. Nos rins, as concentrações são um pouco maiores, em torno de 70 mmHg (ERNST & TIELKER, 2009). O gradiente de oxigênio em tais órgãos depende da proximidade da corrente sanguínea, na qual transporta oxigênio nas veias, ou ainda pela atividade das células, tanto do hospedeiro quanto dos micro-organismos que colonizam os nichos no hospedeiro, resultando no consumo desta molécula (ERNST & TIELKER, 2009). Além disso, a produção de CO₂ está diretamente acoplada ao consumo de O₂ nas células eucarióticas. Os sítios de hipóxia *in vivo* também contêm níveis elevados de gás carbônico no qual o sensoramento tem sido relacionado à virulência fúngica (KLENGEL et al, 2005).

A ideia de que patógenos fúngicos enfrentam níveis baixos de oxigênio durante a patogênese, tem sido confirmada *in vivo* em modelos murinos de aspergilose pulmonar invasiva (API). Estudos utilizando uma linhagem de *A. fumigatus* que produz luciferase mostraram que a luminescência produzida pela enzima, *in vivo*, decrescia durante a infecção, apesar de um aumento na carga fúngica. A hipótese foi de que, durante a infecção, a lesão severa nos tecidos causou um decréscimo na disponibilidade de oxigênio o qual afetou a reação que produz luz pela luciferase, dependente de

oxigênio (BROCK et al, 2008; IBRAHIM-GRANET et al, 2010). Além disso, a confirmação adicional de hipóxia nos sítios de infecção foi ainda mais evidente em um estudo que utilizou três modelos murinos de API imunologicamente distintos usando o agente de detecção de hipóxia hidrocloreto pimonidazol (*Hypoxyprobe – 1*) (GRAHL et al, 2011). Os resultados do estudo mostraram que o influxo e a atividade das células do sistema imune do hospedeiro contribuem muito para o desenvolvimento da condição de hipóxia durante a infecção fúngica pulmonar invasiva. Os modelos murinos de infecção onde as respostas inflamatórias foram maiores, a condição de hipóxia também foi mais detectada (Figura 1A e C). No primeiro modelo (Figura 1A), os camundongos foram quimioterapeuticamente imunossuprimidos com depleção de neutrófilos e outras células efetoras do sistema imune. Apesar de se detectar hipóxia neste modelo, esta condição foi menor do que nos outros dois modelos e a principal consequência foi o processo inflamatório mínimo mesmo com o crescimento fúngico intenso. Na Figura 1B, os camundongos foram tratados com altas doses de corticosteróides. Este tratamento resulta em uma maior susceptibilidade à infecções por micro-organismos devido à supressão, e não depleção, como nos quimioterapeuticamente tratados, da atividade das células efetoras do sistema imune do hospedeiro. Desse modo, há, mesmo que mínimo, um processo inflamatório nos tecidos pulmonares, acompanhado do crescimento fúngico e ao aparecimento mais intenso da condição de hipóxia.

No terceiro caso, demonstrado na Figura 1C, camundongos transgênicos deficientes da subunidade gp91^{phox} da enzima NADP oxidase foram observados durante a infecção por *A. fumigatus*. Este modelo murino simulou uma condição de doença granulomatosa crônica desordenada, o que torna os pacientes altamente susceptíveis à infecções por micro-organismos. Houve um forte aumento da resposta inflamatória do hospedeiro acompanhado do crescimento fúngico reduzido. A condição de hipóxia foi maior tanto no centro das lesões quanto ao redor do tecido pulmonar, dependendo dos dias pós-infecção. Concluiu-se que, partes significantes do pulmão, tiveram contato com a condição de hipóxia durante a infecção por *A. fumigatus*. Juntos, os dados demonstraram que *A. fumigatus* encontra microambientes hipóxicos e diferentes disponibilidades de oxigênio durante o processo infectivo e sugeriram que a resposta inflamatória inicia um importante, mas não exclusivo, papel na geração de microambientes hipóxicos no hospedeiro (GRAHL et al, 2011; GRAHL et al, 2012b).

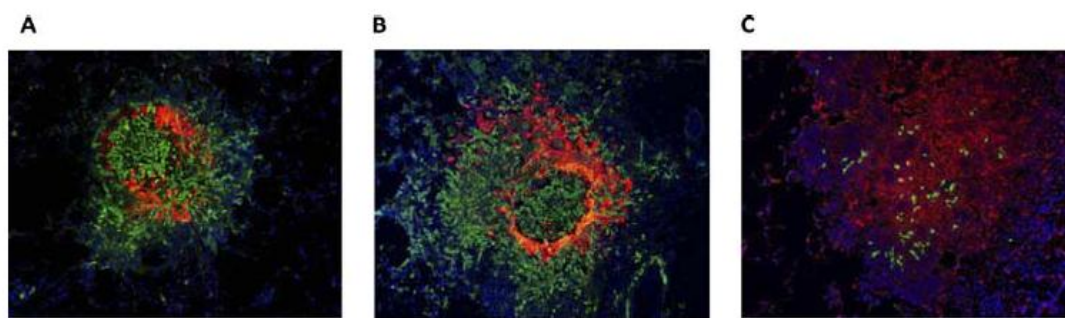


Figura 1. Ocorrência de hipóxia em modelos murinos de API (aspergilose pulmonar invasiva). O agente de detecção de hipóxia, hidrócloro pimonidazol (*Hypoxyprobe-1*), foi usado para monitorar a condição de hipóxia *in vivo* em três modelos murinos distintos de aspergilose invasiva. **Verde:** *A. fumigatus*; **Azul:** 4,6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) corando células do hospedeiro; **Vermelho:** hipóxia detectada pelo *Hypoxyprobe-1*. Todas as imagens são do dia 4 pós-inoculação do fungo e representam as imagens sobrepostas como previamente descrito em Grahl et al. (2011). **(A)** Modelo murino quimioterapêutico representando camundongos imunossuprimidos com ciclofosfamida e triamcinolon e inoculados com conídios de *A. fumigatus*. **(B)** Modelo murino corticosteróide representando camundongos imunossuprimidos com dose única de triamcinolona e inoculados com conídios de *A. fumigatus*. **(C)** Modelo murino de doença granulomatosa crônica representando camundongos deficientes da subunidade da enzima NADPH oxidase e inoculados com conídios de *A. fumigatus*. Os dados foram retirados dos experimentos descritos em Grahl et al. (2011). **Adaptação da figura: Grahl et al. (2012).**

Os mecanismos de adaptação à hipóxia têm sido amplamente explorados em micro-organismos não patogênicos e células de mamíferos/ humanas, porém poucos estudos mostram a influência da hipóxia na infectividade e virulência de patógenos (ERNST & TIELKER, 2009). Muitos organismos conseguem sensoriar as concentrações de oxigênio e respondem rapidamente à esta condição. Respostas transcricionais de muitas espécies fúngicas, patogênicas ou não, mostram a adaptação destes micro-organismos durante estágios iniciais de hipóxia (BARKER et al, 2012; BECERRA et al, 2002; ERNST & TIELKER, 2009; GUIDA et al, 2011; HUGHES et al, 2005; KWAST et al, 2002; SETIADI et al, 2006; SYNNOTT et al, 2010). Em níveis transcricionais, as respostas centrais entre a maioria deles envolvem aumento da expressão de genes que codificam enzimas de vias dependentes de oxigênio tais como síntese de esteróis, lipídios e heme (BIEN & ESPENSHADE, 2010; BUTLER, 2013). Outras mudanças vistas em algumas, mas não em todas as espécies, incluem um aumento de genes relacionados com a via glicolítica e diminuição daqueles envolvidos

com a respiração assim como mudanças na expressão de genes da parede celular das células fúngicas como ocorrem em *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *S. cerevisiae* (ASKEW et al, 2009; GUIDA et al, 2011; KWAST et al, 1998; KWAST et al, 2002; SYNNOTT et al, 2010). Em *Cryptococcus neoformans*, as respostas transcricionais à hipóxia revelaram que o fungo aumenta a expressão de transcritos associados com a biossíntese do grupo heme e de ergosterol, metabolismo de ácidos graxos, de respostas a estresse e respiração celular, mas diminuiu a expressão de transcritos envolvidos com parede celular e biossíntese da cápsula. No fungo *A. fumigatus*, respostas transcricionais e proteômicas em resposta à hipóxia também têm sido conduzidas (BARKER et al, 2012; VODISCH et al, 2011) mostrando semelhanças e diferenças entre as respostas à hipóxia dos organismos anteriormente citados. Depois desta visão geral, para que entendamos os mecanismos que estão por trás destas respostas nas células fúngicas e em outros eucariotos, é importante que saibamos primeiramente como as respostas ocorrem nas células de mamíferos e em fungos não-patogênicos, melhor caracterizadas. Assim, podemos pontuar tanto semelhanças quanto diferenças destes para com os fungos patogênicos e entendamos a importância do estudo de tais fatores no estabelecimento da patogênese fúngica.

1.1 - Regulador hipóxico em mamíferos

O fator induzível por hipóxia (HIF) é o melhor regulador da resposta à hipóxia estudado em mamíferos (GREER et al, 2012). Este fator é bem conservado nos Metazoários (mamíferos, artrópodos e cnidários, por exemplo) inclusive em sua função, como previamente detectado em vermes e moscas (ARQUIER et al, 2006; EPSTEIN et al, 2001). O HIF é um fator de transcrição dimérico consistindo de uma subunidade reguladora e outra constitutivamente expressa, HIF- α e HIF- β , respectivamente. Quando os níveis de oxigênio estão altos a subunidade HIF- α é modificada por proli-hidroxilases, dependentes de oxigênio, e subsequentemente degradada via proteassoma sinalizada por ubiquitina. Quando ocorre o oposto, a atividade hidrolase das proli-hidroxilases é inibida, devido a quantidade menor de oxigênio. Consequentemente, a HIF- α , livre, entra no núcleo, dimeriza com HIF- β e regula a expressão de centenas de genes em resposta à hipóxia (Figura 2). A expressão de transportadores de glicose, enzimas glicolíticas e lactato desidrogenase A é induzida no qual aumenta a glicólise (TAYLOR, 2008). A eficiência da respiração mitocondrial é aumentada (SEMENZA,

1.2 - Principais reguladores hipóxicos em fungos: SREBPs (*sterol regulatory element binding proteins*) e Upc2

A biossíntese de esteróis é um processo dependente de oxigênio e, em algumas espécies, as respostas à hipóxia se dá pelo sensoriamento dos níveis de esteróis nas membranas fúngicas. As SREBPs são as proteínas mais bem estudadas e entendidas envolvidas com o mecanismo hipóxico em sistemas fúngicos (BIEN & ESPENSHADE, 2010; ESPENSHADE & HUGHES, 2007; OSBORNE & ESPENSHADE, 2009). Mamíferos têm dois genes que codificam para SREBPs, SREBP-1 e SREBP-2. Estes genes regulam a expressão de genes para síntese e captação de ácidos graxos e colesterol e, portanto, não estão envolvidos com a resposta à hipóxia (HORTON et al, 2002). Como ocorre em HIF (*hipoxia inducible factor*), fator de transcrição responsivo à hipóxia em mamíferos, as SREBPs têm um domínio de ligação ao DNA denominado bHLH (*basic helix loop helix*), porém o resíduo único de tirosina no lugar de uma arginina só ocorre nas SREBPs e é conservado entre as espécies (KIM et al, 1995). Nos fungos ascomicetos *Schizosaccharomyces pombe* e *A. fumigatus*, assim como no basidiomiceto *C. neoformans*, existem ortólogos SREBPs envolvidos na expressão de genes relacionados à biossíntese de lipídios, ergosterol e heme (CHANG et al, 2007; CHUN et al, 2007; TODD et al, 2006; WILLGER et al, 2012).

Em mamíferos e em alguns fungos, as proteínas da família SREBP são sintetizadas como precursores inativos inseridas na membrana do retículo endoplasmático das células (Figura 3). A presença de dois domínios transmembrana garante que ambas as porções, N- e C-terminal, estejam no citoplasma celular. As SREBPs estão associadas com a proteína SCAP (*SREBP cleavage activating protein*), onde o homólogo nos fungos é denominado Scp1, no retículo endoplasmático. A proteína SCAP se liga à esteróis, mantendo-se na conformação inativa e retendo as SREBPs na membrana. Em condições de depleção de esteróis, a região N-terminal das SREBPs, na qual contém o domínio de ligação ao DNA, é clivada e entra no núcleo atuando como fator de transcrição, ativando a expressão de genes alvo (BUTLER, 2013).

Apesar deste mecanismo básico de ativação das SREBPs ser conservado entre mamíferos e fungos, há também diferenças substanciais. Primeiramente, a proteína INSIG (*insulin-induced gene*), bem caracterizada no mecanismo de ativação das SREBPs em mamíferos, está envolvida com a regulação do transporte do complexo

2007) e genes associados com eritropoiese, angiogênese e vasodilatação são também regulados (GUILLEMIN & KRASNOW, 1997). Entretanto, não há evidência da presença de ortólogos HIF além dos Metazoários (LOENARZ et al, 2011), inclusive em fungos onde não têm sido descrito ortólogos HIF até o momento (BUTLER, 2013).

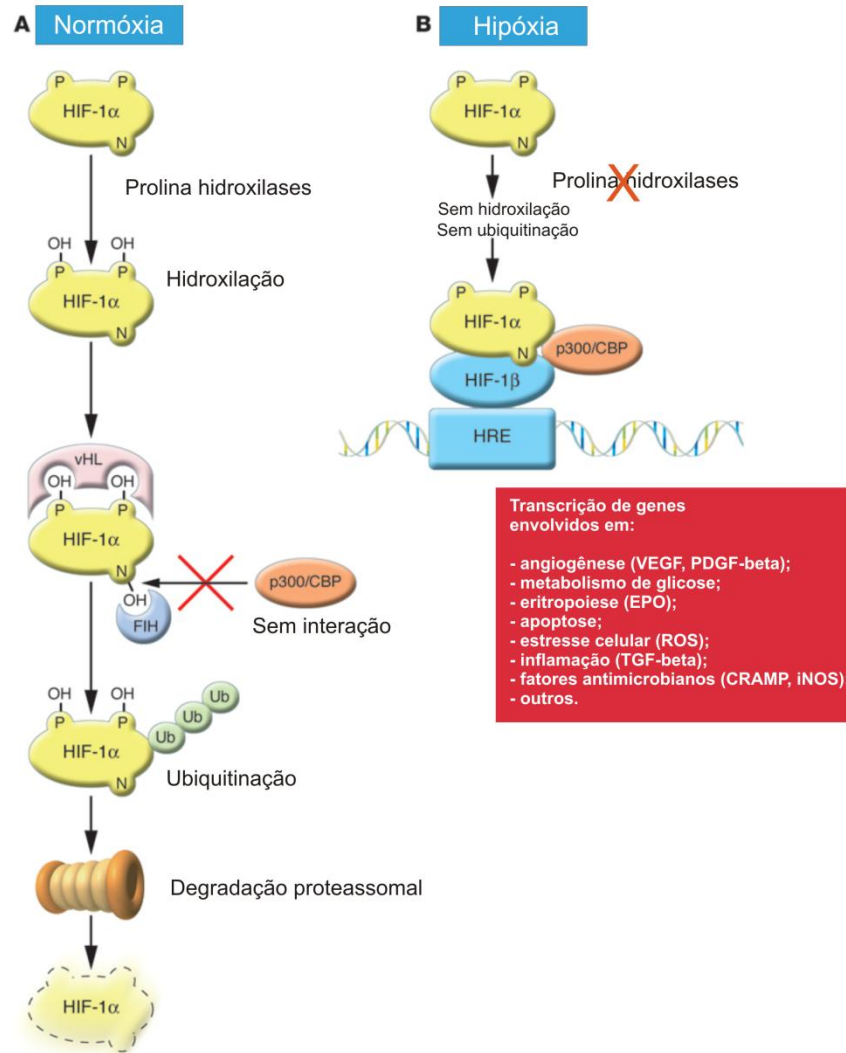


Figura 2. HIF-1 α regula várias funções importantes em leucócitos polimorfonucleares durante mecanismos de defesa do hospedeiro em condições de normóxia e hipóxia. (A) Durante normóxia, as prolina hidroxilases, dependentes de oxigênio, modificam a subunidade alfa do fator de transcrição HIF-1 nos resíduos de prolina 402 e 564. A asparagina 803 é, então, hidroxilada pela proteína FIH o qual decresce a interação do fator com coativadores transcripcionais p300/CBP. As prolinas hidroxiladas são reconhecidas por vHL, um componente do complexo ubiquitina ligase, que ubiquitina (Ub) HIF-1 α e o direciona para degradação via proteassoma. **(B)** Durante hipóxia e/ou infecção bacteriana, as prolina hidroxilases não são ativadas. Consequentemente, o HIF-1 α se liga à HIF-1 β e p300/CBP e regula a expressão de genes responsivos por hipóxia, envolvidos em angiogênese, metabolismo e transporte de glicose, eritropoiese, inflamação, apoptose e estresse celular. EPO, eritropoietina. **Adaptação: Zarembek & Malech, 2005.**

SCAP-SREBP (Figura 3). Em condições repletas de esteróis (colesterol), estes se ligam à proteína SCAP induzindo uma conformação que permite a ligação da SCAP à proteína INSIG (ADAMS et al, 2004). Quando os níveis de esteróis caem, a interação entre SCAP e INSIG é rompida e o complexo SCAP-SREBP é transportado para o Complexo de Golgi via vesículas COP II (LEE et al, 2004) SREBP é, então, clivada no Golgi e a porção N-terminal liberada para entrar no núcleo (ESPENSHADE & HUGHES, 2007), como explicado anteriormente. Além deste papel, a proteína INSIG também regula a proteólise de HMG-CoA redutases (5-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A) requerida para a produção de mevalonato, um passo na biossíntese do colesterol, em mamíferos (SEVER et al, 2003). A proteína INSIG é bem conservada no reino dos fungos exceto em *C. neoformans* (BIEN & ESPENSHADE, 2010). Entretanto, estes homólogos não têm papel aparente na regulação do transporte do complexo SREBP-SCAP. Em *S. pombe*, o homólogo INSIG, Ins1, regula a síntese de esteróis, mas somente pela inibição da atividade das HMG-CoA redutases (BURG et al, 2008). Em *S. cerevisiae*, o homólogo INSIG, Ngs1, controla as HMG-CoA redutases estabilizando a atividade e regulando os níveis protéicos de sua isoforma, Hmg2 (BURG et al, 2008; FLURY et al, 2005). As INSIG dos outros fungos não têm suas funções ainda descritas.

Outra particularidade do mecanismo de ativação das SREBPs está relacionada ao processo de clivagem destas proteínas por proteases sítio-dirigidas (Figura 3). A SREBP de mamíferos é clivada por duas proteases sítio-dirigidas (Figura 3). A primeira (SP1 ou protease sítio-1) cliva dentro do *loop* no lúmen do Golgi e a segunda (SP2 ou protease sítio-2) cliva dentro do domínio transmembrana (DUNCAN et al, 1997; DUNCAN et al, 1998). As SP-1 são bem conservadas entre os fungos e têm muitas funções (SEIDAH et al, 1994) e as SP-2 são conservadas em muitos basidiomicetos, inclusive em *C. neoformans* mas parece ter sido perdida nos ascomicetos (BIEN et al, 2009; BIEN & ESPENSHADE, 2010; CHANG et al, 2009). Em *C. neoformans*, a deleção do ortólogo SP-2, *stp1*, resulta em aumento da sensibilidade à hipóxia (CHANG et al, 2009; CHUN et al, 2007) sendo requerida para o processamento de Sre1p, a SREBP de *C. neoformans*, em condições de baixos níveis de esteróis (BIEN et al, 2009).

O processamento das SREBPs é muito diferente nos ascomicetos quando comparado ao dos basidiomicetos, por exemplo, *C. neoformans*. *A. fumigatus* e espécies relacionadas não têm homólogo para a proteína SCAP, por exemplo (Figura 3) e *S.*

pombe, têm dois homólogos SREBPs, Sre1 e Sre2. Sre2 é muito menor que Sre1, não se liga à SCAP e é constitutivamente clivada independentemente dos níveis de esteróis (HUGHES et al, 2005). Um estudo mostrou que proteínas do complexo Dsc E3 ligase, no qual transferem ubiquitina de uma enzima E2 conjugada à ubiquitina para um alvo, é requerida para o processamento de Sre1 e Sre2 em *S. pombe* (Figura 3) (STEWART et al, 2012; STEWART et al, 2011). A clivagem de Sre1 também requer a enzima Ubc4 conjugada à E2 e componentes do proteassoma. Stewart et. al. (2012; 2011) sugere que Scp1 transporta SREBPs do complexo de Golgi, onde estas proteínas são ubiquitinadas por Ubc4-Dsc e direcionadas para clivagem no proteassoma. Este mecanismo pode ser uma resposta comum à hipóxia em muitos ascomicetos, compensada pela perda da protease SP2, e suportada pela recente demonstração de que este complexo também é requerido para a clivagem de SrbA, a SREBP de *A. fumigatus* (WILLGER et al, 2012). Ainda em *S. pombe*, outra proteína envolvida nos mecanismos de resposta à hipóxia, é a proteína 2-oxoglutarato Fe (II) dioxigenase, Ofd1 (Figura 3). Ofd1 está envolvida na regulação de Sre1 independente dos níveis de esteróis. Esta proteína é membro da família das prolil-hidroxilases nas quais, em mamíferos, regulam a degradação do fator de transcrição induzível por hipóxia, HIF- α . Quando os níveis de oxigênio são altos, a proteína Ofd1 acelera a degradação da porção N-terminal de Sre1 via proteassoma. Entretanto, o fator de transcrição é estabilizado em baixos níveis de oxigênio (HUGHES & ESPENSHADE, 2008). Ofd1 atua como um sensor de oxigênio via dois domínios distintos: um domínio dioxigenase na extremidade N-terminal, na qual sensoria oxigênio, e um domínio C-terminal, no qual acelera a degradação. Estudos mostraram que a parte C-terminal de Ofd1 interage com a proteína Nro1, de localização nuclear. Quando os níveis de oxigênio estão baixos, Nro1 se liga à Ofd1, ajudando a estabilizar Sre1 na qual não é degradada e regula a transcrição de genes hipóxicos (Figura 3) (LEE et al, 2011; YEH et al, 2011). Ofd1 é geralmente bem conservada entre as espécies fúngicas (BIEN & ESPENSHADE, 2010) e é possível ser recrutada para regulação hipóxica em muitas espécies fúngicas, mas atua através de diferentes mecanismos (BUTLER, 2013).

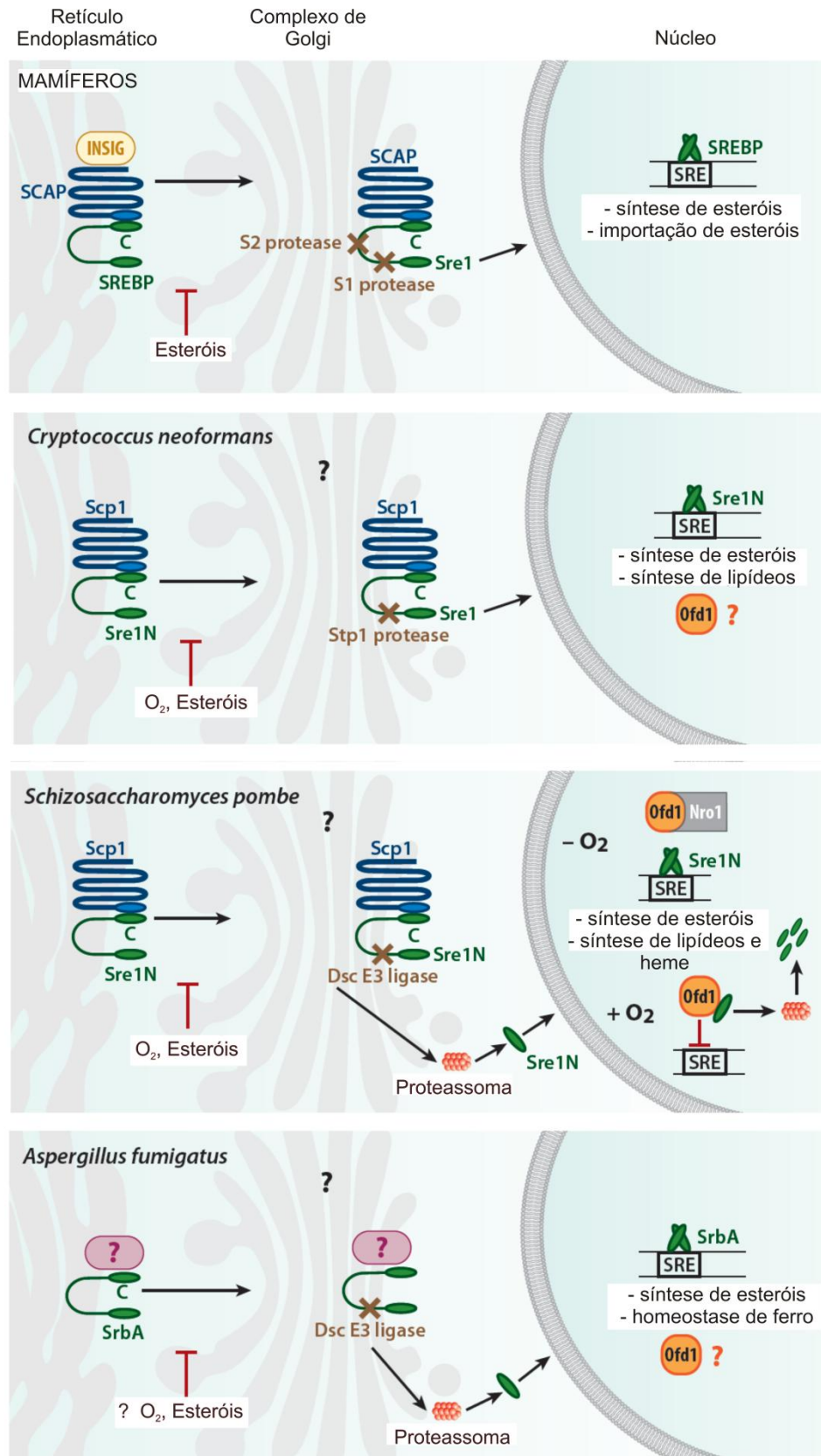


Figura 3. A via das SREBPs em mamíferos e fungos. O complexo SREBP/SCAP, em mamíferos, é mantido pela interação com a proteína INSIG, no retículo endoplasmático. Baixos níveis de esteróis causam mudança na conformação de SCAP, liberação da INSIG e transporte para o complexo de Golgi. A região N-terminal é liberada por duas proteases específicas, entra no núcleo e ativa a expressão de

genes alvo. As vias de transporte nos fungos e o papel do complexo de Golgi não são completamente entendidos. A SREBP Sre1 é ligada à membrana por um complexo com SCAP, Scp1, em *C. neoformans* e *S. pombe* porém, não há SCAP em *A. fumigatus* e o mecanismo de retenção não é conhecido. A clivagem da porção N-terminal das SREBPs (pela protease PS-1 em *C. neoformans* e pelo proteassoma em *S. pombe* e *A. fumigatus*) é inibida por níveis de esteróis e oxigênio. O fator de transcrição N-terminal se liga à elementos regulatórios esteróis no promotor dos genes (SRE) e ativa a expressão de genes envolvidos no metabolismo de esteróis e outros. Em *S. pombe*, quando os níveis de oxigênio são altos, a proteína Ofd1 se liga à Sre1-N-terminal, inibindo sua ligação ao DNA e direcionando o fator para degradação ao proteassoma. Quando os níveis estão baixos, Ofd1 é seqüestrada pelo transportador nuclear Nro1. O papel de Ofd1 na regulação à hipóxia em outros fungos não é conhecido. Na figura, alguns passos putativos ou não caracterizados ainda são indicados com pontos de interrogação. Abreviações: INSIG: *insuline-induced gene*; SCAP: *SREBP cleavage activating protein*; SREBP: *sterol regulatory element-binding protein*. **Adaptação: Butler (2013).**

Muito interessante, em algumas espécies de ascomicetos (as Saccharomycotina) há diferenças peculiares em relação às SREBPs. Nestas espécies, o papel central da regulação à hipóxia feito pelas proteínas da família SREBP foi evolutivamente substituído pelo fator de transcrição Upc2 (Figura 4). Upc2 não tem similaridade de sequência com as proteínas da família SREBP e contém um domínio de ligação ao DNA tipo Gal4. Upc2 regula a expressão de genes hipóxicos e síntese de esteróis em *S. cerevisiae*, *C. albicans* e *Candida parapsilosis* (BUTLER, 2013; GUIDA et al, 2011; HOOT et al, 2008; VIK & RINE, 2001). Os homólogos mais prováveis das SREBPs nos Saccharomycotina são representados por Cph2 (*C. albicans*) e Hms1 (*S. cerevisiae*). Ambos têm o domínio bHLH com o resíduo conservado de tirosina (BIEN & ESPENSHADE, 2010) entretanto os domínios transmembrana associados com a função das SREBPs são pouco conservados e as proteínas são menores. Além disso, Cph2 regula o crescimento da hifa (LANE et al, 2001) e Hms1 foi demonstrado ser regulador do crescimento da pseudohifa (LORENZ & HEITMAN, 1998). A hipótese de que Upc2 substituiu a função da SREBP como regulador hipóxico da via de esteróis nas espécies Saccharomycotina é de que um ancestral fúngico tinha uma SREBP com papel duplo, regulação à hipóxia e determinação da morfologia. Esta é uma forte evidência já que estudos demonstram que em *A. fumigatus*, SrbA (SREBP) é requerida para ambos, regulação à hipóxia e ramificação da hifa (WILLGER et al, 2008).

Resposta à hipóxia em fungos				
Fungo	SREBP	Função	Sequência similar à SREBP (mamíferos)?	Referências bibliográficas
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Sre1	Regula a expressão de síntese de esteróis, outros lipídeos e genes hipóxicos.	Sim	Chang et al, 2007; Chun et al, 2007
<i>Aspergillus fumigatus</i>	SrbA	Regula a expressão de síntese de esteróis, homeostase de ferro e outros genes hipóxicos.	Sim	Willger et al, 2008
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Sre1	Regula a expressão de síntese de esteróis, lipídios, heme e outros genes hipóxicos.	Sim	Todd et al, 2008
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Upc2	Regula a expressão de síntese de esteróis e outros genes hipóxicos.	Não. Quem tem é Hms1 mas esta proteína está envolvida na regulação da pseudohifa.	Vik & Rine, 2001; Bien & Espenshade, 2010; Davies & Rine, 2006; Lorenz & Heitman, 1998
<i>Candida albicans</i>	Upc2	Regula a expressão de síntese de esteróis e outros genes hipóxicos.	Não. Quem tem é Cph2 mas esta proteína está envolvida com crescimento da hifa.	Lane et al, 2001; Synnot et al, 2010; Hoot et al, 2008; Bien & Espenshade, 2010
<i>Candida parapsilosis</i>	Upc2	Regula a expressão de síntese de esteróis e outros genes hipóxicos.	Não	Guida et al, 2011

Figura 4. Resposta à hipóxia em fungos baseada nas SREBPs: diferenças entre reguladores. As SREBPs dos diferentes fungos indicados demonstram que, em espécies de Saccharomycotina, as proteínas envolvidas no mesmo processo não têm homologia com as SREBPs de mamíferos. Estas proteínas, Upc2, regulam a expressão de genes envolvidos com a síntese de esteróis e outros genes hipóxicos em resposta à este estresse porém não contêm regiões que as caracterizam como uma SREBP. A hipótese é de que possivelmente um ancestral fúngico tinha uma SREBP com papel duplo, regulação à hipóxia e determinação da morfologia, e que posteriormente Upc2 substituiu a função da SREBP. De fato, em *A. fumigatus*, SrbA (SREBP) é requerida para ambos, regulação à hipóxia e ramificação da hifa.

1.3 - Outros reguladores hipóxicos em fungos

Esteróis e lipídios são essenciais para fluidez de membrana e seus níveis são cuidadosamente controlados pelas células. A indução da expressão de genes envolvidos com a síntese de esteróis é uma das respostas mais conservadas à hipóxia em fungos e tem sido relatada em várias espécies, visto ser uma via dependente de oxigênio (BUTLER, 2013). Porém, o estresse hipóxico resulta na expressão de outros genes, compensando os efeitos do estresse por outras vias metabólicas. O grupo heme, por exemplo, no qual possui uma molécula de ferro que se liga ao oxigênio, pode atuar como um regular secundário da condição de hipóxia e os mecanismos têm sido bem caracterizados no fungo *Saccharomyces cerevisiae*. Níveis reduzidos do grupo heme são

utilizados pelo fungo para monitorar os níveis de oxigênio pelo fator de transcrição Hap1 e, em alguns casos, Upc2 (DAVIES & RINE, 2006).

Evidências sugerem que a mitocôndria e a cadeia respiratória também são importantes durante as respostas à hipóxia nos micro-organismos eucariotos. Cerca de 70% dos genes diferencialmente expressos em hipóxia requerem uma mitocôndria funcional (POYTON et al, 2009b). A mitocôndria das leveduras produz óxido nítrico (NO- *nitric oxide*) do nitrato em condições de hipóxia através da enzima citocromo-*c*-oxidase (CASTELLO et al, 2006). Em mamíferos, a citocromo-*c*-oxidase é requerida para estabilização do fator de transcrição induzível por hipóxia, o HIF- α , em condições de hipóxia (MANSFIELD et al, 2005). Porém, o papel da mitocôndria pode não ser o mesmo nos fungos visto que neste filo não há homólogo do HIF. Entretanto, é provável que o óxido nítrico regule a estabilização ou atividade de outras proteínas requeridas para a resposta à hipóxia. Observações em *A. fumigatus* mostraram que a deleção do gene que codifica para citocromo-*c*-oxidase significativamente atenuou o crescimento do fungo em condições de hipóxia sugerindo que a cadeia transportadora de elétrons também é importante para as respostas à hipóxia nas espécies fúngicas (GRAHL et al, 2012a). Além disso, em *C. neoformans*, mutantes que se mostraram sensíveis ao CoCl_2 (cloreto de cobalto) e à condição de hipóxia foram defectivos em funções mitocondriais. Alguns dos mutantes mitocondriais produziram níveis elevados de ROS (*reactive oxygen species*) reforçando a hipótese de que as ROS podem ser usadas como um mecanismo de sensoriamento de oxigênio em muitos fungos (INGAVALE et al, 2008).

O CoCl_2 é comumente usado como agente mimetizador de hipóxia em células de mamíferos (HAN et al, 2006) pois este estabiliza o fator induzível por hipóxia, HIF, através da regulação da atividade das prolin-hidroxilases (enzimas que evitam a degradação do fator em condições de hipóxia). Ao contrário do íon ferro (Fe), o cobalto (Co) e o níquel (Ni) têm baixa afinidade pelo oxigênio e se incorporam em proteínas que se ligam ao oxigênio. Desse modo, o CoCl_2 mimetiza a condição de hipóxia mesmo na presença do oxigênio molecular (LEE et al, 2007). Como a atividade das prolin-hidroxilases é dependente de oxigênio, estas enzimas tornam-se inativas e evitam que o fator de transcrição seja degradado via proteassoma. Estudos no fungo *C. neoformans* tem estabelecido uma correlação entre a síntese de ergosterol, sensoriamento de oxigênio e a sensibilidade ao CoCl_2 (BIEN et al, 2009; LEE et al, 2007).

É possível que o ferro seja utilizado também como um sensor de oxigênio de forma distinta ao seu papel nas proteínas que contêm o grupo heme, porém isto deve ser

ainda mais caracterizado (CAMILO & GOMES, 2010). O que se sabe é que as respostas à hipóxia se sobrepõem às respostas a baixos níveis do metal ferro. Muitos genes envolvidos na biossíntese do grupo heme e/ou aquisição de ferro têm expressão aumentada em ambas as condições (BARKER et al, 2012; BLATZER et al, 2011; CHANG et al, 2009; CHUN et al, 2007; SETIADI et al, 2006; SYNNOTT et al, 2010; TODD et al, 2006). Em *A. fumigatus*, genes associados com a aquisição de ferro são provavelmente regulados diretamente pela SREBP SrbA (BLATZER et al, 2011). Contudo, devido o sistema de transporte redutivo do ferro em espécies tais como *C. albicans* requerer a oxidação do Fe^{+2} , é difícil separar o efeito direto dos baixos níveis de oxigênio daqueles dos baixos níveis de ferro (ALMEIDA et al, 2009b).

A via glicolítica também está relacionada com as respostas à hipóxia descritas até o momento. Em eucariotos multicelulares (incluindo células de mamíferos), a expressão de enzimas glicolíticas é forte e coordenadamente induzida em condições de hipóxia. Contudo, os mecanismos não são conservados. Nas células de mamíferos a expressão dos genes glicolíticos em hipóxia é regulada pelo fator induzível por hipóxia, HIF, e em fungos, não é claro ainda se há um mecanismo central em comum. As respostas caracterizadas mostram ser diferentes entre representantes fúngicos (WEBSTER, 2003). A indução de genes glicolíticos é bem caracterizada no fungo *S. cerevisiae* (KWAST et al, 2002) e mudanças similares são observadas em fungos tais como *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *S. pombe* (ASKEW et al, 2009; GUIDA et al, 2011; SYNNOTT et al, 2010; TODD et al, 2006). Em *A. fumigatus*, a expressão aumentada dos genes glicolíticos em hipóxia só foi descrita em nível protéico (BARKER et al, 2012) e entre espécies aeróbias obrigatórias tais como *Trichoderma reesei* e *C. neoformans* há diminuição da expressão de representantes glicolíticos em hipóxia, no primeiro fungo (BONACCORSI et al, 2006), e indução da expressão de genes respiratórios quando os níveis de oxigênio são baixos, no segundo micro-organismo (CHUN et al, 2007).

O crescimento em hipóxia tem ainda efeitos dramáticos na parede celular fúngica. Em *S. cerevisiae* a expressão de manoproteínas da família DAN/TIR é altamente induzida em condições de hipóxia e anóxia e requer o fator de transcrição Upc2 (ABRAMOVA et al, 2001; COHEN et al, 2001). Em *C. albicans*, a condição de hipóxia afeta níveis de transcritos e proteínas de representantes das proteínas GPI-ancoradas e membros da família CFEM (comuns em membranas celulares fúngicas). O uso de azóis mimetizou baixos níveis de esteróis e, após requerimento de Upc2 e de

outro fator de transcrição denominado Bcr1, a indução de genes da parede celular foi detectada (SOSINSKA et al, 2008; SYNNOTT et al, 2010). Em *A. fumigatus*, o aumento da expressão de genes que codificam proteínas da parede celular também foi observado durante crescimento em hipóxia (BARKER et al, 2012). Desse modo, mudanças nos níveis de oxigênio provavelmente alteram a estrutura da parede celular fúngica demonstrando um grande campo de investigação ainda amplamente inexplorado e importante, por exemplo, para patogênese em espécies fúngicas causadoras de doenças.

1.4 - Hipóxia e patogênese

Mutantes nulos para os principais genes regulados por hipóxia ou para reguladores desta condição nos fungos geralmente mostram virulência atenuada em modelos murinos de infecção fúngica. Muitos destes genes estão envolvidos com a regulação do metabolismo celular básico. Desse modo, as deleções resultam em atenuado crescimento fúngico em hipóxia mostrando a importância do controle do metabolismo para adaptação e sobrevivência dos micro-organismos em condições de depleção de oxigênio, principalmente em relação à biossíntese de esteróis, ácidos graxos, heme e homeostase de ferro (GRAHL et al, 2012b).

Um aspecto comum das respostas fúngicas à hipóxia, que parece ter grande relevância para a virulência destes micro-organismos, é o sensorialmente e regulação dos níveis de esteróis, como explicado anteriormente. Em *C. albicans*, por exemplo, o mutante para o fator de transcrição Upc2, no qual tem sua expressão ativada em condições de hipóxia e baixos níveis de esteróis, reduz o crescimento do fungo e interfere de forma significativa na formação de filamentos mais longos (MACPHERSON et al, 2005; SYNNOTT et al, 2010). Entretanto, a ligação mais direta da adaptação fúngica à hipóxia e a habilidade destes organismos causarem doenças letais vêm dos estudos com as SREBPs. Mutantes nulos para representantes gênicos desta família de proteínas em *A. fumigatus* e *C. neoformans*, SrbA e Sre1, respectivamente, mostram que há uma forte atenuação da virulência dos fungos em modelos murinos de criptococose e aspergilose invasiva pulmonar (CHANG et al, 2007; CHUN et al, 2007; WILLGER et al, 2008). Além disso, uma outra via relacionada às respostas à proteínas não enoveladas e que está envolvida com a homeostase de esteróis de forma independente das proteínas da família SREBP, tem se mostrado ser crítica para

a adaptação à hipóxia e virulência de *A. fumigatus*. O mutante nulo para o sensor de estresse do retículo endoplasmático IreA mostrou ser avirulento em modelos murinos de aspergilose invasiva em condições de hipóxia (FENG et al, 2011). Então, perturbações na biossíntese de esteróis são um aspecto comum de alguns mutantes fúngicos nulos com defeitos de crescimento em hipóxia (GRAHL et al, 2012b).

Outro grupo de moléculas que podem ser críticas para as respostas à hipóxia nos fungos são aquelas envolvidas com a formação de espécies reativas e oxigênio e nitrogênio (GRAHL et al, 2012a; GUZY et al, 2007; POYTON et al, 2009a; POYTON et al, 2009b) e com a estrutura da parede celular (SOSINSKA et al, 2008). A produção de espécies reativas de nitrogênio e homeostase de espécies reativas de oxigênio pelo complexo IV da cadeia transportadora de elétrons podem interferir na habilidade de *A. fumigatus* se adaptar à hipóxia e microambientes pulmonares (GRAHL et al, 2012a). O papel exato da cadeia respiratória na sinalização à hipóxia em patógenos fúngicos é ainda indefinido e, portanto uma área promissora para mais investigações. Considerando mudanças na parede celular fúngica, condições de hipóxia alteraram a expressão de transcritos relacionados à biossíntese da parede celular tanto em *C. albicans* quanto em *A. fumigatus*. Estas alterações foram acompanhadas de mudanças no padrão de expressão e exposição das PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) o que torna relevante a procura por tais moléculas importantes para adaptação fúngica durante estresse hipóxico (GRAHL et al, 2012b; SHEPARDSON & CRAMER, 2013; SHEPARDSON et al, 2012).

O fungo *Paracoccidioides* apresenta uma fase saprobiótica no solo e/ou fezes e outra parasítica nos tecidos do hospedeiro (ALMEIDA et al, 2009a; TERÇARIOLI et al, 2007). Estas características indicam que o fungo, provavelmente, possui mecanismos de adaptação à hipóxia visto que organismos que habitam tais ambientes têm mostrado estes mecanismos (GRAHL et al, 2012b). Além disso, o solo por si só torna-se hipóxico após fortes chuvas e devido o aumento dos níveis de gás carbônico, CO₂. Assim, organismos que habitam solos desenvolveram mecanismos para tolerar mudanças nos níveis baixos de oxigênio rapidamente (DAT et al, 2004; MACEK et al, 2011). O estudo das adaptações à hipóxia tem sido pouco investigado em muitos fungos dimórficos patógenos humanos e clinicamente relevantes tais como *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* e inclusive nas espécies de *Paracoccidioides*. Em hipóxia, há ativação primordial da via das SREBPs, na qual tem sido proposta como excelente alvo para drogas antifúngicas, devido o seu requerimento

para virulência de fungos como *A. fumigatus* e *C. neoformans* (BIEN & ESPENSHADE, 2010). Assim, as diferenças substanciais entre os mecanismos entre os ortólogos das SREBPs de fungos e humanos indicam a possibilidade destas proteínas serem alvos específicos em potencial para drogas terapêuticas. Levando em conta todas estas observações e o fato de que nada sobre hipóxia tem sido descrito para as espécies de *Paracoccidioides* até o momento, o objetivo do nosso trabalho é caracterizar as respostas do fungo *Paracoccidioides* à condição de hipóxia, tanto pela regulação da proteína da família SREBP, SrbA, quanto por análises proteômicas em condições que mimetizam ou não a condição de hipóxia. A elucidação de tais respostas será relevante no contexto das relações patógeno-hospedeiro, pois poderá elucidar moléculas importantes para a adaptação do fungo durante o processo de patogênese.

2) Materiais e métodos

2.1- Condições de cultivo de *Paracoccidioides* (Pb01) e *A. fumigatus*

Células leveduriformes de *Paracoccidioides*, Pb01, (ATCC MYA – 826) foram mantidas *in vitro* à 36°C em meio Fava-Netto por 7 dias (FAVA NETTO et al, 1969). Quando necessário, as células foram cultivadas em meio Fava-Netto líquido por 72 h e posteriormente transferidas para meio mínimo MMcM (RESTREPO & JIMENEZ, 1980) acrescentado com o reagente cloreto de cobalto, CoCl₂ (Sigma-Aldrich) na quantidade de 300 µM, à 36°C.

Células selvagens (WILLGER et al, 2008), mutante nulo para o gene *srbA* (Δ *srbA*) (WILLGER et al, 2008) e as complementadas com o homólogo do gene *srbA* de *Paracoccidioides*, Pb01 (neste estudo), de *A. fumigatus*, foram cultivadas em meio mínimo com glicose (GMM – *glucose minimal medium*) à 37°C com suplementos apropriados como previamente descrito (SHIMIZU & KELLER, 2001). Para o preparo de meios sólidos, 1,5% de Agar foi adicionado antes do procedimento de esterilização.

2.2 - Análises *in silico* de proteínas da família SREBP

As sequências deduzidas de aminoácidos das proteínas da família SREBP foram obtidas pelo banco de dados do NCBI – GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) por

homologia com a sequência protéica de Sre1p, de *S. pombe*. A procura por domínios conservados e segmentos transmembrana foram realizados a partir do banco de dados PFAM (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) e do software Phobius (<http://phobius.sbc.su.se/>), respectivamente. A montagem da figura foi feita em proporção exata aos tamanhos das proteínas e local/ quantidade dos domínios e segmentos transmembrana.

2.3 - Análise de PCR quantitativa em tempo real em *Paracoccidioides* (Pb01) e em *A. fumigatus*

A análise de expressão diferencial dos transcritos regulados pela condição de hipóxia utilizando cloreto de cobalto (CoCl₂) em células leveduriformes de *Paracoccidioides*, Pb01, foi realizada para os genes *srbA* (*PbsrbA*), enolase (*eno*), lanosterol 14-alfa-demetilase (*erg11*), C-5 esterol desaturase (*erg3*), C-22 esterol desaturase (*erg5*) e acetil-CoA carboxilase (*acc*). Os RNAs foram extraídos utilizando o reagente Trizol (*Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*) e os cDNAs foram obtidos usando o kit *High Capacity RNA-to-cDNA* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*). Ocleotídeos utilizados foram sintetizados com base na sequência de éxons e íntrons (*intron-spanning*) para amplificação somente de produtos do DNA complementar e não genômico. Quando não foi possível utilizar esta estratégia, os RNAs foram tratados com DNase I (*Invitrogen*) antes da síntese de cDNA. A especificidade de cada par de oligonucleotídeos foi anteriormente confirmada pela visualização de um único produto de PCR em gel de agarose 1,2% e pela curva de dissociação dos produtos amplificados. Os cDNAs foram submetidos à análises por qRT-PCR em tempo real das condições controle e experimental. Os cDNAs foram diluídos 1:5 em água e o qRT-PCR foi realizado utilizando-se mistura *SYBR green qPCR mix* (*Applied Biosystems, Foster City, CA*) no sistema *Step One Plus real-time PCR system* (*Applied Biosystems Inc.*). As reações foram realizadas em triplicata para cada amostra de cDNA e os dados normalizados com o gene constitutivo que codifica para alfa tubulina como controle endógeno. Os níveis de expressão relativa dos genes de interesse foram calculados utilizando-se o método de curva padrão para quantificação relativa dos genes (BOOKOUT et al, 2006). Os resultados foram validados pelo teste *t*-Student's, sendo consideradas diferenças significativas as amostras que apresentaram $P < 0,05$.

Em *A. fumigatus*, as linhagens selvagem (CEA10), mutante para o gene *srbA* (Δ *srbA*) e a linhagem complementada geneticamente com *PbsrbA*, foram cultivadas em

meio mínimo com glicose (GMM) por 18 h. Após coleta por filtração à vácuo, as células foram liofilizadas por 24 h e submetidas a lise com pérolas de vidro para posterior extração de RNAs e PCR quantitativa em tempo real como descrito previamente (WILLGER et al, 2012). Moléculas de RNA foram extraídas usando TRIsure reagent (Bioline) de acordo com protocolo do fabricante e subsequentemente purificadas (Qiagen-*RNeasy plant minikit*). A contaminação com DNA genômico foi removida com tratamento utilizando Turbo DNase I (Ambion). Um total de 500 µg de RNA tratado com DNase foi utilizado para síntese de cDNA pelo kit transcriptase reversa Quantitec (Qiagen). A PCR em tempo real foi realizada com um controle sem DNA em cada análise. Cada amostra foi testada em triplicata e os dados normalizados com o gene referência actina. Os dados são apresentados relativos à normalização da expressão dos genes no controle. Os oligonucleotídeos utilizados neste estudo estão na Tabela S1.

2.4 - Ensaio de complementação gênica de *PbsrbA* em células de *A. fumigatus*: linhagens, processo de transformação e ensaios confirmatórios

A sequência de nucleotídeos do gene homólogo *srbA* de *A. fumigatus* em *Paracoccidioides*, *Pb01*, foi obtida por análise de homologia no banco de dados do NCBI – GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e posterior busca da sequência no banco de dados genômico de *Paracoccidioides* (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html). Oligonucleotídeos foram construídos para amplificação da sequência codificante do gene *srbA* do *Pb01*, com sua região terminadora, e para a região promotora do gene que codifica para gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase de *Aspergillus nidulans* (*AngpdA*). Os fragmentos foram ligados um ao outro por PCR de fusão (YU et al, 2004). Subseqüentes passos de purificação e concentração deste produto, utilizando kits de purificação de DNA (Qiagen), resultaram em quantidade suficiente de material para transformação de *A. fumigatus*. Além disso, oligonucleotídeos específicos para o gene que codifica para oritidina-5-fosfato descarboxilase de *A. parasiticus* (*pyrG*) foram utilizados para amplificação da sequência gênica que, após purificação, foram utilizadas nos procedimentos de co-transformação de *A. fumigatus* e posterior seleção dos clones transformados com *AngpdA+PbsrbA*.

A geração de protoplastos e transformação da linhagem mutante nula para *srbA* de *A. fumigatus* com *AngpdA+PbsrbA*, foi mediada por polietilenoglicol (PEG) e realizada conforme descrito anteriormente em Willger et al. (2012). Esporos do fungo foram germinados por 10 h à 23°C. Após digestão enzimática com a enzima liticase por 6 h, os protoplastos foram obtidos. Um total de 10 µg de cada produto de PCR purificada, *AngpdA+PbsrbA* e *pyrG*, foram co-transformados em 1×10^7 protoplastos de *A. fumigatus* em um volume final de 100 µL. Os transformantes foram plaqueados em meio seletivo onde somente as células transformadas com *pyrG* cresceram (seleção auxotrófica para uridina). Posteriormente, várias colônias foram rastreadas por PCR convencional para identificação de potenciais transformantes positivos para *AngpdA+PbsrbA*, utilizando oligonucleotídeos que amplificam a região promotora de *AngpdA*. Além disso, o número de inserções de *PbsrbA* e do gene *pyrG* foi confirmada pela técnica de *southern blot* com sistema de marcação por digoxigenina (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) como previamente descrito (CRAMER & LAWRENCE, 2003). A fim de eliminação de heterocárions, cada transformante foi coletado e um único esporo isolado no mínimo duas vezes (técnica de *single spore*). Os oligonucleotídeos utilizados neste estudo estão na Tabela S1.

2.5 - Condições de crescimento de linhagens de *A. fumigatus* em normóxia e hipóxia

Colônias positivas foram submetidas à condição de normóxia e hipóxia. Condições de normóxia foram consideradas níveis atmosféricos de oxigênio (~21% O₂). Condições de hipóxia foram adquiridas em câmara de oxigênio (Invivo₂ 400, Ruskinn). A câmara foi mantida à 37°C e à 1% do nível de O₂ utilizando uma mistura de gás contendo 1% O₂, 5% CO₂ e 94% N₂.

O crescimento das colônias foi quantificado como previamente descrito (WILLGER et al, 2008). Brevemente, alíquotas de 5 µL contendo 10⁶ conídeos de *A. fumigatus*, de cada linhagem estudada, foram colhidas de placas GMM (meio mínimo com glicose) e pingadas no centro de placas com meio mínimo com glicose sólido (GMM sólido). Os conídios foram coletados com 20 mL de uma solução de 0,01% Tween 80 estéril e filtrados com, também estéreis, filtros de duas camadas do tipo *mira cloth* (EMD Biosciences, La Jolla, CA). Depois, os esporos foram quantificados. As placas foram cultivadas sob condições de normóxia e hipóxia à 37 °C. O diâmetro

das linhagens selvagem (CEA10), mutante nulo para *srbA* (Δ *srbA*) e linhagens transformadas com *PbsrbA* [5 (1.2) e 7 (1.1)] foram medidos a cada 24 h por até 96 h (4 dias). A média do diâmetro a cada 24 h foi calculado por 3 culturas independentes. Os resultados foram validados pelo teste *t*-Student's, sendo consideradas diferenças significativas as amostras que apresentaram $P < 0,05$ (*).

2.6 - Análise por *western blot* em *Paracoccidioides* (Pb01) e *A. fumigatus*

Um total de 30 μ g de proteínas totais da fase leveduriforme de *Paracoccidioides* (Pb01) foram utilizadas nas análises por *western blot*. Células com 2, 6, 12 e 24h sob tratamento em hipóxia com o agente químico CoCl_2 foram colhidas e as proteínas extraídas em uma solução contendo 20 mM de Tris-HCl, pH 8.8, 2 mM CaCl_2 (FONSECA et al, 2001) suplementado com inibidores de proteases (*Protease Inhibitor*, GE Healthcare, Uppsala, Sweden). As concentrações protéicas foram determinadas usando o reagente Bradford (Sigma-Aldrich) e albumina de soro bovina foi utilizada como padrão (BRADFORD, 1976). Depois de separadas por SDS-PAGE (12%) e transferidas para membrana de nitrocelulose, as proteínas foram coradas com vermelho de *Ponceau*. As membranas foram bloqueadas em tampão de bloqueio (PBS1X – tampão fosfato-salino, 5% (p/v) de leite desnatado e 0,1% (v/v) de Tween 20) e incubadas com o anticorpo primário por 2h. O anticorpo contra a proteína Erg6 (esterol C-24 metiltransferase) (PEREIRA et al, 2010), 2010) foi reagido com anticorpo secundário anti-coelho acoplado à fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich) e revelados com 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate/nitrobluetetrazolium (BCIP/NBT). Após análises de densitometria das bandas, utilizando o software AphaEaseFC (*Alpha Innotech Corporation*), a intensidade de *pixels* (%) de cada banda foi detectada e um gráfico foi gerado. O tempo de 12 h foi o único no qual houve diferença de expressão da proteína Erg6 em condição de hipóxia (CoCl_2) comparada à condição controle e, então, foi escolhido para a análises proteômica em gel bi-dimensional.

Em *A. fumigatus*, conídios de cada linhagem foram cultivados sob condições de normóxia em meio mínimo com glicose líquido (GMM líquido) por 18 h. A partir deste ponto, as culturas foram cultivadas em normóxia e hipóxia por mais 1 h. Após filtração das células usando papel de filtro *Whatman* número 54 em funis com sucção leve, a massa fúngica foi lavada com solução salina 0,96% contendo PMSF (phenylmethylsulfonylfluoride) (MP Biomedicals) à 1%. A massa celular foi congelada

e liofilizada por 8 h. Após maceração em nitrogênio líquido, em torno de 60 à 80 mg de massa fúngica foi ressuspendido em um tampão contendo uréia e detergente (OSHEROV & MAY, 1998) com adicional 100 mM de PMSF, 10 µL/ mL de inibidor de protease HALT (Thermo Scientific) e outro detergente na concentração final de 0,1%, o Igepal. A amostra foi centrifugada por 5 min à 16000 x g e o sobrenadante quantificado utilizando o ensaio protéico Pierce (660 nm), com albumina de soro bovina (BSA) como padrão. Após separação de 40 µg de proteínas por SDS-PAGE (10%) (Bio-Rad), as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond-C Extra; Amersham Biosciences). O anticorpo anti-SrbA, que reconhece a porção N-terminal da proteína SrbA de *A. fumigatus* (dos aminoácidos 1 à 275), foi utilizado na titulação de 1: 27000 como anticorpo primário e o anticorpo secundário anti-coelho acoplado à fosfatase alcalina (Abcam), à uma diluição de 1: 5000. A quimioluminescência foi medida seguindo incubação da membrana com substrato *Tropix CPD Star* (Applied Biosystems) com *Immun-star enhancer* (Bio-Rad) e a imagem captada com sistema de fotocimentação *FluorChem FC2* (Alpha Innotech).

2.7 - Susceptibilidade de *A. fumigatus* à antifúngicos

A susceptibilidade das linhagens selvagem (CEA10), mutante nulo para *srbA* e transformadas com *PbsrbA* de *A. fumigatus* foram submetidas a um teste de sensibilidade às drogas antifúngicas fluconazol e voriconazol. A estratégia utilizada foi plaquear um total de 10^5 conídios em 20 mL de meio de cultura sólido RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) e fazer um orifício no centro das placas com a parte oposta de ponteiros estéreis onde foi possível pipetar, até o volume de 20 µL, diferentes concentrações das duas drogas, fluconazol e voriconazol. As placas foram incubadas à 37°C e o crescimento foi monitorado por 24 e 48 h por observação direta do halo em volta do local onde as drogas foram depositadas. Nenhuma diferença nos resultados foi observada entre 24 e 48 h. O experimento foi realizado em triplicata para cada condição.

2.8 – Produção de biomassa por linhagens de *A. fumigatus* em condições de privação do metal ferro

A produção de biomassa (peso celular seco) das linhagens selvagem (CEA10), mutante nulo para o gene *srbA* e transformada com *PbsrbA* de *A. fumigatus* foi

analisada conforme descrito previamente (BLATZER et al, 2011). Um total de 10^8 esporos de cada linhagem foi inoculada em 200 mL de meio mínimo líquido com glicose (GMM líquido) em condições de privação (- Fe) ou não (+Fe, 30 μ M) do metal ferro. Após 24 h de incubação à 37°C e agitação de 200 rpm, as células foram coletadas por filtração usando papel de filtro *Whatman* número 54 em funis com sucção leve. A massa fúngica de cada linhagem foi congelada e liofilizada por 24 h. O peso seco foi determinado. Os valores são a média de 3 experimentos independentes. A condição de privação de ferro foi obtida por privar esse metal do meio de cultura além de tratar todas as vidrarias e materiais utilizados com HCl 2N para remoção de traços do metal (GAUTHIER et al, 2010). Depois de quarenta minutos em contato com o ácido, as vidrarias foram lavadas exaustivamente até o pH retornar à neutralidade.

2.9 - Análises do crescimento, viabilidade e dosagem de glicose em *Paracoccidioides* (Pb01) sob condições de hipóxia (CoCl₂)

A viabilidade e crescimento das células leveduriformes de *Paracoccidioides* (Pb01) foram determinados usando azul de Tripán em triplicata biológica. As células foram incubadas em meio mínimo MMcM à 36 °C acrescido ou não com o reagente cloreto de cobalto (300 μ M) por 72 h. A viabilidade e o crescimento foram determinados nos pontos 0, 6, 12, 24, 36, 48 e 72 h. As barras de erro representam os desvios padrões das réplicas biológicas. Para análise estatística, o teste t de *Student* foi realizado e o valor de $p < 0.05$ foi considerado como a probabilidade do resultado ser estatisticamente significativo indicado pelo asterisco (*). Além disso, a concentração de glicose no sobrenadante de cultura em hipóxia foi determinada por atividade enzimática (Doles – produtos laboratoriais, Goiânia-GO-Brasil).

2.10 -Análise proteômica em gel bi-dimensional de *Paracoccidioides* (Pb01) sob condição de hipóxia (CoCl₂)

Seguindo as condições de crescimento das células de Pb01 em hipóxia usando o CoCl₂ (300 μ M), as células foram colhidas nos pontos de 12 h e as proteínas extraídas conforme metodologia descrita anteriormente. Para cada amostra, 350 μ g de proteínas, foram submetidas à corrida eletroforética. Para remoção de contaminantes não protéicos como detergentes, sais, lipídios e ácidos nucleicos foi utilizado o sistema comercial 2-D

Clean-Up kit (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) de acordo com o fabricante. As amostras protéicas foram tratadas com 250 µL de tampão contendo 7 M de uréia, 2M de tiouréia, CHAPS 2%, 65 mM DTT, anfólitos pH 3-11 e azul de bromofenol.

Os géis bidimensionais (2D) foram realizados de acordo com o método de Rabilloud (1988) com pequenas modificações. Amostras contendo as diferentes frações protéicas foram solubilizadas em tampão de lise contendo uréia 7 M, tiouréia 2 M, CHAPS 2%, 65 mM DTT, anfólitos pH 3-11 e azul de bromofenol. As amostras foram aplicadas em fitas immobiline (13 cm de comprimento, *GE Healthcare Biosciences*), pH 3-11. A focalização isoeétrica foi realizada em sistema de eletroforese Multiphor-II (*GE Healthcare*). Seguindo a focalização isoeétrica, as fitas foram reduzidas com 1% de DTT e alquiladas em 2,5 % de iodoacetamina em tampão de equilíbrio (uréia 6 M, pH 6.8; 30 % de glicerol e 2 % de SDS) (HERBERT et al, 2001). A segunda dimensão foi realizada em gel de poliacrilamida segundo Laemmli (1970) Os géis de poliacrilamida foram corados por azul de *Coomassie* (*PlusOne Comassie Tablets PhastGel Blue R-350, GE Healthcare*), segundo metodologia padrão. As imagens dos géis 2D, em triplicata, foram obtidas e processadas em sistema de fotodocumentação *Image Scanner III* (*GE Healthcare*). A detecção, quantificação volumétrica, edição de massas moleculares e pontos isoeétricos das proteínas identificadas nos géis foram obtidos utilizando o *Image Master Platinum* (*GE Healthcare*).

O teste ANOVA foi aplicado para comparar as diferenças entre as condições testadas. Comparações com um valor de $p < 0.05$ foram consideradas significantes. As proteínas selecionadas foram removidas dos géis para digestão peptídica. Primeiramente, as proteínas foram tratadas com acetonitrila 100% e posteriormente lavadas duas vezes com acetonitrila 50 % e 25 mM de NH_4HCO_3 (tampão bicarbonato de amônio). O processo de redução das amostras foi realizado pelo uso de DTT (10 mM) em NH_4HCO_3 (25 mM) por 30 min e alquilação com iodoacetaminada (55 mM) em NH_4HCO_3 (25 mM). A digestão enzimática foi realizada utilizando 25 mM de NH_4HCO_3 contendo tripsina (12.5 ng/µL) (Roche, *Molecular Biochemicals*). Os peptídeos digeridos foram extraídos dos géis em 50% de acetonitrila, 1% de ácido trifluoracético e posteriormente em acetonitrila 100%. Os peptídeos trópicos foram purificados por cromatografia de fase reversa (*ZipTips® C18 PipetteTips, Milipore, Bedford, MA, USA*) e submetidos à análise em espectrômetro de massas, MALDI-Q-TOF MS (*Synapt, Waters, Manchester, UK*) que geraram espectros para análise por MS e MS/MS. Todos os espectros foram processados usando NE ProteinLynx Global

Server software (*Waters-Micromass, Manchester, UK*). A busca no banco de dados para identificação de cada proteína foi realizada submetendo-se a massa monoisotópica dos peptídeos ao programa MASCOT (MASCOT 2.1.03, *Matrix Science, UK*) (<http://www.matrixscience.com>), usando o banco de dados não redundante do *National Center for Biotechnology Information, NCBI*. As proteínas identificadas foram agrupadas em categorias funcionais e são mostradas nas Tabelas 1 e 2.

3) Resultados

3.1 – *Paracoccidioides* possui homólogo da proteína SREBP

O sensoriamento de oxigênio nos fungos foi primeiramente caracterizado na levedura de fissão *S. pombe* sendo recentemente caracterizada em outros fungos. As proteínas da família SREBP são as principais reguladoras deste estresse reguladas pelos níveis de oxigênio e esteróis nas células fúngicas. Nossos resultados demonstram que *Paracoccidioides* contém homólogos da proteína SREBP apresentando domínios característicos das mesmas (Figura 1). A análise *in silico* revelou que a proteína SREBP de *Paracoccidioides*, denominada *SrbA*, contém um domínio de ligação ao DNA altamente conservado em dupla hélice formando um “loop” em sua porção N-terminal, com o resíduo único de tirosina, presente no domínio de ligação ao DNA característico destas proteínas, também conservado. Além disso, *PbSrbA* contém um domínio transmembrana ao longo da cadeia peptídica que, provavelmente, está envolvido na manutenção da proteína no retículo endoplasmático.

Com intuito de entender melhor como *Paracoccidioides* responde à hipóxia e se o mecanismo é similar às respostas de outros fungos, a análise da expressão relativa do gene *srbA* de *Paracoccidioides*, *Pb01*, foi realizada por PCR em tempo real. Vários tempos de incubação do fungo em condições controle e utilizando o agente químico que mimetiza hipóxia, o CoCl_2 , foram analisados (Figura 2). Os resultados demonstram que a expressão gênica de *PbsrbA* é aumentada em condições de hipóxia em relação ao controle, em torno de 1h / 1 h 30 min indicando que em *Paracoccidioides*, esta proteína pode estar envolvida nas respostas do fungo à condição de estresse hipóxico.

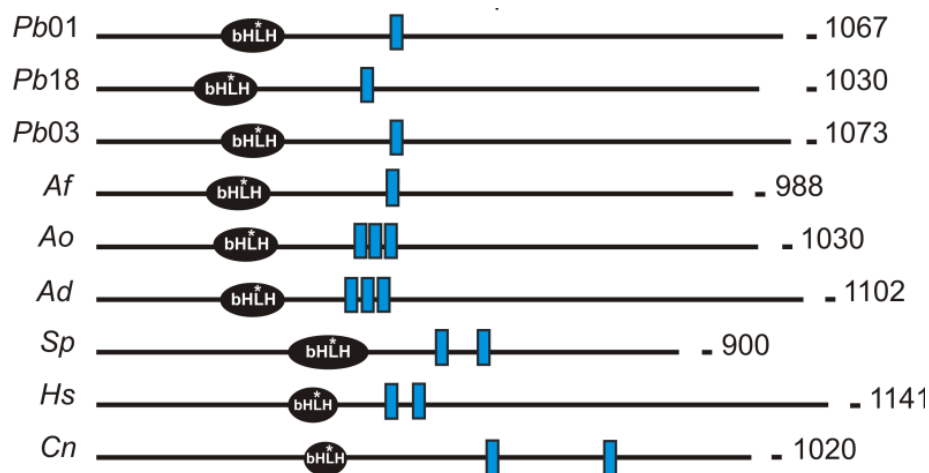


Figura 1. Domínios protéicos preditos da SREBP em *Paracoccidioides* (proteína Srba) e em outros organismos. Os dados das proteínas da família SREBP foram obtidos com as sequências do banco de dados do NCBI – Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para *Paracoccidioides* Pb01 (XP_002794199), Pb18 (EEH47197) e Pb03 (EEH18275), assim como para outros eucariotos como *Aspergillus fumigatus* (EDP53790), *Arthroderma otae* (XP_002850076), *Aspergillus dermatitidis* (XP_002629502), *Schizosaccharomyces pombe* (NP_595694), *Homo sapiens* (NP_004590) e *Cryptococcus neoformans* (XP_567526). O domínio de ligação ao DNA, bHLH (*basic helix-loop- helix leucine zipper DNA-binding domain*) foi obtido pelo banco de dados PFAM (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) e os segmentos transmembrana (barra azul), usando o software Phobius (<http://phobius.sbc.su.se/>). O comprimento de cada proteína, em aminoácidos, é mostrado à direita. *, resíduo único de tirosina presente no domínio bHLH.

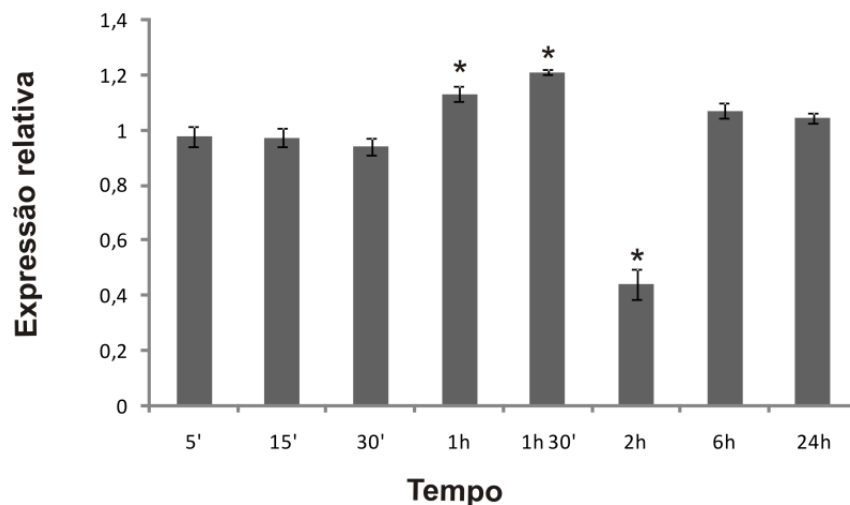


Figura 2. Cinética de expressão de *srbA* em células leveduriformes do *Pb01* em hipóxia (CoCl_2). As células leveduriformes de *Pb01* foram incubadas de 5 min à 24 h em meio mínimo sem (controle) e com 300 μM de CoCl_2 (hipóxia) e a expressão relativa do gene *srbA* foi analisada por qRT-PCR. Os dados foram normalizados usando o gene constitutivo que codifica para alfa tubulina como controle endógeno e são apresentados comparando-se com cada controle experimental fixado no valor 1. Teste t *Student* foi usado para análise estatística e as barras de erro representam o desvio padrão das três réplicas biológicas. * representa $p \leq 0,05$. *PbsrbA*, gene homólogo da SREBP de *S. pombe* e *A. fumigatus*, *sre1* e *srbA*, respectivamente.

3.2 – *PbsrbA* é funcional na linhagem mutante nulo para *srbA* (Δ *srbA*) de *A. fumigatus*

A fim de avaliarmos a funcionalidade da proteína *PbSrbA*, um ensaio de complementação gênica na linhagem Δ *srbA* de *A. fumigatus*, importante fungo oportunista causador da aspergilose em imunocomprometidos, foi realizada. As colônias de *A. fumigatus* transformadas com *PbsrbA* e a estratégia utilizada para transformação e rastreamento das colônias são mostrados na Figura 3. O primeiro rastreamento foi realizado a partir da técnica de PCR convencional e os resultados mostram que algumas colônias possuíam a sequência de *PbsrbA*. O uso de oligonucleotídeos específicos para sequência promotora da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*AngpdA*) e para a sequência relativa à *AngpdA+PbsrbA*, confirmam que o produto fusionado foi transformado com sucesso (Figura 3B). Um segundo rastreamento foi realizado (Figura 4). Colônias positivas do primeiro rastreamento foram submetidas às condições de normóxia e hipóxia a fim de selecionarmos possíveis colônias com *PbsrbA* funcional. Sabe-se que a linhagem Δ *srbA* de *A. fumigatus* não cresce em condições de hipóxia. Os resultados mostram que diferentes colônias transformadas com *PbsrbA* restauraram parcialmente o fenótipo da colônia selvagem indicando participação da *PbsrbA* nos mecanismos de restauração do crescimento e viabilidade do fungo *A. fumigatus* em condições de hipóxia (Figura 4).

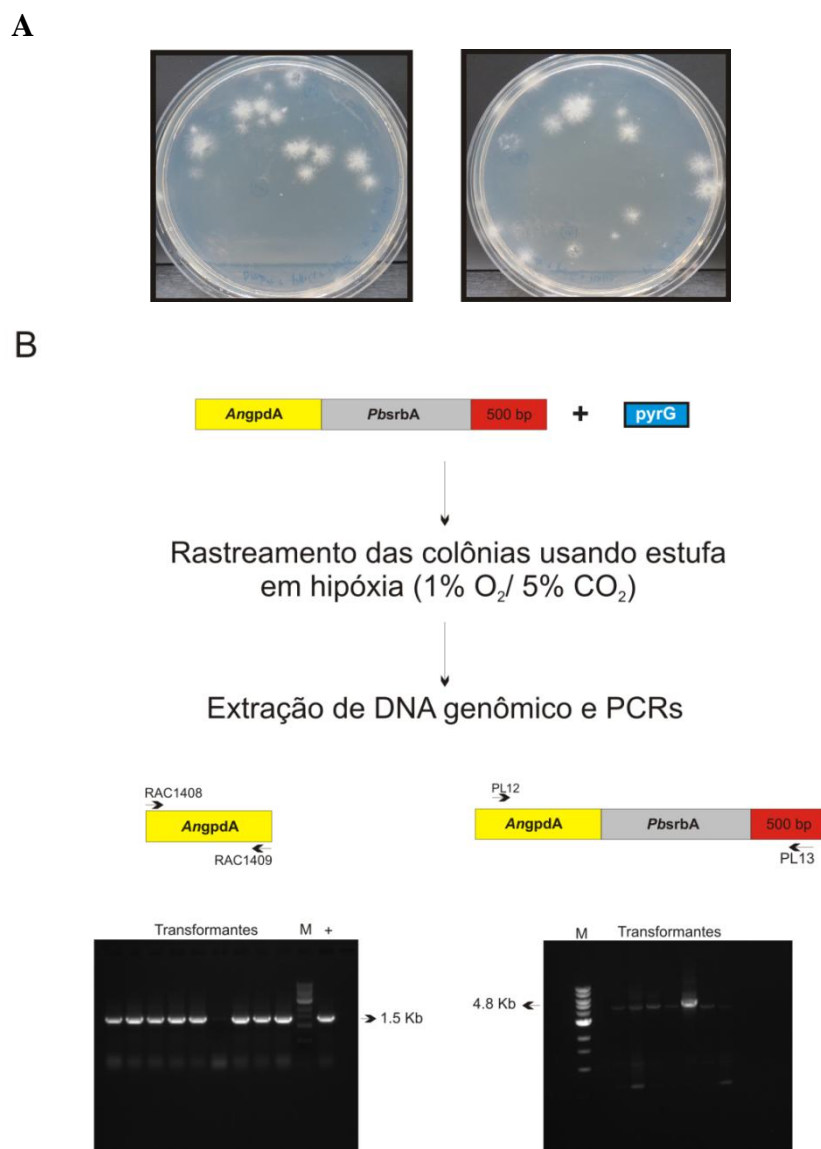


Figura 3. Transformação da linhagem $\Delta srbA$ de *A. fumigatus* com *srbA* de *Paracoccidioides*. (A) Algumas colônias crescidas em meio mínimo (GMM) após transformação da linhagem $\Delta srbA$ de *A. fumigatus* com *srbA* de *Paracoccidioides*. Estas colônias seguiram para rastreamento utilizando estufa de oxigênio em condição de hipóxia à 36 °C. (B) Estratégia utilizada para inserir e selecionar a sequência de *PbsrbA*. O produto de clonagem foi composto pelas sequências do promotor do gene que codifica para gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *A. nidulans* (*AngpdA*), da sequência do gene que codifica para a proteína da família SREBP, *srbA*, de *Paracoccidioides* (*PbsrbA*) e a região terminadora de *PbsrbA*. A transformação foi realizada concomitantemente com o gene de seleção *pyrG* (orotidina-5'-fosfato descarboxilase) de *A. parasiticus*, utilizado para rastrear as colônias transformadas em meio de cultura específico (colônias auxotróficas para uridina). Mais abaixo, a figura mostra o gel das PCRs das colônias rastreadas em estufa de oxigênio (hipóxia) com colônias positivas para a sequência promotora *AngpdA* (1.5 kb) e para *AngpdA+PbsrbA* (4.8 Kb). Os oligonucleotídeos utilizados para a PCR são mostrados acima de cada gel e na Tabela S1.

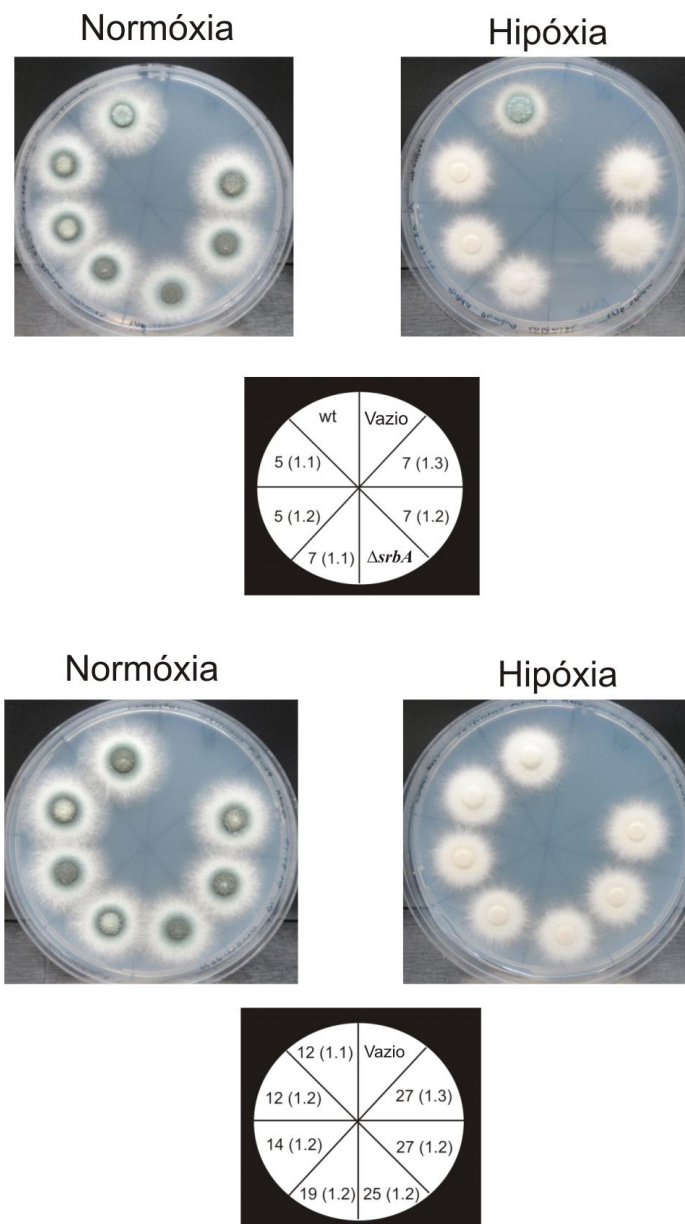


Figura 4. Rastreamento das colônias transformadas em condições de normóxia e hipóxia. Após transformação das colônias $\Delta srbA$ de *A. fumigatus* com *srbA* de *Paracoccidioides* e confirmação da inserção da sequência utilizando PCR convencional (Figura 3), um total de 12 colônias foram submetidas a mais um rastreamento em condições de normóxia e hipóxia. O mesmo número de esporos (10^6) foi inoculado em meio mínimo sem uridina (GMM) por 48 h à 37 °C. *wt*: tipo selvagem; $\Delta srbA$: mutante nulo para o gene *srbA* de *A. fumigatus*; números: diversas colônias $\Delta srbA$ de *A. fumigatus* transformadas com *srbA* de *Paracoccidioides*. Cada número representa uma colônia diferente pré-selecionada por PCR convencional e, entre parênteses, são as indicações dos isolamentos de um único esporo das respectivas colônias (*single spore*). O mutante nulo para o gene *srbA* de *A. fumigatus* é incapaz de crescer em condições de hipóxia e as colônias geneticamente complementadas com *PbsrbA* mostraram restauração parcial do defeito no crescimento do mutante nulo para *srbA* de *A. fumigatus* em condições de hipóxia.

3.3 – Inserções de *PbsrBA* e *pyrG* no genoma de *A. fumigatus* e restauração do crescimento radial da linhagem Δ *srbA* por *PbsrBA*

O número de cópias inseridas no genoma de *A. fumigatus* das linhagens transformadas com *PbsrBA* foi analisado nas colônias positivas do segundo rastreamento (Figura 5). Os resultados mostram que melhores resultados foram obtidos para duas colônias, denominadas 5 (1.2) e 7 (1.1), nas quais apenas duas cópias da inserção *PbsrBA* foram detectadas no genoma da linhagem 5 (1.2) e, três cópias de *pyrG*, no genoma da linhagem 7 (1.1) (Figura 5). Desse modo, tais colônias foram submetidas às condições de normóxia e hipóxia, à 37 °C, para que a taxa de crescimento radial destas colônias, em cada condição, fosse analisada a cada 24 h (Figura 6). Os resultados mostram que, após 96 h de crescimento, as linhagens 5 (1.2) e 7 (1.1) restauraram o crescimento da linhagem selvagem e parcialmente o seu fenótipo (Figura 6A). Como esperado, a linhagem Δ *srbA* de *A. fumigatus* não cresceu em condições de hipóxia e a análise do crescimento radial das linhagens selvagem, Δ *srbA* e transformadas com *PbsrBA* de *A. fumigatus* a cada 24 h, confirmou que a restauração do crescimento das linhagens transformadas com *PbsrBA*, em condições de hipóxia, foi estatisticamente significativa (Figura 6B). Apesar de *PbsrBA* restaurar completamente o crescimento do fungo, a coloração das colônias foi parcialmente ou nada restaurada em condições de hipóxia indicando que a conidiação do fungo foi afetada (Figura 6A).

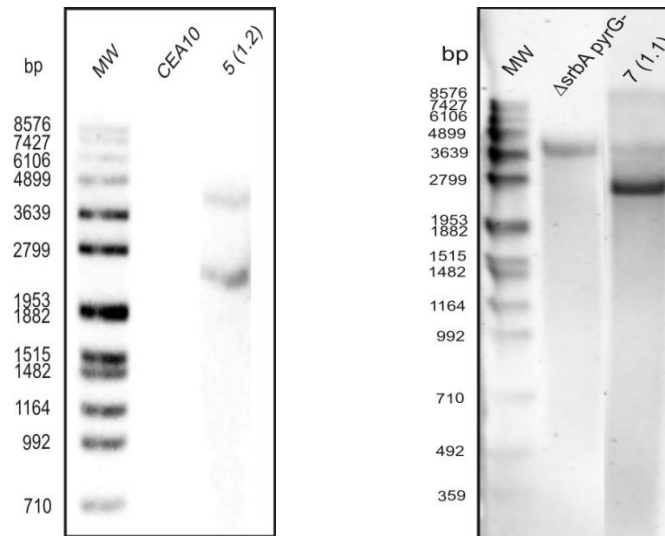
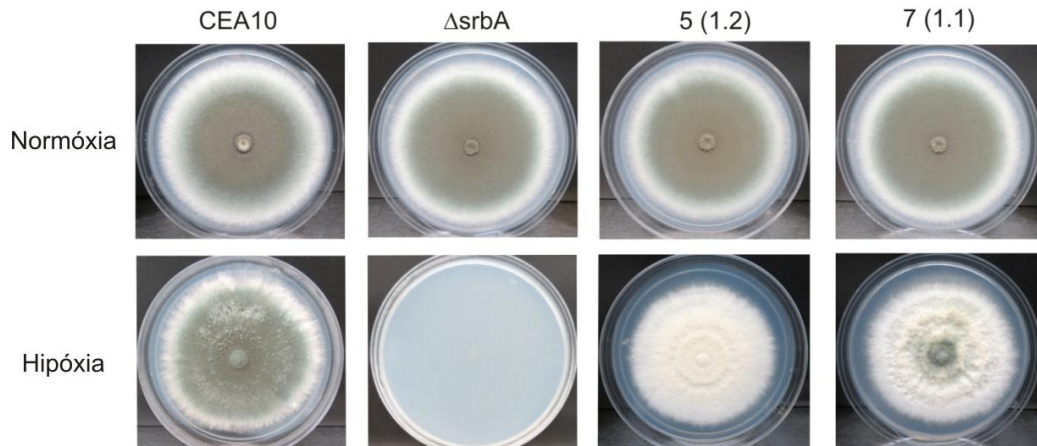


Figura 5. Integração e número de cópias de *PbsrbA* e do gene de seleção *pyrG* nas linhagens Δ srbA de *A. fumigatus* co-transformadas com *PbsrbA* e *pyrG*. (A) Confirmação pela técnica de *southern blot* de apenas duas inserções de *PbsrbA* no genoma de *A. fumigatus* para a colônia 5. Uma sonda que reconhece o promotor fusionado à *PbsrbA* foi utilizada. (B) Confirmação pela técnica de *southern blot* de apenas três inserções do gene de seleção *pyrG* no genoma de *A. fumigatus* para a colônia 7. Uma sonda que reconhece o parte do gene *pyrG* foi utilizada. MW: marcador de peso molecular; CEA10: linhagem selvagem; Δ srbA *pyrG*⁻: linhagem mutante para o gene *srbA* de *A. fumigatus* que tem o gene *pyrG* com mutação funcional; 5 (1.2) e 7 (1.1): colônias Δ srbA de *A. fumigatus* transformadas com *PbsrbA*.

A



B

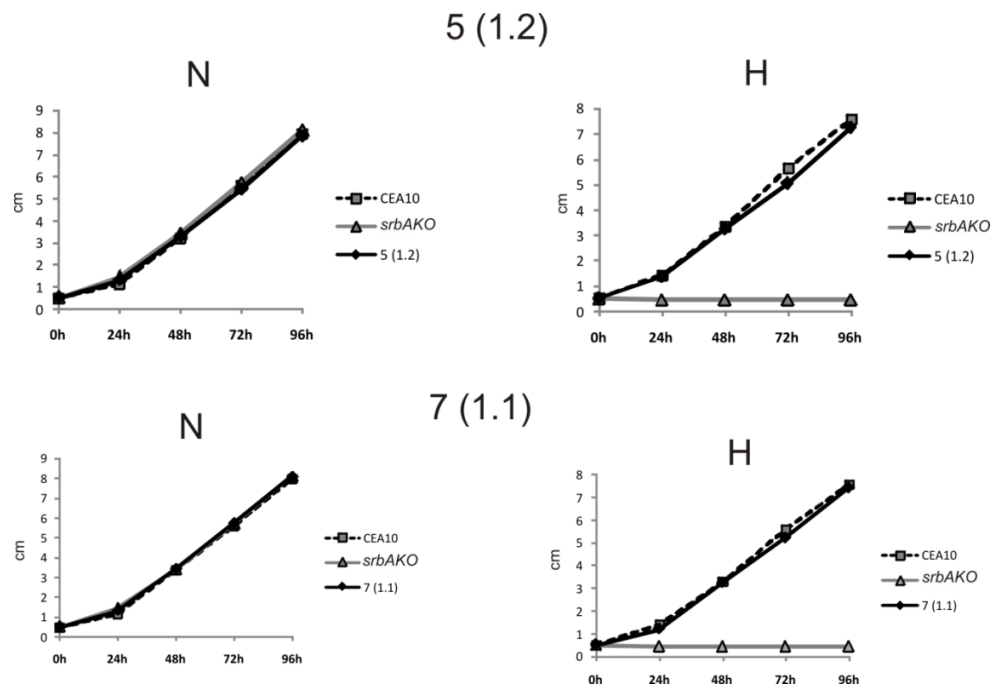


Figura 6. Crescimento radial das colônias selvagem, $\Delta srbA$ de *A. fumigatus* e linhagens complementadas geneticamente com *PbsrbA*. (A) Um total de 10^6 esporos de cada linhagem foi inoculado em placas com meio GMM sem uridina, por 96 h à 37 °C, em condições de normóxia e de hipóxia, e o crescimento monitorado pelo diâmetro de cada colônia, a cada 24 h (B). Teste t *Student* foi usado para análise estatística e as barras de erro representam o desvio padrão das três réplicas biológicas. * representa $p \leq 0.05$. CEA10: tipo selvagem de *A. fumigatus*; $\Delta srbA$: mutante nulo para o gene *srbA* de *A. fumigatus*; 5 (1.2) e 7 (1.1): colônias $\Delta srbA$ de *A. fumigatus* complementadas geneticamente com *PbsrbA*. As colônias geneticamente complementadas com *PbsrbA* mostraram restauração do defeito no crescimento do mutante nulo para *srbA* de *A. fumigatus* em condições de hipóxia.

3.4 – Linhagem de *A. fumigatus* complementada com *PbsrbA* expressa transcrito e proteína

A colônia 5 (1.2) foi escolhida para teste de expressão do transcrito e proteína de *PbsrbA*. Os resultados mostram que a colônia expressa tanto o transcrito quanto a proteína de *PbsrbA* em condição de hipóxia (Figura 7). A análise de expressão do transcrito, pela técnica de PCR em tempo real, mostra que, conforme esperado, *PbsrbA* não foi detectada nas linhagens selvagem e Δ *srbA* de *A. fumigatus*. Além disso, a expressão de *PbsrbA* aumenta conforme o tempo de exposição do fungo ao estresse hipóxico (Figura 7A). Em nível protéico, a expressão da proteína *PbSrbA* também foi detectada na linhagem 5 (1.2), após 1 h de exposição do fungo na condição de hipóxia (Figura 7B). O anticorpo policlonal que reconhece a porção N-terminal de *AfSrbA* foi utilizado. Os resultados mostram que, assim como na linhagem selvagem de *A. fumigatus*, a linhagem 5 (1.2) possui, em condições de hipóxia, maior abundância da proteína *SrbA* em sua forma clivada. O tamanho das porções íntegra e clivada foi comparável às variações existentes entre a proteína predita e nativa da *SrbA* de *A. fumigatus* mostrando que, também para *PbSrbA*, há uma pequena variação do tamanho predito com o experimental seguindo as mesmas proporções encontradas para *AfSrbA* (WILLGER et al, 2012).

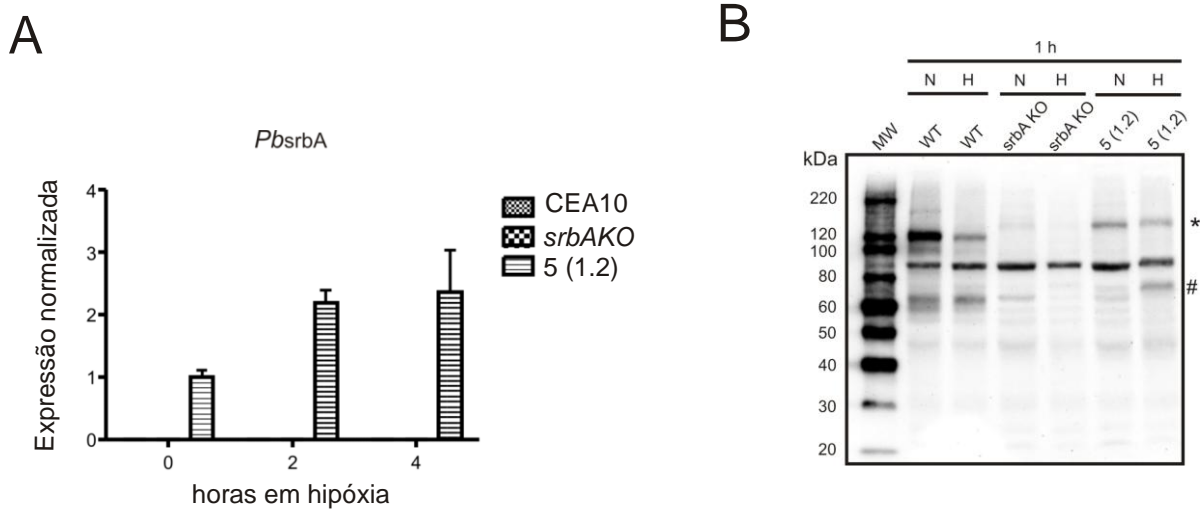


Figura 7. Expressão do transcrito e proteína de *PbsrbA* na linhagem $\Delta srbA$ de *A. fumigatus* transformada com *PbsrbA* [colônia 5 (1.2)] em condições de normóxia e hipóxia. (A) Análise da expressão do transcrito de *PbsrbA* por PCR quantitativa em tempo real. Após crescimento das linhagens em normóxia, por 18 h, as colônias foram incubadas por 0, 2 e 4 h em condição de hipóxia à 36 °C. A análise foi verificada utilizando oligonucleotídeos que amplificam a sequência de *PbsrbA*. Os dados foram normalizados usando o gene constitutivo que codifica para actina como controle endógeno e são apresentados comparando-se com cada controle experimental (em normóxia) fixado no valor 1. Nenhuma expressão foi obtida nas linhagens selvagem (CEA10) e mutante para *srbA* de *A. fumigatus* (*srbAKO*). Teste t *Student* foi usado para análise estatística e as barras de erro representam o desvio padrão das três réplicas biológicas. * representa $p \leq 0.05$. (B) Análise da expressão da proteína de *PbsrbA* pela técnica de *western blot*. Após crescimento das linhagens em normóxia, por 18 h, as colônias foram incubadas por 1 h em condições de normóxia e de hipóxia à 36 °C. O anticorpo policlonal que reconhece a porção N-terminal de *AfSrbA* foi utilizado. A banda maior que 120 kDa corresponde à proteína de *PbsrbA* na qual foi detectada em sua forma íntegra (*) e clivada (#), acima de 60 kDa.

3.5 – Linhagem de *A. fumigatus* complementada com *PbsrbA* mostra resistência à drogas antifúngicas

Com base em dados prévios publicados para a proteína SrbA de *A. fumigatus* (*AfSrbA*), a susceptibilidade à drogas antifúngicas das linhagens geneticamente complementada com *PbsrbA*, selvagem e Δ *srbA* de *A. fumigatus*, foi analisada (Figura 8). *AfSrbA* medeia a resistência de *A. fumigatus* à classes de drogas antifúngicas que têm como alvo o ergosterol da membrana plasmática fúngica. Os resultados demonstram que, assim como para *AfSrbA*, *PbSrbA* está envolvida na resistência do fungo aos efeitos deletérios das drogas visto que a falha no crescimento dos esporos de *A. fumigatus* na presença de concentrações crescentes de voriconazol e fluconazol foram restauradas na linhagem complementada com *PbsrbA* (Figura 8).

3.6 – Linhagem de *A. fumigatus* complementada com *PbsrbA* mostra restaurar a produção de biomassa em condição de privação de ferro

Dados prévios indicam que além da proteína *AfSrbA* participar da regulação da expressão de genes da via do ergosterol, como as enzimas desta via são também dependentes do íon ferro, *AfSrbA* está adicionalmente envolvida na regulação positiva da aquisição de ferro em *A. fumigatus*. A partir desta informação, com o objetivo de testar se a linhagem complementada com *PbsrbA* também tinha essa função, experimentos de produção de biomassa das linhagens selvagem, Δ *srbA* e 5 (1.2) de *A. fumigatus* foram conduzidos em condições repletas e depletadas do íon ferro (Figura 9). Os resultados demonstram que *PbsrbA* restaura a produção de biomassa da linhagem mutante para *srbA* sendo o crescimento comparável ao da linhagem selvagem do fungo (Figura 9).

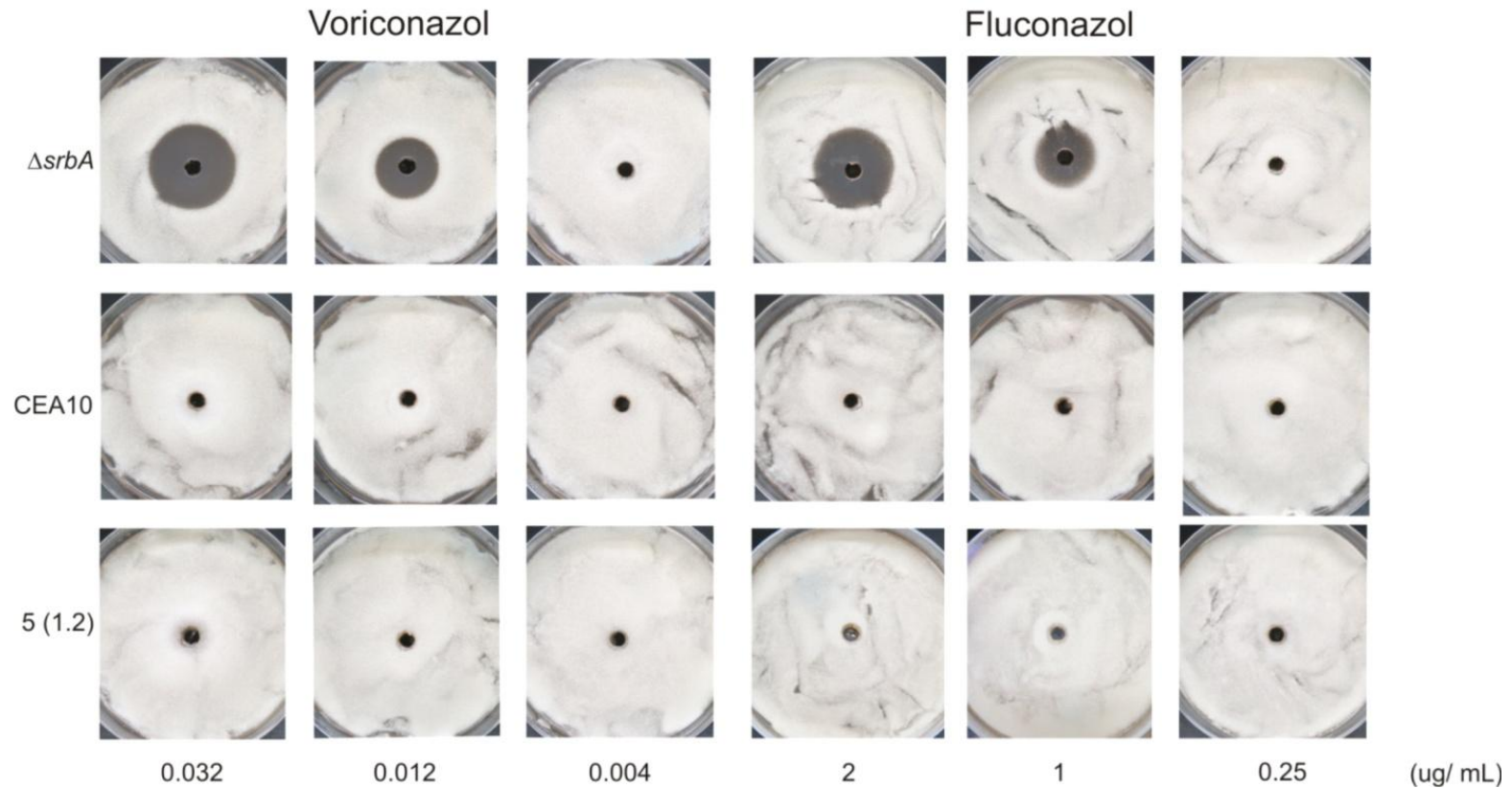


Figura 8. Sensibilidade das linhagens selvagem, $\Delta srbA$ e complementada com *PbsrBA* [5 (1.2)] aos antifúngicos voriconazol e fluconazol. Três concentrações dos antifúngicos voriconazol e fluconazol foram utilizadas baseadas em testes previamente publicados para *AfsrBA* (WILLGER et al., 2008). Um total de 10^5 esporos de cada linhagem foi inoculado em meio RPMI/ MOPS em triplicata para cada dosagem e linhagem indicadas. As drogas foram depositadas no centro de cada placa, mantidas à 37 °C por 24 h quando o crescimento foi monitorado pela formação do halo em volta do local onde as drogas foram depositadas. O experimento foi realizado em triplicata mas somente uma placa representativa de cada condição é mostrada. A linhagem selvagem assim como a restaurada com *PbsrBA* mostrou resistência aos antifúngicos enquanto que a linhagem $\Delta srbA$ foi sensível, em ambas as condições.

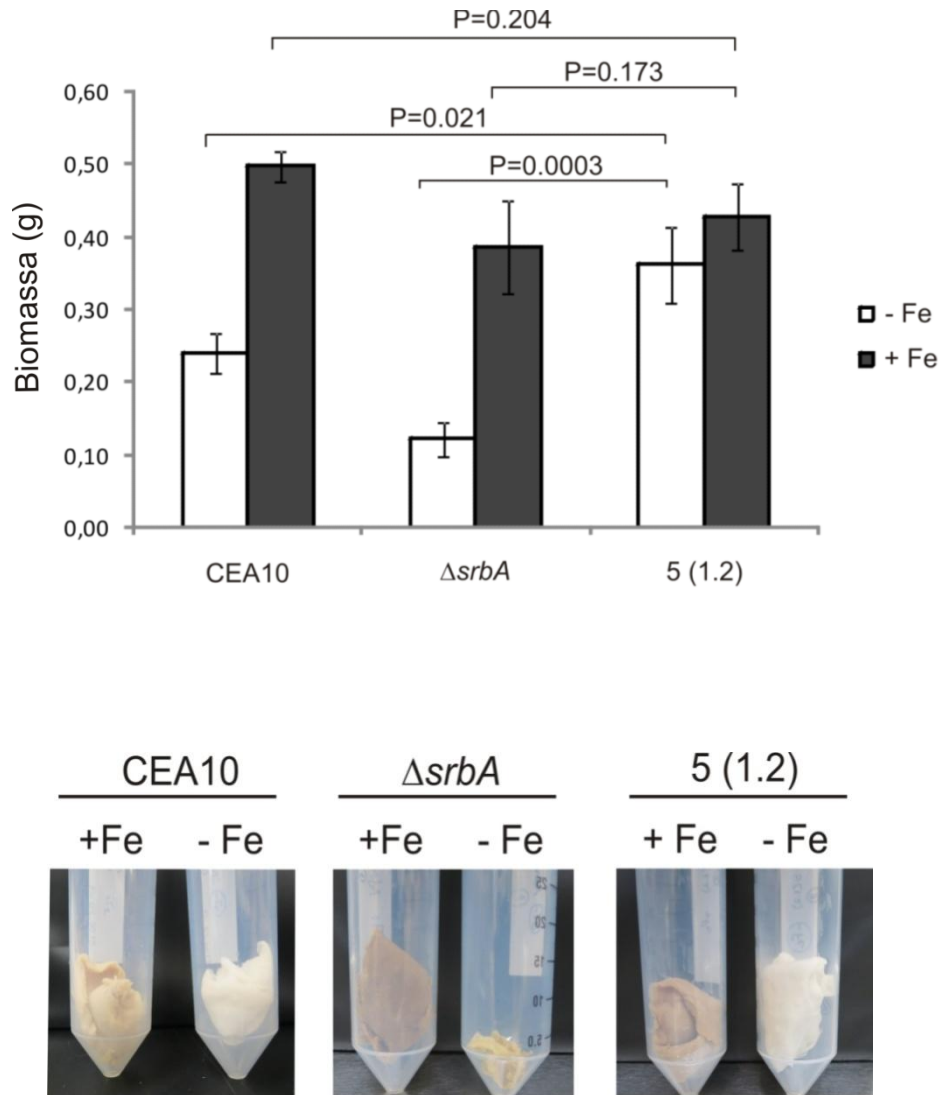


Figura 9. Produção de biomassa pelas linhagens selvagem, $\Delta srbA$ e 5 (1.2) de *A. fumigatus* à condição de privação de ferro. Um total de 10^8 esporos das linhagens selvagem, $\Delta srbA$ e complementada com *PbsrbA* [5 (1.2)] foram inoculados em 200 mL de meio mínimo GMM em condições de privação de ferro ou não, em triplicata. A verificação do crescimento foi realizada após 48 h de incubação. As células foram coletadas (filtração à vácuo), liofilizadas por 24 h e a massa anotada. Teste t *Student* foi usado para análise estatística e as barras de erro representam o desvio padrão das três réplicas biológicas. * representa $p \leq 0.05$.

3.7 – *Paracoccidioides*, *Pb01*, responde à condição de hipóxia

O fato de que *Paracoccidioides* possui um homólogo da proteína da família SREBP e que, em *A. fumigatus*, esta proteína mostrou ser funcional restaurando o crescimento, a sensibilidade à drogas antifúngicas e a produção de biomassa em condições de depleção do íon ferro, as respostas de *Paracoccidioides* à condição de hipóxia foram investigadas. Primeiramente, o crescimento e a viabilidade de células leveduriformes do *Pb01* crescidas em meio mínimo com e sem adição do agente químico que mimetiza hipóxia, o CoCl_2 , foram determinados usando a coloração por azul de Tripán (Figura 10). Os resultados demonstram que o crescimento das células foi mais significativamente diferente a partir de 36 h de tratamento com o agente químico (Figura 10A). Além disso, os dados não apresentaram diferença significativa na viabilidade das células que se mantiveram vivas em uma taxa maior que 80% dentro de 72 h analisadas utilizando 300 μM de CoCl_2 (Figura 10B).

Com base nestes dados, alguns pontos de incubação das células de *Paracoccidioides* em condição de hipóxia foram selecionados para análise da expressão de transcritos relacionados com vias descritas serem afetadas em condições de hipóxia e da proteína Erg6, representante da via de biossíntese de ergosterol nos fungos (Figuras 11 e 12). A cinética de expressão relativa de representantes das vias metabólicas da glicólise, biossíntese de ergosterol e de ácidos graxos, reguladas em outros fungos em condições de hipóxia, foi realizada em *Paracoccidioides*, *Pb01*, pela técnica de PCR em tempo real. Os resultados mostram que a condição que mimetiza hipóxia regula a expressão dos genes *eno* (enolase), *erg11* (lanosterol 14-alfa-demetilase), *erg3* (C-5 esterol desaturase), *erg5* (C-22 esterol desaturase) e *acc* (acetil-CoA carboxilase) principalmente nos tempos de 2 e 6 h (Figura 11). Mais ainda, a expressão da proteína Erg6, envolvida na biossíntese de ergosterol, foi verificada nos extratos de proteínas totais das células controle e em hipóxia nos tempos de 2, 6, 12 e 24 h. Apenas em 12 h houve diferença de expressão da proteína, indicada pela análise densitométrica da intensidade da banda, de 55 kDa, expressa em *pixels* (Figura 12).

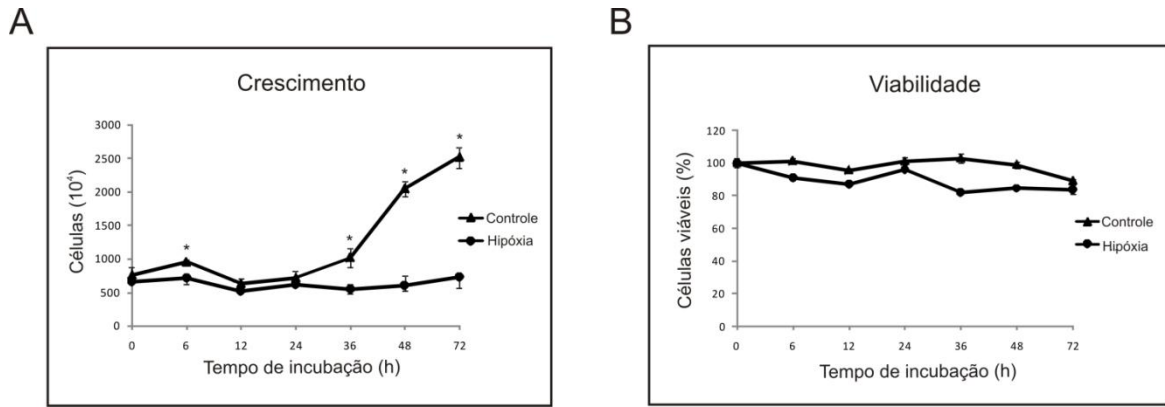


Figura 10. Crescimento e viabilidade de células leveduriformes do *Pb01* sob condições controle e de hipóxia. As células foram incubadas pelo tempo de 0 à 72 h em meio mínimo sem (controle) e com 300 μM de CoCl_2 (hipóxia) para determinação do crescimento e viabilidade das células. (A) Crescimento celular. (B) Viabilidade celular. Ambas foram determinadas por azul de Tripán. A barra de erros representa os desvios padrão da triplicata biológica e a diferença significativa ($p \leq 0.05$) é representada pelo asterisco (*).

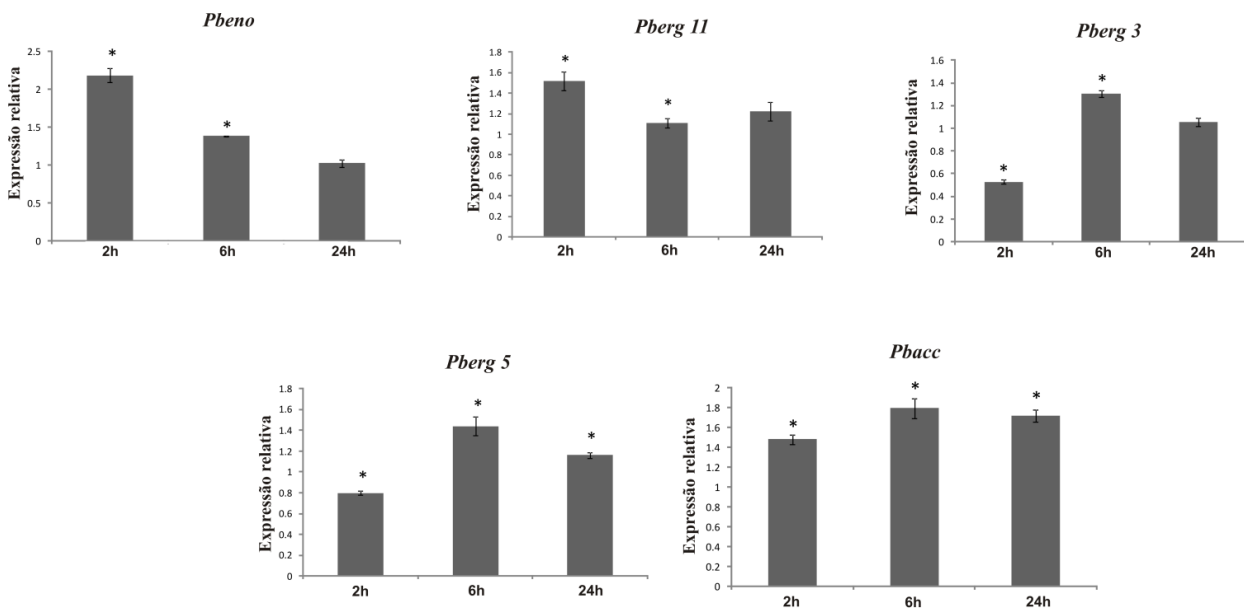


Figura 11. Cinética de expressão relativa dos genes *Pbeno*, *Pberg11*, *Pberg3*, *Pberg5* e *Pbacc* nas células leveduriformes de *Pb01* em condições de hipóxia (CoCl_2). As células leveduriformes foram incubadas por 2, 6 e 24 h em meio mínimo sem (controle) e com 300 μM de CoCl_2 (hipóxia) e a expressão relativa dos genes *eno* (enolase), *erg11* (lanosterol 14-alfa-demetilase), *erg3* (C-5 esterol desaturase), *erg5* (C-22 esterol desaturase) e *acc* (acetil-CoA carboxilase) foi analisada. Os dados foram normalizados usando o gene constitutivo que codifica para alfa tubulina como controle endógeno e são apresentados como expressão relativa comparando com cada controle experimental fixado no valor 1. Teste t *Student* foi usado para análise estatística e as barras de erro representam o desvio padrão das três réplicas biológicas. * representa $p \leq 0.05$.

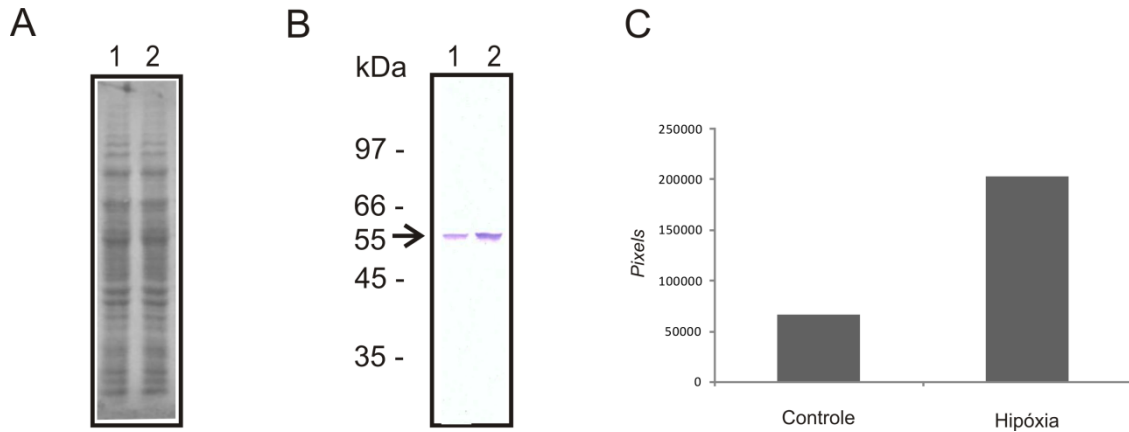


Figura 12. Análise por western blot de *PbErg6* sob condição de hipóxia. (A) Proteínas (30µg) de células leveduriformes de *Pb01* incubadas à 36 °C por 12 h sem tratamento (controle-linha 1) ou em hipóxia (linha 2) foram separadas por eletroforese unidimensional e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. (B) As proteínas foram bloqueadas e a banda de 55 kDa foi detectada usando o anticorpo anti-*PbErg6* (PEREIRA et al, 2010). (C) Análise densitométrica das bandas do *imunoblotting* após detecção dos *pixels* expressos em valor de densidade integrada (*IDV - Integrated Density Values*) usando o programa AphaEaseFC.

3.8 – Respostas proteômicas de *Paracoccidioides*, *Pb01*, às condições de hipóxia

Paracoccidioides, *Pb01*, mostrou regular níveis de transcritos e proteínas em resposta ao tratamento com CoCl_2 . Levando em conta o tempo onde houve aumento da expressão da proteína *Erg6* além dos dados das curvas de crescimento e viabilidade, o tempo de 12 h foi escolhido para a análise proteômica em gel bi-dimensional (Figura 13). Extratos protéicos das células do *Pb01* sob condições controle e tratamento com CoCl_2 foram utilizados. A análise de imagem dos géis mostrou que um total de 568 proteínas foram pareadas entre o controle e o tratamento sendo que, após análise estatística, 94 proteínas foram diferencialmente expressas, 11 proteínas visualizadas somente na condição controle e 30 proteínas somente nos géis relativos à hipóxia. Porém, deste total, 70, 7 e 23 proteínas foram identificadas com sucesso entre as diferencialmente expressas, visualizadas somente na condição controle e somente em hipóxia, respectivamente, totalizando 100 proteínas identificadas até o momento (Figura

13). Destas, um total de 14 foram representadas por mais de uma isoforma (diferentes massas moleculares e pontos isoelétricos). Tais isoformas geralmente originam-se de modificações pós-traducionais como fosforilação, glicosilação, acetilação, acilação, ubiquitinação ou clivagem proteolítica (GORG et al, 2004).

As proteínas identificadas foram agrupadas em classes funcionais como demonstrado nas Tabelas 1 e 2. O número de proteínas identificadas em cada classe funcional conforme o nível de expressão detectado (aumentado ou diminuído em condição de hipóxia) é mostrado na Fig. 14. O fungo *Paracoccidioides*, *Pb01*, aumenta o nível de expressão de proteínas envolvidas com o metabolismo de aminoácidos, carboidratos, ácidos graxos (biossíntese), etanol (biossíntese) e endereçamento protéico. Por outro lado, o fungo diminui a expressão de proteínas envolvidas com processos de obtenção de energia no geral tais como processos oxidativos (de ácidos graxos e etanol), ciclo do ácido tricarboxílico e transporte de elétrons (Figura 14).

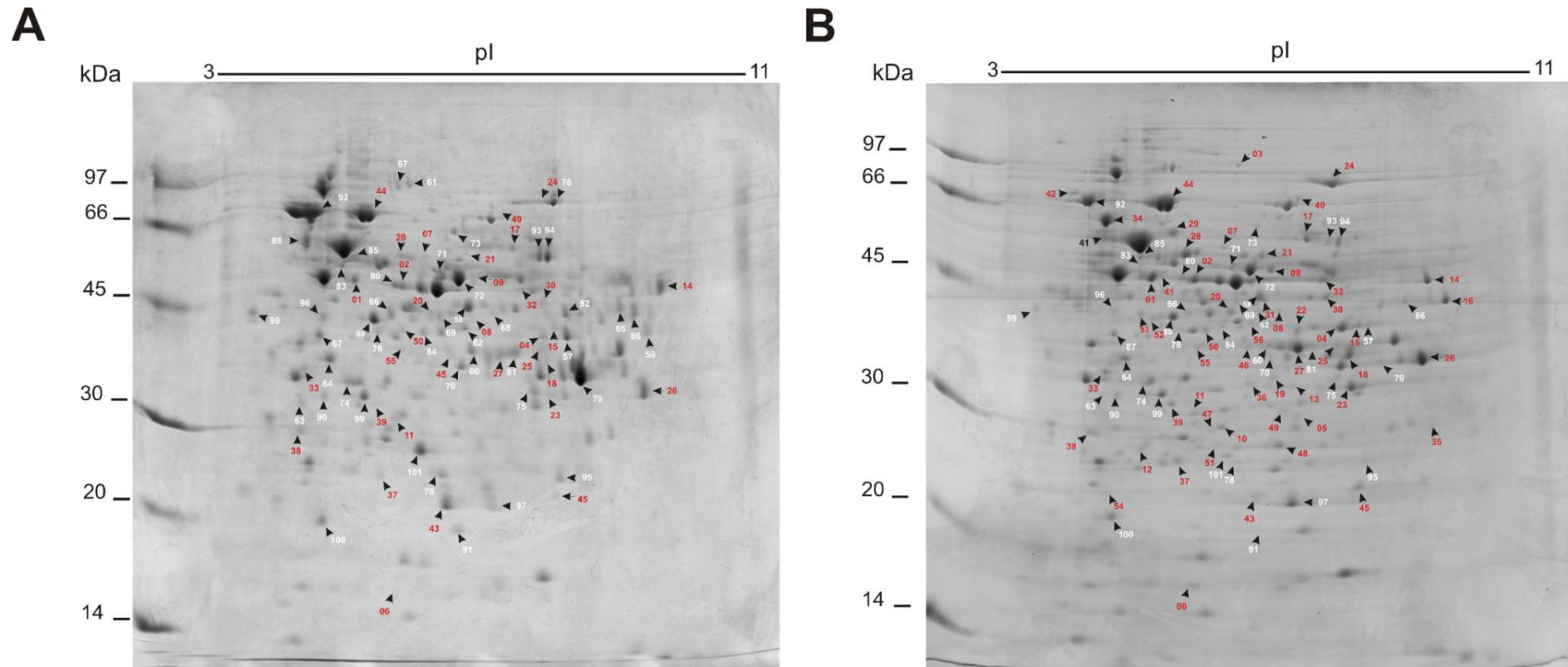


Figura 13. Gel representativo das proteínas de *Paracoccidioides* (Pb01) nas condições controle e hipóxia (CoCl_2). As células leveduriformes de Pb01 foram incubadas com 300 μM CoCl_2 (hipóxia) e sem o agente químico (controle experimental), por 12 h em meio mínimo MMcM. (A) Controle experimental e (B) hipóxia, ambos representantes de triplicatas biológicas. Um total de 300 μg de proteínas de cada condição foram submetidas à eletroforese em gel bidimensional usando fitas com gradientes de pH imobilizados de pH 3 à pH 11 na primeira dimensão. Na segunda dimensão, géis SDS-PAGE de 12% foram usados e as proteínas foram visualizadas por coloração com azul de *Comassie*. As proteínas reguladas diferencialmente foram identificadas pelo MALDI-Q-TOF MS. As proteínas identificadas são numeradas e listadas na Tabela 1 e 2. As numerações em vermelho indicam proteínas com expressão aumentada e as em branco, expressão reduzida durante hipóxia.

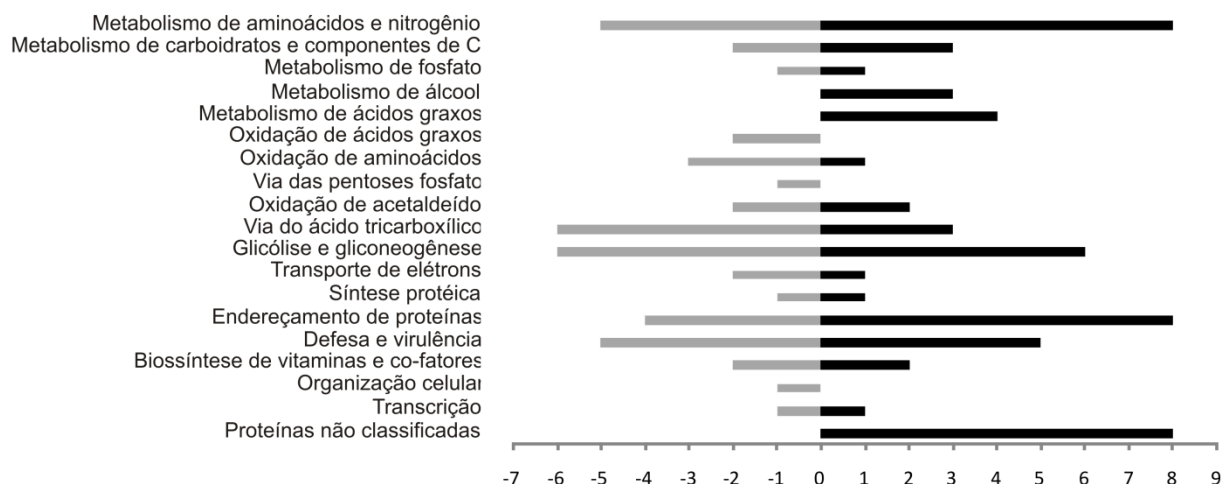


Figura 14. Frequência de proteínas do Pb01 observadas após hipóxia. As frequências foram contabilizadas e agrupadas de acordo com a classificação funcional (Tabelas 1 e 2). Barras à esquerda e à direita representam a frequência em números de proteínas identificadas em cada classe funcional, respectivamente, no qual números negativos significam redução no nível de expressão e positivos, aumento no nível de expressão.

3.9 – *Paracoccidioides*, Pb01, consome menos glicose em condições de hipóxia

O consumo de glicose em *Paracoccidioides* incubado ou não com o CoCl_2 foi determinado durante 72 h de crescimento fúngico (Figura 15). O objetivo desta análise foi verificar se as respostas de *Paracoccidioides* eram similares às anteriormente descritas para o fungo *A. fumigatus* onde o consumo de glicose foi detectado ser reduzido em condições de hipóxia e a produção de compostos típicos da fermentação, como o acetato, lactato e etanol, aumentada (BARKER et al, 2012). Os resultados mostram que, de fato, o consumo de glicose foi intenso nas duas primeiras horas de hipóxia e depois foi reduzido (Figura 15) condizente com a possível produção de compostos da fermentação como o etanol, observada pelo aumento da expressão de proteínas envolvidas com sua síntese (Tabela 1).

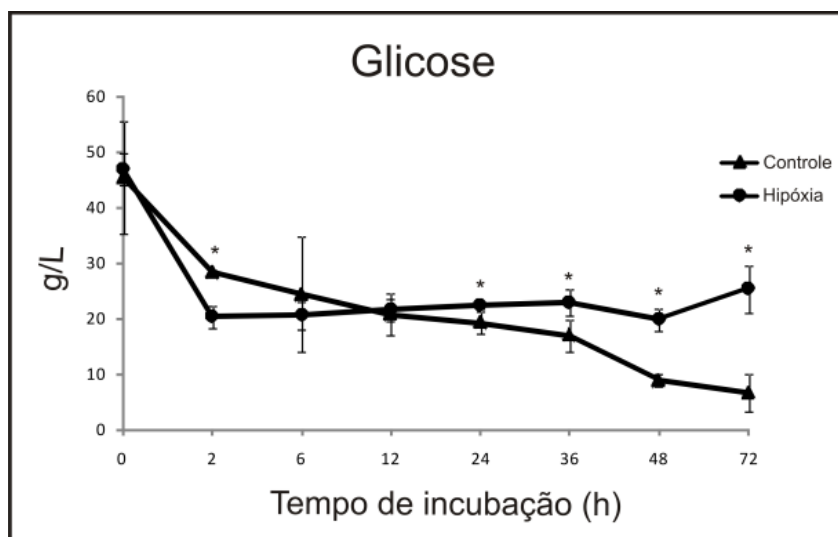


Figura 15. Análise do consumo de glicose em células leveduriformes do Pb01. As células foram incubadas pelo tempo de 0 a 72 h em meio mínimo sem (controle) e com 300 μ M de CoCl_2 (hipóxia) para determinação do consumo de glicose (g/L). A barra de erros representa os desvios padrão da triplicata biológica e a diferença significativa ($p \leq 0.05$) é representada pelo asterisco (*).

4) Discussão

O entendimento das condições encontradas pelos fungos patogênicos humanos no microambiente *in vivo* é uma linha de investigação promissora para futuras estratégias de combate a estes micro-organismos. A importância da hipóxia neste contexto tem sido relevante desde que a adaptação a microambientes com baixos níveis de oxigênio pode ser um atributo de virulência crítico de muitos fungos patogênicos humanos (BUTLER, 2013; CHANG et al, 2007; CHUN et al, 2007; GRAHL & CRAMER, 2010; WILLGER et al, 2008). Neste estudo, apresentamos a primeira caracterização das respostas à condição de hipóxia de *Paracoccidioides*, na linhagem Pb01. O fungo demonstrou ter um homólogo funcional das SREBPs em *A. fumigatus* que, em outros fungos é crucial para biossíntese de esteróis, viabilidade, crescimento e virulência sob condições de hipóxia (CHANG et al, 2007; WILLGER et al, 2008). Adicionalmente, Pb01 regulou a expressão de transcritos e proteínas em condições que mimetizam hipóxia sugerindo que vias metabólicas específicas são alteradas na tentativa de compensar os efeitos da hipóxia que, em parte, podem ser resultado dos mecanismos de regulação da proteína SrbA de *Paracoccidioides*.

Análises *in silico* revelaram que homólogos das SREBPs foram encontrados em três linhagens de *Paracoccidioides*, nas quais o banco de dados genômico é disponível até o momento (Fig. 1). Após análise da expressão diferencial aumentada do transcrito para *PbsrbA* em células de *Pb01* sob condições de hipóxia (CoCl_2) (Fig. 2), testes para determinação funcional da *SrbA*, do isolado *Pb01*, mostraram que a proteína é funcional em *A. fumigatus* restaurando o crescimento da linhagem mutante para *srbA* (Fig. 3, 4, 5, 6 e 7). Estudos em *C. neoformans* e *A. fumigatus* mostraram que os mutantes nulos para SREBP de cada espécie é incapaz de crescer em hipóxia e causar doenças letais em modelos murinos de infecção fúngica (BIEN et al, 2009; CHANG et al, 2007; CHUN et al, 2007; WILLGER et al, 2008). Desse modo, a funcionalidade da proteína *PbSrbA* é de extrema importância para o estudo da biologia e patogênese de *Paracoccidioides*, o que torna nosso estudo mais atrativo.

As SREBPs são fatores de transcrição capazes de regular um número significativo de genes nos fungos. Em *A. fumigatus*, por exemplo, aproximadamente 12% dos genes são afetados pela atividade de *SrbA* no qual regula principalmente genes das vias de biossíntese de ergosterol, aquisição de ferro, glicólise, biogênese ribossomal e biossíntese de aminoácidos sugerindo ser um regulador transcricional que pode atuar como positivo ou negativo da transcrição (BLATZER et al, 2011). Nos experimentos de complementação gênica da linhagem mutante para *srbA* de *A. fumigatus* com *PbsrbA*, nossos resultados mostram que além de funcional, a *PbsrbA* foi capaz de proporcionar resistência do fungo às drogas voriconazol e fluconazol (Fig. 8). Drogas tais como o voriconazol e fluconazol têm como alvo o ergosterol da membrana plasmática fúngica. Dado um grande número de genes associados com a biossíntese de ergosteróis regulados pela *SrbA* de *A. fumigatus* (WILLGER et al, 2008), sugerimos que, também em *Paracoccidioides*, *SrbA* provavelmente é requerida para a resistência às drogas regulando a expressão de genes desta via. De fato, genes da via do ergosterol são regulados em *Paracoccidioides*, *Pb01*, em condições de hipóxia (CoCl_2), detectados por PCR quantitativa (Fig. 11) porém, não podemos afirmar ainda que esta regulação venha diretamente da atividade da *SrbA*.

Adicionalmente, a proteína SREBP é a principal reguladora da homeostase de ferro em *A. fumigatus* no que diz respeito à aquisição deste metal durante adaptação às condições de hipóxia e microambientes depletados deste metal (BLATZER et al, 2011). Também em *C. neoformans*, experimentos de perfis transcricionais com a linhagem mutante nulo para SREBP também sugerem que esta proteína está envolvida em

processos de aquisição de ferro (CHANG et al, 2007; JUNG & KRONSTAD, 2008). Aqui, a *PbsrbA* foi capaz de restaurar a produção de biomassa de *A. fumigatus* em condições de depleção de ferro, comparáveis ao tipo selvagem (Fig. 9). Estes resultados mostram que, muito provavelmente, a *SrbA* de *Paracoccidioides* também está envolvida em processos de homeostase de ferro. Os mecanismos e com quais proteínas a *PbSrbA* regula esta homeostase ainda precisam ser investigados.

Com intuito de investigar melhor quais vias metabólicas são afetadas em *Paracoccidioides* durante hipóxia, uma análise proteômica em gel bi-dimensional foi realizada com células leveduriformes do isolado *Pb01* submetidas ou não ao tratamento com CoCl_2 (condição de hipóxia). Os resultados mostraram que o fungo regula vias metabólicas importantes para sua adaptação à condição de estresse de forma semelhante à previamente descrita para outros fungos. Aqui, *Pb01* aumenta principalmente a expressão de proteínas envolvidas com o metabolismo de aminoácidos, carboidratos, ácidos graxos, endereçamento de proteínas, glicólise e produção de etanol (fermentação) e diminui a expressão de proteínas envolvidas com processos de obtenção de energia tais como oxidação de aminoácidos, ácidos graxos e acetaldeído, via do ciclo tricarboxílico (TCA), gliconeogênese e transporte de elétrons. Em *A. fumigatus*, *C. albicans* e *C. neoformans* estudos têm demonstrado que os fungos regulam positivamente, em hipóxia, genes e proteínas envolvidos com glicólise, biossíntese de ergosterol e metabolismo de ácidos graxos. Adicionalmente, em *A. fumigatus* e *C. albicans*, a fermentação e o metabolismo de ferro são parte das respostas induzidas pelos fungos durante condição de hipóxia. Contrariamente, *A. fumigatus* e *C. albicans* reduzem a expressão de genes e proteínas envolvidas com o ciclo do ácido cítrico e cadeia mitocondrial (síntese de ATP) (ASKEW et al, 2009; BARKER et al, 2012; CHUN et al, 2007; SETIADI et al, 2006; SYNNOTT et al, 2010; VODISCH et al, 2011). Um detalhe interessante é que em *A. fumigatus* as respostas tardias à hipóxia em nível protéico mostram que a respiração oxidativa volta a ser induzida (VODISCH et al, 2011). As respostas do *Pb01* se assemelham à destes fungos indicando que o fungo responde à condição de hipóxia e que esta caracterização pode levar a descoberta dos mecanismos utilizados pelo fungo durante sua adaptação a tal estresse durante a patogênese fúngica. As características se assemelham às respostas iniciais à hipóxia em *A. fumigatus*, indicando mudanças na rota energética e de produção de compostos tais como o etanol, a fim de compensar os efeitos dos baixos níveis de oxigênio. O metabolismo de ácidos graxos está ativado o que pode estar envolvido à uma regulação

da biossíntese de ergosterol visto que um aumento na expressão dos transcritos de representantes da via, tais como *erg 3*, *erg 11* e *erg 5* foi detectado em nossos dados por PCR em tempo real (Fig. 11) além do aumento da expressão da proteína Erg6, também representante desta via, nos resultados de *western blot* (Fig. 12).

Em relação ao consumo de glicose, em *A. fumigatus* este consumo foi detectado como reduzido em condições de hipóxia e a produção de compostos típicos da fermentação, como o acetato, lactato e etanol, aumentada (BARKER et al., 2012). Nossos dados se assemelham a tal condição onde o consumo de glicose parece ser intenso até certo momento e se mantém praticamente inalterado por um longo tempo (Fig. 15). A produção de etanol pode ser inferida pelo aumento na expressão de proteínas específicas desta via como detectado em nossos dados proteômicos (Tabela 1) representando a produção de compostos da fermentação. Os resultados proteômicos foram mostrados com 12 h de hipóxia e representam, desse modo, um panorama da resposta fúngica neste momento. Não podemos afirmar que somente o etanol está sendo produzido enquanto há uma estabilidade no consumo da glicose durante um período maior. Outra evidência da falta do consumo direto da glicose a fins de obtenção de energia pode ser a reflexo no crescimento lento das células do *Pb01* em hipóxia quando comparado às células controle (Fig. 10). Apesar de viáveis, as células estabilizam seu crescimento refletindo uma condição de mudança metabólica e utilização de fontes de carbono durante o estresse hipóxico.

5) Conclusões

O estudo das respostas hipóxicas em *Paracoccidioides* é descrito pela primeira vez e sugere que neste fungo, assim como em outros fungos patogênicos humanos há adaptação à esta condição observada pela:

- ✓ Presença de um regulador principal da resposta à condição de hipóxia, a proteína *SrbA*, funcional na linhagem mutante para o gene *srbA* de *A. fumigatus*;
- ✓ Complementação gênica utilizando a linhagem mutante para o gene *srbA* de *A. fumigatus*;

- ✓ Susceptibilidade à drogas antifúngicas e o crescimento em meio depletado do íon ferro mostrando que a *PbsrbA* possivelmente está envolvida na regulação de genes da via do ergosterol e homeostase de ferro.

- ✓ Mudança no metabolismo geral das células detectada por análises proteômicas em gel bidimensional em condições que simulam hipóxia confirmando que o fungo realmente responde à esta condição regulando vias metabólicas importantes no processo de adaptação.

Dada a relevância da paracoccidioidomicose como uma enfermidade de alta prevalência e morbidade, com grande incidência no Brasil, a caracterização dos efeitos da hipóxia nas células de *Paracoccidioides* pode auxiliar nos estudos da patogênese fúngica sendo um passo inicial na elucidação de potenciais fatores de virulência e mecanismos de adaptação do fungo nos nichos do hospedeiro, onde possivelmente enfrenta hipóxia.

6) Tabelas

Tabela 1 - Proteínas identificadas em células leveduriformes de *Pb01* com expressão aumentada durante estresse hipóxico com CoCl_2 .

Categoria funcional ^a	Proteína	Número do proteína ^b	Expressão relativa ^c	MS		MS/MS		Organismo/ Acesso ao GenBank ^f	MM Exp. ^g (Teó.) ^h	pI Exp. ^g (Teó.) ^h	Valor de P ⁱ
				Score ^d	Cob. da seq. (%) ^e	Score	Peptídeos				
Metabolismo de aminoácidos e nitrogênio											
	Argininosuccinato sintase	1	1.74	99	60	146	6	<i>Pb01/</i> gi 295660644	46.6 (46.7)	5.21 (5.18)	0,045180
	Argininosuccinato sintase	2	1.50	112	47	–	–	<i>Pb01/</i> gi 295660644	47.3 (46.7)	5.90 (5.18)	0,007298
	Aminopeptidase sensível-puromicina	3	–	106	67	–	–	<i>Pb01/</i> gi 295657024	79.4 (100.7)	6.67 (5.65)	*
	Cetol-ácido redutoisomerase	4	4.10	214	54	312	8	<i>Pb03/</i> gi 225678712	39.1 (44.8)	8.06 (9.12)	0,003010
	Hidroxiacilglutaciona hidrolase	5	–	87	69	123	3	<i>Pb01/</i> gi 295670589	28.5 (28.9)	7.39 (6.11)	*
	Cianeto hidratase	6	3.08	128	72	135	4	<i>Pb01/</i> gi 295661763	15.8 (18.0)	5.84 (5.88)	0,012602
	Imidazol Glicerol fosfato sintase hisHF	7	1.65	105	67	–	–	<i>Pb01/</i> gi 295674401	53.5 (60.4)	6.29 (5.71)	0,029072
	Gama glutamil-transpeptidase	8	–	109	54	–	–	<i>Pb01/</i> gi 295659988	41.1 (57.3)	7.14 (5.37)	*
Metabolismo de carboidratos e componentes de carbono											
	ATP citrato liase	9	2.44	145	44	–	–	<i>Pb01/</i> gi 295664927	48.3 (52.9)	7.00 (5.99)	0,002422
	Hidrolase da superfamília-HAD	10	–	137	56	125	4	<i>Pb01/</i> gi 295674837	28.3 (27.3)	6.20 (5.67)	*
	Fosfomanomutase	11	1.15	183	63	160	5	<i>Pb01/</i> gi 295672968	28.6 (30.5)	5.77 (5.60)	0,008918

Metabolismo de fosfato

Pirofosfatase inorgânica	12	–	93	70	–	–	<i>Pb01/</i> gi 295672504	25.1 (33.5)	5.04 (5.13)	*
--------------------------	----	---	----	----	---	---	------------------------------	----------------	----------------	---

Metabolismo de ácidos graxos

Esterase D	13	–	82	40	193	5	<i>Pb01/</i> gi 295663705	31.8 (31.6)	7.33 (5.98)	*
2-metilcitrato sintase	14	2.28	183	64	234	8	<i>Pb01/</i> gi 295666179	45.5 (51.5)	9.57 (9.02)	0,038151
Acetil-CoA acetiltransferase	15	1.52	84	71	–	–	<i>Pb01/</i> gi 295668707	39.6 (46.6)	8.28 (8.98)	0,046665
12-Oxofitodienoato redutase	16	–	230	81	338	7	<i>Pb01/</i> gi 295669073	42.1 (43.2)	8.27 (8.69)	*

Metabolismo de álcool

Piruvato descarboxilase	17	1.89	72	60	248	8	<i>Pb18/</i> gi 226288913	56.1 (63.8)	7.56 (6.33)	0,022531
Álcool desidrogenase	18	5.65	101	44	211	7	<i>Pb01/</i> gi 295666161	35.8 (44.8)	8.17 (8.96)	0,000528
Álcool desidrogenase	19	–	120	42	198	3	<i>Pb01/</i> gi 295665123	32.8 (54.5)	6.97 (5.87)	*

Energia

Oxidação de aminoácidos

4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase	20	2.30	159	84	–	–	<i>Pb01/</i> gi 295658704	41.8 (45.6)	6.38 (5.58)	0,000462
------------------------------------	----	------	-----	----	---	---	------------------------------	----------------	----------------	----------

Oxidação de acetaldeído

Betaína aldeído desidrogenase	21	2.64	78	66	144	6	<i>Pb01/</i> gi 295664222	53.0 (51.6)	6.87 (5.98)	0,003373
Aldeído desidrogenase	22	–	127	51	192	5	<i>Pb01/</i> gi 295665123	39.0 (54.5)	7.38 (5.87)	*

Via do ácido tricarboxílico

Malato desidrogenase	23	3.73	82	59	116	3	<i>Pb01/</i>	32.1	8.18	0,034201
----------------------	----	------	----	----	-----	---	--------------	------	------	----------

							gi 295673937	(36.0)	(8.99)	
Subunidade - 3-isopropilmalato desidratase	24	6.39	200	49	149	3	<i>Pb01/</i> gi 295664721	78.1 (79.1)	8.05 (6.49)	0,005872
Subunidade α - succinil CoA ligase	25	3.52	109	56	153	4	<i>Pb01/</i> gi 295674665	37.1 (34.9)	8.01 (8.54)	0,003486
Glicólise										
Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	26	2.35	252	79	276	10	<i>Pb01/</i> gi 295658119	33.6 (36.6)	9.40 (8.26)	0,050325
Frutose-bisfosfato aldolase	27	3.81	194	62	220	5	<i>Pb01/</i> gi 295671120	36.8 (39.7)	7.39 (6.09)	0,006943
Fosfoglicerato mutase independente - 2,3-bifosfoglicerato	28	3.16	107	59	–	–	<i>Pb01/</i> gi 295659988	53.5 (57.3)	5.83 (5.37)	0,005436
Fosfoglicerato mutase independente - 2,3-bifosfoglicerato	29	9.44	109	54	–	–	<i>Pb01/</i> gi 295659988	56.8 (57.3)	5.57 (5.37)	0,000405
Fosfoglicerato quinase	30	2.85	–	–	114	3	<i>Pb03/</i> gi 225682817	43.8 (45.1)	7.91 (7.10)	0,000702
Piruvato desidrogenase E1- α	31	–	86	76	76	3	<i>Pb01/</i> gi 295658595	42.5 (45.3)	6.98 (8.62)	*
Transporte de elétrons e conservação de energia associada à membrana										
Subunidade β - ATP sintase	32	2.61	80	67	–	–	<i>Pb01/</i> gi 295658821	45.8 (55.1)	7.72 (5.28)	0,004484
Síntese Protéica										
Fator β -1 de elongação	33	1.45	72	45	47	3	<i>Pb01/</i> gi 295667868	34.1 (25.9)	4.45 (4.78)	0,038183
Endereçamento de proteínas (enovelamento, modificação e destino)										
Disulfeto isomerase Pdi1	34	–	259	72	167	7	<i>Pb01/</i> gi 295673162	61.5 (59.3)	4.52 (4.08)	*
Componente do proteassoma PRE6	35	–	83	70	–	–	<i>Pb01/</i> gi 295659891	26.8 (29.4)	9.41 (8.24)	*
Tiosulfato enxofre transferase	36	–	77	62	–	–	<i>Pb01/</i> gi 295657885	32.0 (38.5)	6.70 (6.48)	*

Co-chaperona GrpE mitocondrial	37	1.98	–	–	84	1	<i>Pb01/</i> gi 295662873	23.8 (28.5)	5.58 (8.89)	0,017698
Componente PUP2 do proteassoma	38	1.87	119	74	–	–	<i>Pb01/</i> gi 295667089	27.6 (26.8)	4.29 (4.79)	0,022689
Componente PRE5 do proteassoma	39	3.54	111	63	121	4	<i>Pb01/</i> gi 295668885	30.3 (29.0)	5.51 (5.35)	0,000204
Dipeptidil-peptidase	40	2.88	85	59	–	–	<i>Pb01/</i> gi 295660102	69.5 (86.5)	7.42 (7.99)	0,017557
Peptidase β de processamento mitocondrial	41	–	97	67	46	2	<i>Pb01/</i> gi 295664272	48.3 (53.0)	5.38 (5.84)	*

Defesa e virulência celular

Proteína de choque térmico - Hsp70	42	–	180	64	–	–	<i>Pb01/</i> gi 295673716	72.1 (68.8)	3.99 (5.39)	*
Proteína Y20	43	5.02	84	63	71	2	<i>Pb/</i> gi 17980998	21.1 (21.6)	6.68 (6.09)	0,000734
Proteína SSC1- relacionada à Hsp70	44	1.37	183	68	156	3	<i>Pb01/</i> gi 295671569	66.1 (73.8)	5.47 (5.92)	0,015932
Proteína de estresse DDR48	45	1.81	82	95	–	–	<i>Ajellomyces capsulatus/</i> gi 240280489	21.5 (33.5)	8.29 (4.83)	0,016548

Biossíntese de vitaminas e co-fatores

Proteína PDX1 de biossíntese de piridoxina	46	2.09	151	61	–	–	<i>Pb01/</i> gi 295660455	36.5 (34.4)	6.67 (6.04)	0,048750
Cadeia alfa da riboflavina sintase	47	–	99	53	93	2	<i>Pb01/</i> gi 295670998	27.8 (26.0)	6.10 (5.55)	*

Transcrição

Proteína de ligação-ácido nucléico	48	–	91	47	133	3	<i>Pb01/</i> gi 295665468	26.0 (30.4)	7.17 (9.40)	*
------------------------------------	----	---	----	----	-----	---	------------------------------	----------------	----------------	---

Proteínas não-classificadas

Proteína hipotética conservada	49	–	–	–	107	4	<i>Pb01/</i> gi 295657565	29.3 (28.7)	7.20 (7.07)	*
Proteína hipotética conservada	50	2.37	98	70	–	–	<i>Pb01/</i> gi 295658821	39.3 (55.1)	7.72 (5.28)	0,004484
Proteína hipotética conservada	51	–	90	47	–	–	<i>Pb01/</i> gi 295669766	26.6 (26.1)	6.16 (5.80)	*
Proteína hipotética conservada	52	–	88	52	–	–	<i>Aspergillus terreus/</i>	41.1	5.18	*

							gi 115397195	(66.5)	(6.02)	
							<i>Pb01/</i>	42.0	5.03	*
Proteína hipotética conservada	53	–	87	68	–	–	gi 295668004	(41.4)	(5.20)	
							<i>Pb01/</i>	21.6	4.53	*
Proteína contendo domínio DUF866	54	–	–	–	74	3	gi 295667495	(18.5)	(4.81)	
							<i>Pb01/</i>	37.1	5.91	0,025116
Proteína contendo domínio DUF833	55	2.28	135	78	–	–	gi 295662444	(35.5)	(5.50)	
							<i>Aspergillus fumigatus/</i>	39.8	6.68	*
Proteína com domínio VPS9	56	–	74	42	–	–	gi 71001482	(80.3)	(6.29)	

* Proteínas visualizadas somente na condição de hipóxia.

^a Categoria funcional baseada no banco de dados MIPS (<http://www.helmholtz-muenchen.de/en/ibis>) e UniProt (<http://www.uniprot.org/>).

^b Número da proteína como descrito na Figura 13.

^c Expressão relativa em relação à condição de hipóxia.

^d Probabilidade obtida da busca pelo banco de digestão teórica Mascot.

^e Cobertura da sequência da proteína predita pelo pareamento dos peptídeos no Mascot.

^f Número de acesso e descrição da proteína identificada no banco de dados do Mascot.

^g Massas moleculares (kDa) e pontos isoelétricos estimados dos géis 2-DE.

^h Massas moleculares (kDa) e pontos isoelétricos baseados nas sequências de aminoácidos das proteínas identificadas.

ⁱ ANOVA – teste de significância estatística para comparar as diferenças na expressão das proteínas entre as condições analisadas. Os valores da ANOVA são indicados ($p < 0,05$).

Tabela 2 - Proteínas identificadas em células leveduriformes de *Pb01* com expressão reduzida durante estresse hipóxico com CoCl_2 .

Categoria funcional ^a	Proteína	Número do proteína ^b	Expressão relativa ^c	MS		MS/MS		Organismo/ Acesso ao GenBank ^f	MM Exp. ^g (Teó.) ^h	pI Exp. ^g (Teó.) ^h	Valor de p ⁱ	
				Score ^d	Cob. da seq. (%) ^e	Score	Peptídeos					
Metabolismo	Metabolismo de aminoácidos e nitrogênio											
		Cetol-ácido redutoisomerase	57	- 2.43	178	80	229	7	<i>Pb03/</i> gi 225678712	39.1 (44.8)	8.37 (9.12)	0,000314
		Adenosilhomocisteinase	58	- 1.93	133	55	309	8	<i>Pb01/</i> gi 295669670	43.3 (49.0)	6.86 (5.83)	0,047947
		Aspartato aminotransferase	59	-	82	44	134	4	<i>Pb18/</i> gi 226289987	40.1 (47.2)	9.49 (9.15)	#
		Família oxidoredutase 2-nitropropano dioxigenase	60	- 1.47	86	63	-	-	<i>Pb18/</i> gi 226288645	37.3 (37.8)	6.93 (6.01)	0,047825
	Aminopectidase sensível-puromicina	61	-	199	51	73	5	<i>Pb18/</i> gi 226295047	93.8 (102.6)	5.96 (6.77)	#	
	Metabolismo de carboidratos e componentes de carbono											
	Manitol-1-fosfato 5-desidrogenase	62	- 2.27	111	57	-	-	<i>Pb01/</i> gi 295662360	40.6 (43.1)	6.83 (5.66)	0,005309	
	Proteína SOU2 de utilização de Sorbitol	63	- 8.55	-	-	82	3	<i>Pb01/</i> gi 295666718	30.8 (31.4)	4.43 (7.05)	0,000070	
	Metabolismo de fosfato											
	Pirofosfatase inorgânica	64	- 1.50	92	50	149	6	<i>Pb01/</i> gi 295672504	35.3 (33.5)	4.81 (5.13)	0,011490	
Energia	Oxidação de ácidos graxos											
		3-cetoacil-CoA tiolase	65	-	90	57	228	6	<i>Pb01/</i> gi 295669280	43.1 (43.8)	9.04 (8.65)	#
		Acil-CoA desidrogenase	66	- 2.25	105	55	82	2	<i>Pb01/</i> gi 295664346	41.6 (47.7)	5.77 (8.19)	0,008951
	Oxidação de aminoácidos											

Aminopeptidase	67	-	105	31	-	-	<i>Pb18/</i> gi 226291623	92.1 (108.5)	5.82 (6.51)	#
Isovaleril-CoA desidrogenase	68	-	114	44	-	-	<i>Pb03/</i> gi 225683417	42.8 (47.3)	7.23 (8.35)	#
4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase	69	-1.52	123	60	-	-	<i>Pb01/</i> gi 295658704	42.1 (45.6)	6.49 (5.58)	0,005904
Via das pentoses fosfato										
Transaldolase	70	-3.04	141	55	93	4	<i>Pb03/</i> gi 225683456	35.3 (35.8)	6.89 (6.17)	0,008227
Oxidação de acetaldeído										
Aldeído desidrogenase	71	- 2.89	101	57	122	3	<i>Pb01/</i> gi 295665123	49.5 (54.5)	6.48 (5.87)	0,008479
Aldeído desidrogenase	72	- 1.74	106	54	256	9	<i>Pb03/</i> gi 225680265	48.1 (54.6)	6.74 (5.92)	0,009495
Via do ácido tricarbóxico										
Subunidade da flavoproteína succinato desidrogenase	73	- 5.8	146	70	127	6	<i>Pb18/</i> gi 226288251	61.0 (71.8)	6.71 (6.40)	0,002979
Malato desidrogenase	74	- 4.02	124	63	93	4	<i>Pb01/</i> gi 295673937	32.6 (36.0)	5.10 (8.99)	0,001221
Malato desidrogenase	75	- 2.45	194	63	-	-	<i>Pb01/</i> gi 295658218	32.8 (34.6)	7.93 (6.36)	0,018953
3-isopropilmalato desidrogenase	76	- 3.55	-	-	61	1	<i>Pb01/</i> gi 295664094	39.1 (38.5)	5.59 (5.60)	0,009998
Grande subunidade - 3-isopropilmalato desidrogenase	77	-	90	44	-	-	<i>Pb01/</i> gi 295664721	78.8 (79.1)	8.34 (6.49)	#
Subunidade - flavoproteína succinato desidrogenase	78	- 7.53	170	58	200	5	<i>Pb01/</i> gi 295672341	24.1 (66.2)	6.50 (5.95)	0,007459
Glicólise e gliconeogênese										
Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	79	- 13.68	183	66	120	4	<i>Pb01/</i> gi 295658119	34.6 (36.6)	8.62 (8.26)	0,000812
Enolase	80	- 2.26	95	64	363	6	<i>Pb01/</i>	46.8	5.75	0,003727

							gi 295672732	(43.8)	(8.93)	
							<i>Pb01/</i>	37.1	7.65	0,010360
Frutose-bisfosfato aldolase	81	- 2.15	112	54	189	5	gi 295671120	(39.7)	(6.09)	
							<i>Pb01/</i>	42.3	8.28	#
Fosfoglicerato quinase	82	-	127	55	261	11	gi 295669690	(45.3)	(6.48)	
							<i>Pb18/</i>	50.5	5.03	0,008270
Glicoquinase	83	- 1.56	104	54	91	2	gi 226287617	(55.1)	(5.14)	
							<i>Pb01/</i>	39.1	6.26	0,006159
Frutose-1,6-bisfosfatase	84	- 2.36	125	37	-	-	gi 295669316	(38.9)	(5.80)	

Transporte de elétrons e conservação de energia associada à membrana

							<i>Pb18/</i>	52.2	5.11	0,007403
Subunidade α - ATPase	85	- 3.30	130	62	160	4	gi 226291035	(60.4)	(9.12)	
							<i>Pb03/</i>	42.1	9.20	0,002470
12-oxofitodienoato redutase	86	- 3.42	118	61	-	-	gi 225678587	(43.0)	(8.52)	

Síntese Protéica

Proteína ribossomal 40S – S0	87	- 1.79	110	33	77	1	<i>Pb01/</i>	49.6	4.64	0,005900
							gi 295671352	(32.0)	(4.84)	

Endereçamento de proteínas (enovelamento, modificação e destino)

							<i>Pb01/</i>	57.1	4.48	#
Disulfeto isomerase Pdi1	88	-	104	41	362	13	gi 295673162	(59.3)	(4.80)	
							<i>Pb01/</i>	40.8	5.52	0,014547
Peptidil-prolil cis-trans isomerase D	89	- 1.83	97	51	-	-	gi 295668481	(41.3)	(5.36)	
							<i>Pb01/</i>	31.3	4.70	0,000501
Enzima conjugadora-ubiquitina	90	- 1.89	114	63	-	-	gi 295665642	(28.5)	(4.98)	
							<i>Pb03/</i>	19.1	6.76	0,012965
Peptidil-prolil cis-trans isomerase	91	- 3.73	-	-	52	2	gi 225677985	(26.4)	(8.46)	

Defesa e virulência celular

							<i>Pb01/</i>	68.1	4.47	0,006507
Proteína de choque térmico - Hsp70	92	- 3.42	294	69	476	12	gi 295659116	(70.9)	(5.05)	
							<i>Pb18/</i>	54.5	7.94	0,000481
Catalase peroxissomal	93	- 3.29	112	60	91	4	gi 226288523	(57.6)	(6.53)	
							<i>Pb18/</i>	54.3	8.08	0,005985
Catalase peroxissomal	94	- 3.33	196	58	-	-	gi 226288523	(57.6)	(6.53)	

Superóxido dismutase	95	- 2.82	81	55	-	-	<i>Pb03/</i> gi 225682872	23.5 (23.8)	8.39 (7.07)	0,020914
Proteína da família beta-lactamase	96	- 4.79	101	53	46	2	<i>Pb18/</i> gi 226292076	41.1 (44.1)	4.69 (5.0)	0,003656
Proteína Y20	97	- 1.92	92	54	-	-	<i>Pb01/</i> gi 17980998	21.3 (21.6)	7.27 (6.09)	0,007069

Biossíntese de vitaminas e co-fatores

Proteína ativadora de GTPase ran-específica	98	- 2.21	95	64	-	-	<i>Pb18/</i> gi 226294116	42.1 (29.3)	3.56 (4.80)	0,009471
Spermidina sintase	99	- 1.38	73	39	91	2	<i>Pb03/</i> gi 226293104	31.5 (33.6)	5.35 (5.33)	0,003220

Organização celular

Tropomiosina-1	100	- 1.91	93	83	97	3	<i>Pb01/</i> gi 295657091	19.9 (18.8)	4.63 (4.99)	0,039476
----------------	-----	--------	----	----	----	---	------------------------------	----------------	----------------	----------

Transcrição

Proteína contendo um domínio de ligação ao RNA	101	- 8.24	166	52	99	4	<i>Pb18/</i> gi 226291029	25.3 (30.5)	6.28 (9.20)	0,000051
--	-----	--------	-----	----	----	---	------------------------------	----------------	----------------	----------

Proteínas visualizadas somente na condição controle.

^a Categoria funcional baseada no banco de dados de categoria funcional MIPS (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/yeast/listSearch.html?order=entry>) e UniProt (<http://www.uniprot.org/>).

^b Número do proteína como descrito na Figura 13.

^c Expressão relativa em relação à condição de hipóxia.

^d Probabilidade obtida da busca pelo banco de digestão teórica Mascot.

^e Cobertura da sequência da proteína predita pelo pareamento dos peptídeos no Mascot.

^f Número de acesso e descrição da proteína identificada no banco de dados do Mascot.

^g Massas moleculares (kDa) e pontos isoelétricos estimados dos géis 2-DE.

^h Massas moleculares (kDa) e pontos isoelétricos baseados nas sequências de aminoácidos das proteínas identificadas.

ⁱ ANOVA – teste de significância estatística para comparar as diferenças na expressão das proteínas entre as condições analisadas. Os valores da ANOVA são indicados ($p < 0,05$).

Tabela S1 – Oligonucleotídeos utilizados neste estudo.

qRT-PCR^a		
Gene	5'- 3' (sense)	3'- 5' (antissense)
<i>PbsrbA</i> ^b	CGATACCGTGCCAATCTTAAC	TGAGCTTGTTAGATGATGACAC
<i>Pbeno</i>	GATTTGCAGGTTGTCGCCGA	TGGCTGCCTGGATGGATTCA
<i>Pberg11</i>	CTGAGCTGTAGGGAAAAGTAC	TCCTCAGCGCAAACGTCCTT
<i>Pberg3</i>	GGAGAATATGTATACCAGCCC	ATCCAAGTGATGAGATACAGAG
<i>Pberg5</i>	GGTCCCATGTTCAAATCCCT	AAATTTGTGGAAAACCGAGACG
<i>Pbacc</i>	CGTGGTGGTTCCTGGGTTG	ATTTGTCGTTGAGTGCTTTTCG
<i>PbsrbA</i> ^c	CGATACCGTGCCAATCTTAAC	TGAGCTTGTTAGATGATGACAC
Complementação gênica^d		
<i>AngpdA</i>	CCAACAGCTTTCTCAGCCAGGGC	TGTGATGTCTGCTCAAGCGGGGT
<i>PbsrbA</i>	GCTCCTTATTGAAGTCGGAGGAC	CTATCATAGTGGTGTCTGCAGT
<i>pyrG</i>	TGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGG	CACAGGACGGGTGTGGTCGCCAT
Rastreamento por PCR convencional^e		
<i>AngpdA+ PbsrbA</i>	GCACTATTGATCATCCGATAGC	CTATCATAGTGGTGTCTGCAGT
<i>AngpdA</i>	CCAACAGCTTTCTCAGCCAGGGC	TGTGATGTCTGCTCAAGCGGGGT
Southern blot^f		
<i>AngpdA</i>	GCCAACATGTCTTCCAAGTCGCAA	ATGCATCCCATCCCTCTTTCTGGT
<i>pyrG</i>	GCCAACATGTCTTCCAAGTCGCAA	ATGCATCCCATCCCTCTTTCTGGT

^a Oligonucleotídeos utilizados nas análises de expressão gênica por PCR em tempo real.

^b Oligonucleotídeos que amplificam a sequência de *PbsrbA* utilizados para análise da expressão do gene em células de *Pb01* sob condições de hipóxia ou não, utilizando o agente químico CoCl_2 .

^c Oligonucleotídeos que amplificam a sequência de *PbsrbA* utilizados para análise da expressão do gene em células de *A. fumigatus*: tipo selvagem, mutante nulo para *srbA* e transformante cm *PbsrbA*, em condições de normóxia (níveis de oxigênio atmosférico) e hipóxia (1% O_2 e 5% CO_2).

^d Oligonucleotídeos utilizados para amplificar sequências dos genes gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *A. nidulans* (região promotora), *PbsrbA* e do gene *pyrG* (oritidina-5'-fosfato descarboxilase) de *A. parasiticus*. A ideia foi realizar PCR de fusão para unir a região promotora do gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *A. nidulans* com a sequência de *PbsrbA*. Para o gene *pyrG*, a co-transformação proporcionou um método de seleção dos transformantes em meio de cultura sem uridina.

^e Oligonucleotídeos utilizados para confirmação do produto transformado tanto por amplificação da sequência promotora quanto da sequência promotora fusionada à *PbsrbA*.

^f Oligonucleotídeos utilizados na síntese das sondas: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *A. nidulans*: em torno de 1,7 Kb; *pyrG* (oritidina-5'-fosfato descarboxilase): em torno de 1,0 Kb.



Capítulo 4

*Artigo completo
publicado em periódico*

Artigo

Characterization of the *Paracoccidioides* beta-1,3-glucanosyltransferase family

Patrícia de Sousa Lima¹, Elisa Flávia Luiz Cardoso Bailão¹, Mirelle Garcia Silva¹, Nadya da Silva Castro¹, Sônia Nair Bão², Ivan Orlandi³, Marina Vai³ & Célia Maria de Almeida Soares¹

¹Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiás, Brazil; ²Laboratório de Microscopia Eletrônica, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil; and ³Dipartimento di Biotecnologie e Bioscienze, Università degli Studi di Milano-Bicocca, Milan, Italy

Correspondence: Célia Maria de Almeida Soares, Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas II, Campus Samambaia, Universidade Federal de Goiás, 74690-900 Goiânia, GO – Brazil. Tel./fax: +55 62 3521 1110; e-mail: cmasoares@gmail.com

Received 22 November 2011; revised 29 May 2012; accepted 6 June 2012.

DOI: 10.1111/j.1567-1364.2012.00819.x

Editor: José Ruiz-Herrera

Keywords

Paracoccidioides; beta-1,3-glucanosyltransferases; cell wall integrity; protein interaction.

Abstract

The cell wall of pathogenic microbes acts as an initial barrier that is in contact with hostile environments. Several proteins are associated to the cell wall, including the glucanosyltransferases, which are attached through glycosylphosphatidylinositol anchors to the wall. Here, we characterized the *Paracoccidioides* beta-1,3-glucanosyltransferase (Gel) family of proteins that showed significant homology to proteins belonging to the GH72 family. Immunoassays demonstrated Gel1p associated with the cell wall and with the nucleus. For Gel2p, immune labeling was associated with the cell wall and cytoplasm. Genetic complementation studies in *Saccharomyces cerevisiae* demonstrated that Gel2p is able to participate in the maintenance of fungal cell wall integrity, as it was able to restore the lack of Gas1p activity in a *gas1Δ* mutant; Gel1p was not able to do the same. On the other hand, Gel1p restores telomeric silencing in a *gas1Δ* mutant, providing strong support that Gel1p can be involved in transcriptional silencing in *Paracoccidioides*. Use of the *in vivo* yeast two-hybrid system revealed proteins that interact with *Paracoccidioides* Gel proteins, supporting new insights into the function of Gel family members and suggesting that they could play other roles than those established at the fungal cell wall.

Introduction

Paracoccidioides is a thermally dimorphic fungus that causes paracoccidioidomycosis, which is the most prevalent systemic mycosis in Latin America. The *Paracoccidioides* genus is composed of four distinct phylogenetic lineages [PS2, PS3, S1 and Pb01-like, the latter recently proposed as a new species, *Paracoccidioides lutzii* (Matute *et al.*, 2006; Carrero *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2009)]. Infection is established by inhalation of propagules that are converted to the parasitic yeast form into the host (Franco, 1987). Pathogenicity of dimorphic fungi is intimately linked to morphological changes (Maresca & Kobayashi, 2000), which are strongly associated with the temperature shift encountered by *Paracoccidioides* in host tissues (San-Blas *et al.*, 2002).

In fungi, 80–90% of the cell wall is made of polysaccharides, while the remainder is mostly proteins (Castillo

et al., 2008). The major structural polysaccharide of the fungal cell wall is glucan, which represents approximately 50–60% of the cell wall dry weight (Kapteyn *et al.*, 1999). The glucan component is predominately beta-1,3-glucan, long-linear chains of beta-1,3-linked glucose (Bowman & Free, 2006). Beta-1,3-glucans are synthesized by a protein complex on the plasma membrane. This complex uses intracellular UDP-glucose as a substrate and extrudes linear beta-1,3-glucan chains through the membrane into the cell wall space (Douglas, 2001). However, linear beta-1,3-glucan chains remain unorganized until they are branched, elongated, remodeled and cross-linked to other cell wall components, like chitin and mannoproteins (Mouyna *et al.*, 2000).

In *Paracoccidioides*, as in other fungi, the cell wall composition comprises the polysaccharides glucan and chitin, and lipids and proteins, both in the mycelium and in the yeast cells. Both have similar contents of glucan (36–47%)

and lipids (5–10%). What differ are the types of glucan predominantly encountered in yeast (alpha-glucan) or in mycelium (beta-glucan) cells. Chitin represents 37–48% of the yeast cell wall content and 7–18% of the mycelium (Kanetsuna *et al.*, 1969).

Beta-1,3-glucan elongase activity was first identified in a search for periplasmic transglycosidases responsible for linking glucans to other cell wall molecules in *Aspergillus fumigatus* (Hartland *et al.*, 1996). This enzyme was named glucan-elongating protein 1 (Gel1). Gel1p catalyzes *in vitro* a two-step beta-1,3-glucanosyltransferase reaction: First an internal glycosidic linkage of a donor beta-1,3-glucan chain is cleaved, and then the reducing portion is transferred to the nonreducing end of another beta-1,3-glucan molecule. The generation of a new beta-1,3-linkage between the acceptor, and the donor molecule results in the elongation of the beta-1,3-glucan side chain (Hartland *et al.*, 1996). This beta-1,3-glucanosyltransferase activity was identified later in the homologs proteins Gas1 of *Saccharomyces cerevisiae* and Phr1-2 of *Candida albicans* (Mouyna *et al.*, 2000).

Other proteins homologs to Gel1p are present in yeast and fungal species, and all together form the glycoside hydrolase 72 (GH72) family in the carbohydrate active enzymes database (CAZy) of glycoside hydrolases (<http://www.cazy.org/GH72.html>). Such GH72 enzymes constitute a redundant family. In *S. cerevisiae*, five members are present. The Gas1–Gas5 protein pair is active during vegetative growth, whereas Gas2 and Gas4 are essential for spore wall formation (Ragni *et al.*, 2007a, b). The function of Gas3p has also been investigated. In contrast to the other gas proteins, Gas3p is dispensable for both vegetative growth and sporulation of *S. cerevisiae* and seems to be an inactive protein (Rolli *et al.*, 2010). All the five gas proteins are modified by a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor.

Candida albicans Gas protein homologs Phr1p and Phr2p are regulated by extracellular pH (Saporito-Irwin *et al.*, 1995) and are predicted to be anchored to the plasma membrane through a GPI anchor (Fonzi, 1999). Three other Phr homologs are present: Phr3p, Pga4p (putative GPI-anchored protein) and Pga5p. The genes that encode the latter proteins appear to function in conditions that differ from those of Phr1p and Phr2p, and the single deletion of them does not show a relevant impact on growth, dimorphism or virulence (Eckert *et al.*, 2007). Phr1p is a fundamental protein in the maintenance of morphology of *C. albicans*, and *PHR1* inactivation affects *C. albicans* potential to adhere and invade human epithelia (Calderon *et al.*, 2010). In *A. fumigatus*, seven genes that encode orthologs of Gas1p (*GEL1*–*GEL7*) are present. Among them, *GEL1*, *GEL2* and *GEL4* are constitutively expressed during mycelium growth of *A. fumigatus* (Gastebois *et al.*, 2010).

Cell wall biogenesis and morphogenesis are tightly linked processes, and the lack of activity of some GH72 proteins in *S. cerevisiae* and *C. albicans* affects cell shape, causing the loss of the ellipsoidal shape, defects in cell separation, bud maturation and filament elongation (Popolo *et al.*, 1993; Saporito-Irwin *et al.*, 1995; Kang & Jiang, 2005). A profound change in the cell wall composition and architecture occurs, which involves a hyperaccumulation of chitin and increased cross-linking of mannoproteins with chitin (Popolo *et al.*, 1997; Ram *et al.*, 1998). These changes are secondary responses aimed at counteracting the weakening of the cell wall and preventing lysis (Popolo *et al.*, 2001). Evidence indicates that these changes are triggered by the constitutive activation of signaling pathways, which culminate in the up-regulation of cell wall-related and stress-responsive genes (Ram *et al.*, 1998; Lagorce *et al.*, 2003; Garcia *et al.*, 2004).

Paracoccidioides contains three genes encoding beta-1,3-glucanosyltransferases, which are predicted GPI-anchored proteins (Castro *et al.*, 2005; Tomazett *et al.*, 2005). The Gel sequences were also identified in the genome of *Paracoccidioides* (Broad Institute; http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html). To better understand the mechanisms involved in cell wall building and remodeling, our group has investigated the function of Gel3p. The deduced protein displays functional similarity to the GH72 family of proteins (Gas/Phr/Gel). In fact, the protein, which is predominantly expressed in the mycelia phase, was able to rescue the phenotype of the *gas1Δ* mutant of *S. cerevisiae*, correcting morphological defects characteristic of the lack of Gas1p. This indicates that Gel3p is a functional protein and probably acts by elongating the chains of β -1,3-glucan to mediate *Paracoccidioides* cell wall remodeling (Castro *et al.*, 2009).

In this study, using members of phylogenetic species of *Paracoccidioides*, we characterized Gel1p and Gel2p, the two other members of the glucanosyltransferase family. In addition, we continued the study of Gel3p, enabling a more complete analysis of this family of proteins. Our results indicate that Gel1p and Gel2p are associated predominantly with the fungus cellular surface. Interestingly, Gel1p is also found in the nuclear region of the cell. Complementation studies in the *S. cerevisiae gas1Δ* mutant demonstrated that Gel2p is able to participate in the maintenance of fungal cell wall integrity by its ability to restore Gas1p activity, unlike Gel1p. On the other hand, Gel1p is able to restore the telomeric silencing in the *gas1Δ* mutant; this was not observed for the other Gel members. To better understand the biological role of *Paracoccidioides* Gel members, we searched for potential macromolecules that may interact with Gel1p, Gel2p and

Gel3p using the *in vivo* yeast two-hybrid system assay. These data provide a new insight into the function of each member of the *Paracoccidioides* beta-1,3-glucanosyltransferase family.

Material and methods

Fungal strains and growth conditions

We used the following strains of *Paracoccidioides*: *P. lutzii*, Pb01 (ATCC-MYA-826); and Pb18, phylogenetic species 1 (PS1) that were cultivated in Fava Netto's medium [1% (w/v) peptone; 0.5% (w/v) yeast extract; 0.3% (w/v) proteose peptone; 0.5% (w/v) beef extract; 0.5% (w/v) NaCl; 4% (w/v) glucose; 1% (w/v) agar, pH 7.2]. They were grown as mycelium or yeast at 22 and 36 °C, respectively.

The *S. cerevisiae* null mutant WB2d (*gas1Δ::LEU2*), a derivative of W303-1B (*MATa ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100*), was constructed in a previous study (Vai *et al.*, 1996) and was the host strain for complementation experiments. The *sir2Δ* (*sir2Δ::URA3*) strain has been described previously (Calzari *et al.*, 2006). Yeast cells were grown in batches at 30 °C in Difco yeast nitrogen base medium without amino acids (YNB-aa, 6.7 g L⁻¹) containing glucose or galactose at 2% (w/v) and the required supplements. Buffered media were prepared by adding 2-(*N*-morpholine)ethansulphonic acid (MES, 10 g L⁻¹) to YNB medium, followed by pH adjustment to 6.5. During growth, the pH was monitored and never varied by more than 0.1. Cell number was determined on mildly sonicated and diluted samples using a colter-counter particle count and size analyzer, model Z2, as described previously (Vanoni *et al.*, 1983). Specific growth rates and duplication times (T_d) were obtained by fitting the cell number against time.

Sequence analysis of *Paracoccidioides* Gel proteins and phylogenetic tree of the GH72 family

The amino acid sequences of *Paracoccidioides* Gel family members were obtained at the Dimorphic Fungal Database of the Broad Institute site at (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/dimorph_collab//MultiHome.html). These for Gel1, Gel2 and Gel3 sequences, respectively, have been submitted to GenBank with the accession numbers XP_002794189, XP_002793109 and XP_002792932 for Pb01 and EEH47188, EEH48997 and EEH48839 for Pb18. InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>), SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) and big-PI Fungal Predictor (http://mendel.imp.ac.at/gpi/fungi_server.html) were used to

search for conserved domains, signal peptides and GPI modification sites, respectively, in *Paracoccidioides* Gel sequences. The amino acid sequences of beta-1,3-glucanosyltransferase orthologs from *A. fumigatus*, *C. albicans*, *Candida maltosa*, *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Coccidioides posadasii*, *Neurospora crassa* and *Paracoccidioides* were aligned using CLUSTALX2 (Larkin *et al.*, 2007). TREEVIEW v.1.6.6 program (Page, 1996) was used for phylogenetic analysis, applying the neighbor-joining method, and the tree architecture was inferred from 1000 bootstraps. The Gas2p sequence of *S. cerevisiae* was used as an outgroup.

Heterologous protein expression and generation of polyclonal antibodies

The total cDNA encoding Gel1p from Pb01, and a partial cDNA (amino acids 170–390 in the deduced protein; GenBank accession number XP_002793109) coding for Gel2p from Pb01, were obtained from a cDNA library (<https://www.biomol.unb.br/Pb>), and both were subcloned into the pGEX-4T-3 (GE Healthcare). Primer sequences are available upon request. The obtained plasmids were used to transform *Escherichia coli* DH5 α as described in standard procedures (Sambrook & Russell, 1989). To express the Gel1p (rPbGel1p) and Gel2p (rPbGel2p), the *E. coli* cells were induced with 1.0 or 0.4 mM IPTG, respectively. Polyacrylamide gels containing each rPbGelp were injected into rabbits to generate specific rabbit polyclonal serum. Both rabbit preimmune and immune serum were sampled and stored at –20 °C.

Protein extracts preparation and Western blot analysis

A total cell homogenate of yeast of *Paracoccidioides* was obtained as described by Fonseca *et al.* (2001) by the disruption of frozen cells using a pestle and mortar in the presence of N α -*p*-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK) (50 μ g mL⁻¹), 4-chloromercuribenzoic acid (1 mM), leupeptin (20 mM), phenylmethylsulfonyl fluoride (20 mM) and iodoacetamine (5 mM) in homogenization buffer (2 mM CaCl₂, 20 mM Tris-HCl, pH 8.8). The mixture was centrifuged at 12 000 g at 4 °C for 10 min, and the supernatant was stored at –80 °C.

Paracoccidioides protein extract of yeast was probed using Gel1p and Gel2p antibodies. Twenty micrograms of protein samples were loaded onto a 12% SDS-PAGE gel and separated by electrophoresis. Gels were run at 150 V for approximately 2 h. Protein bands were transferred from gels to nitrocellulose membrane at 30 V for 16 h in buffer containing 25 mM Tris-HCl pH 8.8, 190 mM glycine and 20% (v/v) methanol. Gels were

stained with Ponceau red staining to confirm complete protein transfer. Next, each membrane was submerged in blocking buffer [phosphate-buffered saline solution 1× (PBS; 1.4 mM KH₂PO₄, 8 mM Na₂HPO₄, 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl; pH 7.3), 5% (w/v) nonfat dried milk, 0.1% (v/v) Tween 20] for 2 h. Membranes were washed with buffer [1× PBS, 0.1% (v/v) Tween 20] and incubated with primary antibodies for 2 h at room temperature. Primary antibodies were used at a 1/1000 (v/v) ratio of antibody to buffer. This was followed by three 15-min washes in washing buffer. Membranes were incubated with the conjugated secondary antibody [anti-rabbit immunoglobulin G coupled to alkaline phosphatase (Sigma-Aldrich)] in a 1/5000 (v/v) ratio and developed with 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate–nitroblue tetrazolium (BCIP-NBT). Membranes carrying nuclear extracts were incubated with horseradish-peroxidase conjugated anti-rabbit IgG antibody in a 1/5000 (v/v) ratio, and blots were developed using the enhanced chemiluminescence Western blotting detection (GE Healthcare).

Ultrastructure of *Paracoccidioides* yeast and mycelium cells and immunocytochemistry of Gel1p and Gel2p

For the ultrastructural and immunocytochemistry studies, the protocols previously described in Barbosa *et al.* (2006) were employed. Transmission electron microscopy was performed using thin sections from yeast and mycelium fixed in 2% (v/v) glutaraldehyde, 2% (w/v) paraformaldehyde and 3% (w/v) sucrose in 0.1 M sodium cacodylate buffer pH 7.2. The samples were postfixed in solution containing 1% (w/v) osmium tetroxide, 0.8% (w/v) potassium fericyanide and 5 mM CaCl₂ in sodium cacodylate buffer, pH 7.2. The material was embedded in Spurr resin (Electron Microscopy Sciences, Washington, PA). Ultrathin sections were stained with 3% (w/v) uranyl acetate and lead citrate. For immunolabeling, yeast and mycelium were fixed in a mixture containing 4% (w/v) paraformaldehyde, 0.5% (v/v) glutaraldehyde and 0.2% (w/v) picric acid in 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.2 for 24 h at 4 °C. Free aldehyde groups were quenched with 50 mM ammonium chloride for 1 h. Block staining was performed in solution containing 2% (w/v) uranyl acetate in 15% (v/v) acetone. After dehydration, samples were embedded in LR Gold resin (Electron Microscopy Sciences, Washington, PA). For ultrastructural immunocytochemistry studies, the ultrathin sections were incubated for 1 h with the polyclonal antibody raised against rGel1p (diluted 1 : 10) or rGel2p (diluted 1 : 100) and for 1 h at room temperature with the labeled secondary antibody rabbit IgG, Au-conjugated

(10 nm average particle size; 1 : 20 dilution; Electron Microscopy Sciences). The nickel grids were stained as described above and observed with a Jeol 1011 transmission electron microscope (Jeol, Tokyo, Japan). Controls were incubated with rabbit preimmune serum, diluted 1 : 10 for experiments with Gel1p or 1 : 100 for Gel2p followed by incubation with the labeled secondary antibody.

Isolation of *Paracoccidioides* nuclei and immunofluorescence assays

The isolation of nuclei of *Paracoccidioides* was performed as described by Mosley *et al.* (2009). Spheroplasts were prepared essentially as described by Brito *et al.* (2011). Briefly, yeast cells were harvested, washed and converted to spheroplasts by digestion with 400 U of lyticase (Sigma-Aldrich) at 30 °C for 24 h. Spheroplasts were centrifuged and resuspended in FB buffer [20 mM PIPES, pH 6.5, 18% (w/v) Ficoll 400, 0.5 mM MgCl₂]. Trypan blue was used to assess the spheroplast viability. Spheroplasts were disrupted by homogenization with grinder (Dounce homogenizer, tight pestle) to release the nuclei. Production of spheroplasts and their disruption was monitored by microscopy. Cells were centrifuged at 3000 g for 10 min, and the supernatant was layered over GB buffer [20 mM PIPES, pH 6.5, 20% (v/v) glycerol, 0.5 mM MgCl₂]. After centrifugation at 11 500 g for 30 min at 4 °C, nuclei were resuspended and washed three times in FB buffer to remove cytoplasmic contaminants.

Immunofluorescence was performed on intact cells and isolated nuclei. In the first case, yeast cells were washed with 1× PBS, fixed for 30 min with cold methanol at –80 °C and additionally for 20 min at –20 °C. Cells were treated with 0.2% (v/v) Triton X-100 for 15 min. Cells were incubated in blocking buffer for 1 h [5% (w/v) BSA, 0.1% (v/v) Tween 20]. The antibody raised against Gel1p (diluted 1 : 20) was used. Cells and nuclei were incubated with anti-rabbit IgG coupled to fluorescein isothiocyanate (FITC, 1/200 dilution) for 1 h, and after washes, they were incubated with 50 μM 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) for nuclear staining. Cells and nuclei were observed under an Axio Scope A1 fluorescence microscope. Digital images were acquired using the software AxioVision (Carl Zeiss AG, Germany).

Complementation studies in *S. cerevisiae* and reverse transcription (RT)-PCR

Complementation experiments were performed as described in Castro *et al.* (2009). For ectopic expression of *Paracoccidioides* Gel1p and Gel2p in *S. cerevisiae*, the

corresponding cDNA (GenBank accession numbers XM_002794143 and XM_002793063) was cloned into the yeast expression vector pYES2 (Invitrogen), which is a plasmid that contains a *GAL1*-inducible promoter. The resulting plasmids were used to transform the *S. cerevisiae* WB2d strain (Vai *et al.*, 1996). The transformed strains are indicated throughout the text as YGEL1 and YGEL2. Standard methods were used for DNA manipulation and yeast transformation (Sambrook & Russell, 1989; Hill *et al.*, 1991).

To determine the sensitivity of the different strains to sodium dodecyl sulfate (SDS) and calcofluor white (CW), yeast cells exponentially growing in unbuffered and buffered (pH 6.5) galactose medium were dropped (5 μ L from a concentrated suspension of 10^7 cell mL^{-1} and from serial 10-fold dilutions) onto galactose unbuffered and buffered (pH 6.5) medium plates supplemented with 0.01% (w/v) SDS or 50 mg mL^{-1} of CW. Plates were incubated at 30 °C for 3 days. Cells were also dropped onto plates without SDS and CW to monitor cell growth. *S. cerevisiae* cellular morphology was examined by Nomarski phase-contrast microscopy. Chitin was visualized after staining with CW as reported (Cipollina *et al.*, 2007) under a Nikon Eclipse E600 fluorescence microscope equipped with a Leica DC 350F ccd camera.

Total RNA extraction, RNA cleanup and DNase I treatment were performed as previously reported (Orlandi *et al.*, 2004). The Access RT-PCR System (Promega) was used following the manufacturer's instructions. To assess telomeric silencing, primers amplifying an internal region of the telomeric *YFR057W* and *YER188W* genes were used. *ACT1* mRNA was used for normalization. Primer sequences are available upon request. Experiments were repeated at least twice with different RNA preparations.

Screening of *in vivo* protein–protein interactions through two-hybrid assays

For the *in vivo* interaction studies, we used a cDNA library described previously by Borges *et al.* (2010). To identify protein–protein interactions involving *Paracoccidioides* Gel1p, Gel2p and Gel3p, the cDNAs encoding each Gelp (accession numbers submitted in GenBank: XM_002794143, XM_002793063 and XM_002792886) was subcloned in frame with the *GAL4* DNA binding domain into the bait vector pGBKT7. A truncated form of Gel1 was generated by PCR amplification of the gene with the forward primer 5'-GAATTCCGGCAAGGCCAAC AGTGCAA-3' and the reverse primer 5'-CTG-CAGTTAGACCACGATCAATGAAACG-3'. The forward primer was complementary to nucleotides 61–80, relative

to the translational start codon, and incorporated an EcoRI site (underlined) at the 5' end. The reverse primer was complementary to nucleotides 1310–1333 of the coding region and incorporated a PstI site (underlined) at the 3' end. A truncated form of Gel2 was generated by PCR amplification of the gene with the forward primer 5'-CCC GG GGT TACCCCATCAGCATCGAA-3' and the reverse primer 5'-CTGCAGTGTGCTCCTCTATAACCATA AGC-3'. The forward primer was complementary to nucleotides 128–148, relative to the translational start codon, and incorporated a SmaI site (underlined) at the 5' end. The reverse primer was complementary to nucleotides 1404–1425 of the coding region and incorporated a PstI site (underlined) at the 5' end. A truncated form of Gel3 was generated by PCR amplification of the gene with the forward primer 5'-GAATTC CGCTGACCTGGATCCTATT GTC-3' and the reverse primer 5'-CTGCAGTTACAACAA CAAAATACTCATC-3'. The forward primer was complementary to nucleotides 55–75, relative to the translational start codon, and incorporated an EcoRI site (underlined) at the 5' end. The reverse primer was complementary to nucleotides 1569–1590 of the coding region and incorporated a PstI site (underlined) at the 3' end. All constructs were confirmed by DNA sequencing. The generation of transformants was performed by introducing each bait vector into *S. cerevisiae* yeast strain Y187 (*MATa*, *trp1-901*), which allows selection in minimal medium without tryptophan, and the prey vector into the *S. cerevisiae* strain AH109 (*MATa*, *leu2-3*), allowing the selection in minimal medium without leucine. The experimental protocol was performed according to the Matchmaker *gal4* Two-Hybrid System 3 manual and the Yeast Protocol Handbook (Clontech). Following cell mating, the *S. cerevisiae* diploids containing the two vectors were selected from plates containing minimal media without leucine and tryptophan. The positive interactions activate the transcription of *ADE2*, *HIS3*, *MEL1* and *lacZ* reporter genes. To exclude false-positive clones, the colonies were replicated using high-stringency plates containing minimal media without adenine, histidine, leucine and tryptophan. The screening of positive clones was accomplished by detecting the blue/white color of the substrate 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- α -D-galactopyranoside (X- α -Gal), confirming the activation of the *MEL1* reporter gene. A PCR colony assay was performed using the AD-LD 5' and AD-LD 3' supplied oligonucleotides for the pGADT7-Rec bait plasmid. The PCR products of the identified transformants were subjected to DNA sequencing using a MegaBACE 1000 sequencer (GE Healthcare[®]) for automated sequence analysis. Sequence homologies to the genes of interest were performed by searching the GenBank database using the BLAST algorithm (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

In vitro translation and coimmunoprecipitation assays

The potential interactions detected for Gel1p, Gel2p and Gel3p were confirmed using the *in vitro* translation system TNT[®] T7 Coupled Reticulocyte Lysate Systems (Promega) with S³⁵ methionine and coimmunoprecipitation of the translated proteins (Matchmaker[™] Co-IP Kit, Clontech Laboratories, Inc.). The PCR products of selected colonies were used as a template for the *in vitro* transcription/translation. Briefly, the translated baits Gel1p, Gel2p and Gel3p, fused to a c-myc epitope (c-myc), and the translated prey proteins fused to a hemagglutinin epitope (HA) were mixed at 25 °C for 1 h. The mixture was incubated with protein A beads and with the monoclonal c-myc antibody in 1 × PBS at 25 °C for 1 h. After washing, the beads containing proteins were resuspended in SDS-loading buffer [50 mM Tris–HCl, pH 6.8; 100 mM dithiothreitol, 2% (w/v) SDS; 0.1% (w/v) bromophenol blue; 10% (v/v) glycerol], followed by boiling at 80 °C for 5 min. The proteins were separated on a SDS-PAGE 4–12% linear gradient. The gel was fixed with 20% (v/v) ethanol and 10% (v/v) acetic acid for 30 min and incubated in 20 mL of fluorographic reagent NAMP 100 (Amplify Fluorographic Reagent – GE Healthcare[®]). The gels were dried at 80 °C for 90 min under vacuum, and autoradiography was obtained. Negative controls were obtained using *in vitro*-translated preys that were immunoprecipitated with the c-myc monoclonal antibody. Each assay was repeated three times with a different batch of *in vitro*-translated product to confirm the results.

Schematic drawing construction

To provide an illustration of the putative localizations of partner proteins detected in the *Paracoccidioides* Gelsp two-hybrid screening, a schematic drawing was constructed. Putative localizations of partner proteins were based on literature data of proteins from fungi.

Results

In silico analysis of the *Paracoccidioides* beta-1,3-glucanosyltransferases

The Gel-deduced amino acids sequences obtained from the *Paracoccidioides* genome database (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html) were aligned. The deduced proteins Gel1p, Gel2p and Gel3p in both *Pb01* and *Pb18* sequences present the same conserved motifs. The deduced proteins contain a predicted signal sequence at the N-terminal end followed by the conserved domain present in the GH72 family of proteins (Mouyna *et al.*, 2000) and a region at

the C-terminus that is predicted to be GPI anchor (Supporting information, Fig. S1a and b). Two glutamic residues, which are essential for the enzymatic activity (Carotti *et al.*, 2004), were conserved in the catalytic domain of the three *Paracoccidioides* Gel sequences. Previous studies with Gel3p showed that it has significant homology with proteins of the GH72 family. The *Paracoccidioides* Gel3p also contains a domain named Cys-Box, which contains six conserved cysteine residues (Castro *et al.*, 2009). This is an additional domain shared by some members of the GH72 proteins that bears sequence similarity with proteins of the carbohydrate-binding module family 43 (CBM43) (Palomares *et al.*, 2003; Carotti *et al.*, 2004; Barral *et al.*, 2005).

A phylogenetic analysis of GH72 proteins has shown that they cluster into two subfamilies, GH72⁺ and GH72⁻, which differ in the presence or absence of the Cys-box. Thus, from a phylogenetic tree constructed with the *Paracoccidioides* Gel sequences and beta-1,3-glucanosyltransferases from other fungi sequences (Fig. S2), Gel1p and Gel2p from *Paracoccidioides* were clustered into the subfamily GH72⁻ while Gel3p clustered with members of the GH72⁺ subfamily, which is consistent with the protein sequence alignment and the related clusters obtained by Ragni *et al.* (2007b). The high identity of members of the Gel family is demonstrated in this figure.

The deduced Gelsp presented high identity in *Paracoccidioides*, *Pb01* and *Pb18*. By comparing the deduced proteins, identity values of 82%, 98% and 97%, for Gel1p, Gel2p and Gel3p, have been found, respectively (data not shown). Owing to these high identity values among the members of the *Paracoccidioides* Gelsp family, we utilized the sequences of *GEL1*, *GEL2* and *GEL3* of *Pb01* in further experiments.

Detection of Gel1p and Gel2p by microscopy in *Paracoccidioides* cells

As localization of Gel3p in yeast cells has been determined (Castro *et al.*, 2009), immunocytochemistry experiments were performed to define the cellular localization of Gel1p and Gel2p using the polyclonal antibodies anti-Gel1p and anti-Gel2p, respectively. Western blot analysis demonstrated the specificity of the polyclonal antibodies in cells of the two lineages of *Paracoccidioides*. The antibody anti-Gel1p recognized a single-protein species of 51 kDa in yeast (Fig. S3a and b, lanes 1), and the anti-Gel2p antibody recognized a single-protein species of 54 kDa (Fig. S3a and b, lanes 3) in both, *Pb01* and *Pb18*. No cross-reactivity was observed with preimmune sera (Fig. S3a and b, lanes 2 and 4). In cells processed by the postembedding method, gold particles revealed the localization of Gel1p and Gel2p in *Paracoccidioides Pb01* and *Pb18* (Figs 1 and 2, Figs S4 and

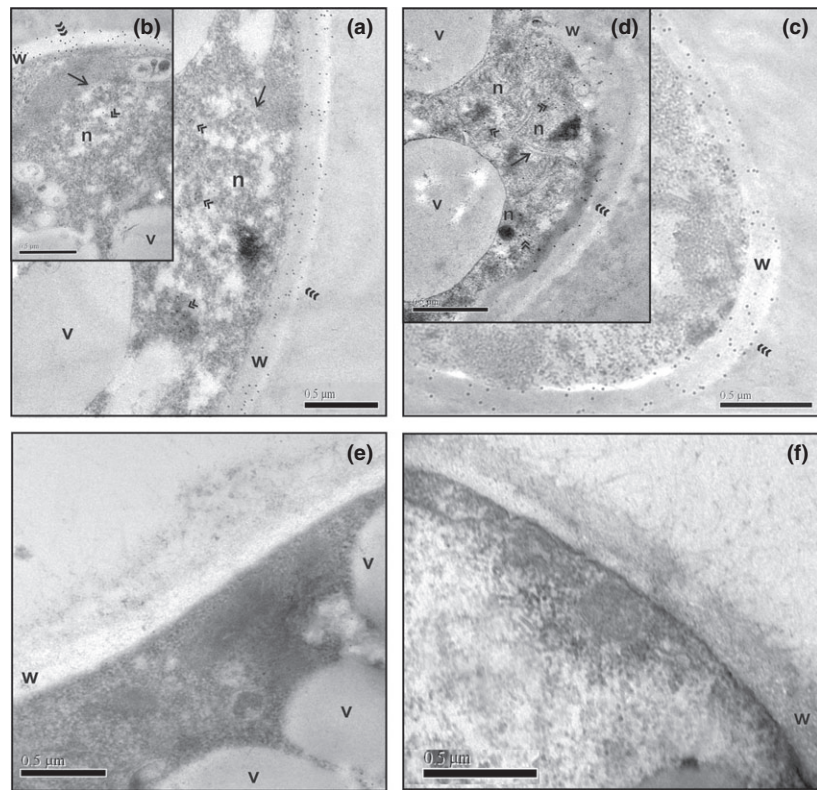


Fig. 1. Localization of Gel1p in *Paracoccidioides*, Pb01, mycelium and yeast cells by immunoelectron microscopy. (a and b) Gold particles are observed at the fungus cell wall (w) (triple arrowheads) and in the nucleus (n) (double arrowheads) mycelium. The nuclear membranes are indicated by the arrows. (c and d) Gold particles are observed in yeast cells. The triple arrowheads indicate that Gel1p is present in the cell wall, and the double arrowheads indicate the presence of Gel1p in the nucleus. The nuclear membranes are indicated by the arrows. (e and f) Negative controls were exposed to the rabbit preimmune serum in mycelium and yeast cells, respectively. v, vacuole.

S5). Interestingly, both in mycelium and in yeast cells, the Gel1p was associated with the cell wall and with the nucleus (Fig. 1a–d, Fig. S4a and b). Control samples were free of label (Fig. 1e and f, Fig. S4c). For Gel2p, gold immune label was predominantly associated with the cell wall (Fig. 2a–d, Fig. S5a and b). The control samples were free of label when incubated with the rabbit preimmune serum (Fig. 2e and f, Fig. S5c).

To confirm the nuclear association of Gel1p, *Paracoccidioides* yeast cells and the nuclear fraction were incubated with anti-Gel1p polyclonal antibody and with DAPI and analyzed by fluorescence microscopy. After image merging, it was observed that Gel1p co-localized with DAPI staining either in intact cells (Fig. S6a) or in the nuclear fraction (Fig. S6c). Control with preimmune sera are presented in Fig. S6b and d. Western blot analysis of the nuclear fraction with the anti-Gel1p polyclonal antibody is presented in Fig. S6e. A protein species of 51 kDa was detected (Fig. S6e, lane 1). No cross-reaction was obtained with the preimmune serum (Fig. S6e, lane 2).

Gel1p and Gel2p differently complement the *S. cerevisiae* *gas1* null mutant phenotype

In a previous study, we demonstrated that Gel3p, a member of the beta-1,3-glucanosyltransferase family of *Para-*

coccidioides, completely rescued the phenotypic defects resulting from *GAS1* inactivation including slow growth, abnormal morphology and hypersensitivity to CW and SDS (Castro *et al.*, 2009). The complementation was performed in buffered growth medium similar to the conditions for *GAS4*, a paralog of *GAS1*, which encodes a protein that is functional at a pH value close to neutrality (Ragni *et al.*, 2007a).

Here, we tested whether the other glucanosyltransferase family members were able to replace Gas1p function *in vivo*. The *GEL1* and *GEL2* cDNAs of Pb01 were placed under the control of the *GAL1* promoter in a *gas1Δ* background, and their expression was analyzed by RT-PCR. In transformed cells (namely YGEL1 and YGEL2 strains) grown in unbuffered or buffered (pH 6.5) galactose media, a unique transcript was detected at a high level (Fig. 3a). Then, we examined the phenotype YGEL1 and YGEL2 strains. First, we analyzed cellular growth by counting cell number over time during the exponential phase. As shown in Table 1, in both growth conditions, the YGEL1 strain had a slow growth similar to that of the *gas1Δ* mutant, indicative of lack of complementation. In agreement with this, YGEL1 cells showed hypersensitivity to growth in the presence of SDS and CW (Fig. 3b).

In contrast, Gel2p completely suppressed the *gas1Δ* phenotype in buffered growth conditions. In fact, the

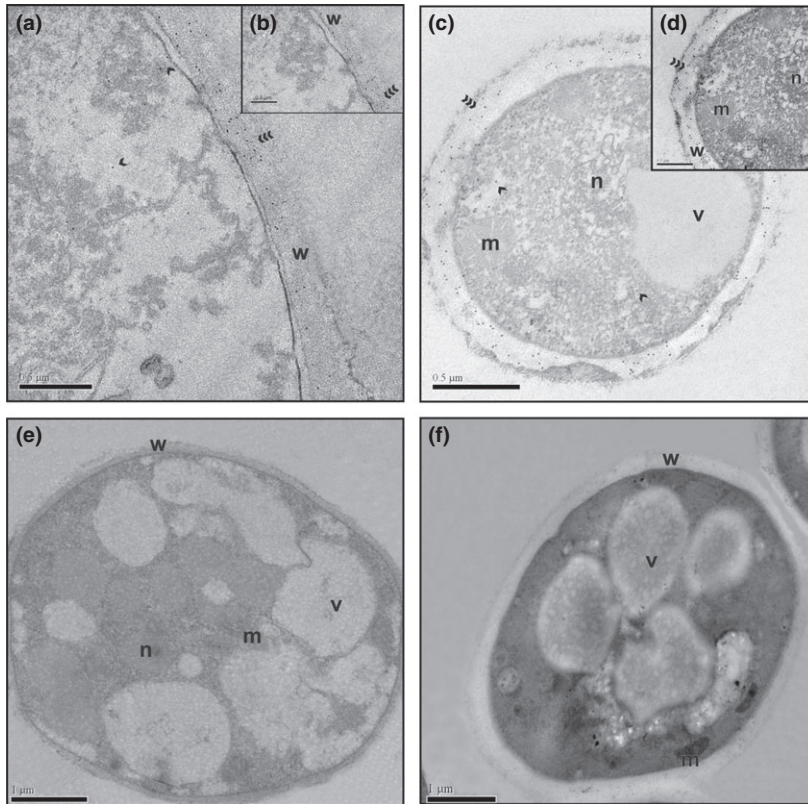


Fig. 2. Detection of Gel2p in *Paracoccidioides*, Pb01, mycelium and yeast cells by immunoelectron microscopy. (a and b) Gold particles are observed at the fungus cell wall (w) (triple arrowheads) and in the cytoplasm (arrowheads) in mycelium. (c and d) Gold particles are observed at the fungus cell wall (w) (triple arrowheads) and in the cytoplasm (arrowheads) in a yeast cell. (e and f) Negative controls were exposed to the rabbit preimmune serum in mycelium and yeast cells, respectively. v, vacuole; m, mitochondrion; n, nucleus.

YGEL2 strain showed a similar growth rate in galactose medium (pH 6.5) (Table 1) and the same sensitivity to SDS and CW (Fig. 3b) as wild-type cells. Under these growth conditions, YGEL2 cells reassumed the ellipsoidal shape, and cells carrying two or more buds that are distinctive of *gas1Δ* mutant were absent (Fig. 3c). Moreover, upon CW staining, *gas1Δ* cells, showed increased and delocalization of chitin as expected, while in YGEL2 cells, chitin showed a clear localization in the bud scars and at the mother–daughter junction (Fig. 3c). On the contrary, in unbuffered growth conditions, the YGEL2 strain displayed the same phenotypic defects as the *gas1Δ* mutant (Table 1 and Fig. 3b).

As shown in Fig. 1a–d (Figs S4a and S6a–c), *Paracoccidioides* Gel1p, similar to Gas1p, was also associated with the nucleus. As the localization of Gas1p in *S. cerevisiae* to the nuclear periphery correlates with a role of this protein in telomeric silencing (Koch & Pillus, 2009), we decided to analyze whether *Paracoccidioides* Gel1p had similar activity. Thus, in the YGEL1 strain grown on galactose-buffered medium, we assessed gene expression of two telomeric genes, *YFR057W* and *YER188W*, which are localized on chromosomes VI-R and V-R, respectively. In agreement with the changes observed by Koch & Pillus (2009), the *YFR057W* transcript was up-regulated in the *gas1Δ* and *sir2Δ* mutants used as control (Fig. 3d).

Sir2p is a NAD^+ -dependent deacetylase that has a key role in the establishment and maintenance of silent chromatin: Its loss of function severely reduces telomeric silencing (Blander & Guarente, 2004). Interestingly, in YGEL1 cells, *YFR057W* expression was similar to that in the wild-type strain, which is indicative of intact telomeric silencing. On the other hand, in both YGEL2 and YGEL3 strains, the *YFR057W* level was increased as in the *gas1Δ* mutant (Fig. 3d). In *gas1Δ* cells transformed with a plasmid carrying a wild-type copy of *GAS1*, silencing was restored (data not shown). The *gas1Δ* silencing defect was also observed on chromosome V-R (*YER188W* up-regulation), in agreement with reporter assays (Koch & Pillus, 2009). In YGEL1 cells, the *YER188W* silencing was completely restored, while in both YGEL2 and YGEL3 strains telomeric silencing was impaired as in the *gas1Δ* mutant (Fig. 3d). The same results were obtained for cells grown on galactose unbuffered medium (data not shown).

In vivo* detection of proteins interacting with Gel proteins of *Paracoccidioides

A yeast two-hybrid assay was employed to identify proteins that interact with Gel1p, Gel2p and Gel3p. For this, a cDNA library was constructed of RNAs obtained from *Paracoccidioides* yeast cells (Borges *et al.*, 2010). The

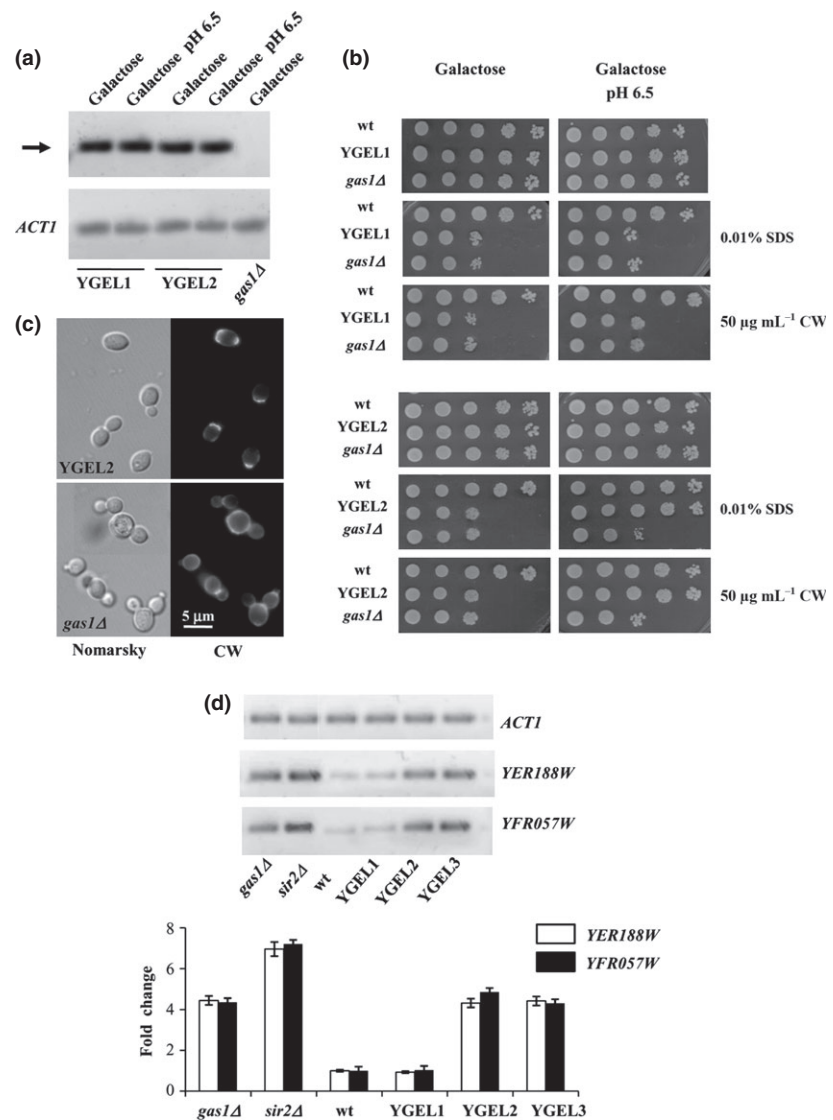


Fig. 3. Analysis of the complementation of the *Saccharomyces cerevisiae gas1Δ* mutant phenotype by the expression of *Paracoccidioides*, *GEL1* and *GEL2*. (a) In the indicated strains, transcript levels of *GEL1* and *GEL2* were analyzed by RT-PCR. *ACT1* was used as a normalizing control. Only a representative example of RT-PCR amplification obtained in the *gas1Δ* mutant is shown. (b) The indicated strains were grown in an unbuffered and buffered medium containing galactose at 30 °C. During exponential growth, a concentrated suspension of cells was prepared and sensitivity to SDS and CW was tested as described in Material and methods. Plates were incubated at 30 °C, and growth was analyzed after 3 days. wt, wild type. (c) Cellular morphology, visualized by Nomarsky, and CW staining of the indicated strains exponentially growing in galactose medium, pH 6.5. (d) In the indicated strains, transcript levels of *YFR057W* and *YER188W* were analyzed as in (a). Representative examples of RT-PCR amplifications are shown (upper panels). For each strain, signal intensities of *YFR057W* and *YER188W* were normalized to *ACT1*. Quantitative data are shown as fold change estimated by dividing each normalized value obtained for the different mutants to the wt, which was arbitrarily set to 1 (lower panels). Standard deviations are indicated.

positive mating clones growing on high-stringency minimal medium were plated on medium containing X-alpha-Gal (data not shown) and subjected to PCR. The PCR products were subjected to DNA sequencing. The positive cDNAs obtained from each Gelp interaction assay are listed in Table 2. Some cDNAs were redundant in the same two-hybrid assay, such as those encoding homologs of heat shock protein (Hsp90), anthranilate synthase component 2 and phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase (Its3). cDNAs encoding homologs of proteins that participate in different pathways were detected. Some pathways were found in more than one yeast two-hybrid assay, such as amino acid biosynthesis, lipid metabolism and cytokinesis. Some cDNAs encoded homologs that interact with more than one Gel protein. Its3 protein interacts with Gel2p and Gel3p. In addition, a predicted

protein with unknown function (accession number: XP_002797017) was shown to interact with both Gel1p and Gel3p. Figure 4 shows the confirmation of yeast two-hybrid-identified interactions by coimmunoprecipitation assays. Negative controls were performed to confirm the specific Gel protein fusion to the c-myc epitope by the recognition of the translated prey proteins with the commercial c-myc antibody (Fig. 4, lanes marked with 'c'). Figure 5 depicts interactions with Gel proteins. This schematic drawing was constructed based on published data regarding localization of the proteins in fungi. As depicted in Fig. 5, several proteins interacting with Gel1p, Gel2p and Gel3p are described to be present on the surface of cells. The Gel2p was also detected in the cytoplasm of *Paracoccidioides*, and interacting proteins such as SAMB and MAD2B have been also described to localize

Table 1. Duplication times in unbuffered and buffered growth conditions

Growth condition	Strain	T_d (h)*
Galactose medium (unbuffered)	W303-1B	1.78 ± 0.08
	<i>gas1Δ</i>	3.03 ± 0.12
	YGEL1	3.08 ± 0.09
	YGEL2	2.93 ± 0.06
Galactose medium (pH 6.5)	W303-1B	2.33 ± 0.05
	<i>gas1Δ</i>	4.08 ± 0.09
	YGEL1	3.96 ± 0.11
	YGEL2	2.46 ± 0.07

*The duplication time (T_d) was calculated as $\ln 2/k$, where k is the constant rate of exponential growth. Data represent the average of three independent experiments. Standard deviations are indicated.

to the cytoplasm. Gel1p was detected also in the *Paracoccidioides* nucleus, and some described nuclear proteins were identified as partner proteins by the two-hybrid assays.

Discussion

The mechanisms involved in the *Paracoccidioides* cell wall assembly and integrity maintenance are poorly known. Previous transcriptional data allowed the identification of several cell wall-related genes (Castro *et al.*, 2005; Tomazett *et al.*, 2005). Among them, Fks1p, a beta-1,3-glucan synthase, and the Gel3p, a beta-1,3-glucanosyltransferase family member, were characterized (Castro *et al.*, 2009). Functional analysis of *Paracoccidioides* Gel3p, showing its capacity to rescue the *S. cerevisiae gas1Δ* mutant phenotype, indicates that this enzyme plays an active role in biosynthesis and morphogenesis of the fungus cell wall (Castro *et al.*, 2009). Other genes encoding beta-1,3-glucanosyltransferases (Gel1p and Gel2p) in the genome of *Paracoccidioides* warrant additional studies of the glucanosyltransferase family in this fungus.

The high level of identity among members of the Gel family in *Paracoccidioides*, as demonstrated in our *in silico* analysis, validated the use of the genomic sequences of GELs of strain Pb01 in analyzing the roles of the cognate proteins in the biology of *Paracoccidioides*. Also, the high conservation (from 82% to 98%) is strong evidence that Gelsp of the both phylogenetic species, PS1- and Pb01-like of *Paracoccidioides*, can play the same functions. The potential roles of Gel1p and Gel2p in cell wall biosynthesis and morphogenesis of *Paracoccidioides* were investigated by analyzing their ability to rescue *in vivo* the *S. cerevisiae gas1Δ* mutant phenotype. In *S. cerevisiae*, the lack of Gas1 beta-1,3-glucanosyltransferase activity drastically affects the correct relative proportion and degree of cross-linking of cell wall constituents (Popolo *et al.*, 1997; Ram *et al.*, 1998). This leads to a detectable mutant phe-

notype characterized by reduced growth, round cell morphologies, sensitivity to CW and defects in bud maturation and cell separation besides increased cell wall permeability and secretion (Popolo & Vai, 1999; Vai *et al.*, 2000). Interestingly, Gel2p was able to complement the mutant phenotype of *gas1Δ* in buffered medium, suppressing both the morphological defects and the compensatory responses induced by the lack of Gas1p. Previously, similar results were found for Gel3p (Castro *et al.*, 2009) and for Gas2p and Gas4p of *S. cerevisiae*, two redundant versions of Gas1p that are specialized to function at pH values close to neutrality (Ragni *et al.*, 2007a), suggesting that Gel2p can be involved in fungal cell wall biosynthesis and morphogenesis in *Paracoccidioides*. In contrast, the ectopic expression of Gel1p did not complement the morphological and growth defects of the *gas1Δ* mutant in either unbuffered or buffered media. Recently, it has also been reported that the ectopic expression of Gas3p in *S. cerevisiae* did not complement *gas1Δ* defects (Rolli *et al.*, 2010).

Interestingly, the localization of Gel1p and Gel2p analyzed by immunoelectron microscopy in *Paracoccidioides* showed that Gel1p is associated with the surface and with the nucleus of the fungus while Gel2p was associated both with the cell wall and with the cytoplasm. Immunofluorescence and Western blot analysis add strength to the hypothesis of the association of Gel1p with nuclei. An unsuspected localization to the nuclear periphery has been also described for Gas1p in *S. cerevisiae* (Koch & Pillus, 2009; Mosley *et al.*, 2009). This correlates with a Gas1 role in locus-specific transcriptional silencing in a manner that is independent from its established function at the cell wall (Koch & Pillus, 2009). In accordance with these data, we speculate that Gel1p might perform other functions besides the building of the fungus cell wall. In fact, although the ectopic expression of Gel1p did not complement the morphological and growth defects of the *gas1Δ* mutant, we found that it is able to restore loss of silencing at telomeres because of GAS1 inactivation. This feature is specific to Gel1p because Gel2p and Gel3p do not complement the *gas1Δ* telomeric defects. Taken together, these results indicate that Gel1p could participate in transcriptional silencing suggesting a nuclear role for a putative carbohydrate modification enzyme in *Paracoccidioides*, as reported for *S. cerevisiae* (Koch & Pillus, 2009).

The novel cellular localization and putative function of glucanosyltransferases elicited our interest in studying the protein interactions of the *Paracoccidioides* Gel proteins. We identified proteins that interact with Gel1p, Gel2p and Gel3p by an *in vivo* two-hybrid system. We showed that *Paracoccidioides* Gel proteins interact with proteins presumably located in different cellular compartments,

Table 2. Gene products identified in *Paracoccidioides* Gel1p, Gel2p, and Gel3p two-hybrid screening

Gene products	Protein ID*	Organism/accession number†	E value/redundancy	Classic function‡	Cellular localization§	References¶
Gel1						
Alpha-glucosides permease MPH2/3**	MPH2	<i>Paracoccidioides</i> , Pb01/XP_002794175	2 ^{e-60} /1	Transmembrane transport	Cellular surface	Day et al. (2002)
Arginine biosynthesis bifunctional protein argJ	–	<i>Paracoccidioides</i> , Pb01/XP_002790790	6 ^{e-61} /2	Amino acid biosynthesis	Mitochondrion	Crabeel et al. (1997)
Cell division control protein (septin)	SEPT	<i>Paracoccidioides</i> , Pb01/XP_002797643	5 ^{e-29} /1	Cytokinesis	Cellular surface	Longtine & Bi (2003)
Cell wall-anchored protein	–	<i>Ajellomyces capsulatus</i> /EGC42237.1	3 ^{e-30} /1	Unknown	ND	–
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B	EIF3B	<i>Paracoccidioides</i> , Pb01/XP_002791819	3 ^{e-105} /1	Protein synthesis regulation	Cellular surface	Albuquerque et al. (2008)
Farnesyltransferase, alpha subunit**	–	<i>Paracoccidioides</i> , Pb18/EEH48029	1 ^{e-78} /1	Posttranslational modification	ND	–
GDSL Lipase/Acylhydrolase family protein**	–	<i>Paracoccidioides</i> , Pb18/EEH49274	4 ^{e-28} /2	Lipid metabolism	ND	–
Glycine dehydrogenase**	GLDC	<i>Paracoccidioides</i> , Pb01/XP_002796560	1 ^{e-82} /3	Glycine catabolism	Cellular surface	Albuquerque et al. (2008)
Heat shock protein (Hsp90)	HSP90	<i>Paracoccidioides</i> , Pb01/XP_002792393	0.0/4	Chaperone	Cellular surface	Cabezon et al. (2009)
Mitochondrial ATPase inhibitor	–	<i>Paracoccidioides</i> , Pb03 and Pb18/EEH18729 and EEH48355	1 ^{e-54} /1	Enzyme inhibitor activity	ND	–
Putative acid phosphatase**	PAP	<i>Paracoccidioides</i> , Pb01/XP_002792481	9 ^{e-73} /1	Hydrolase	Cellular surface	Bernard et al. (2002)
Pyruvate dehydrogenase E1 component, beta subunit**	PDHB	<i>Paracoccidioides</i> , Pb01/XP_002796526	2 ^{e-105} /2	Glycolysis, conversion of pyruvate to acetyl-CoA and CO ₂	Cellular surface	Rodrigues et al. (2008)
Pyruvate kinase**	PK	<i>Paracoccidioides</i> , Pb01, Pb03 and Pb18/XP_002791641, EEH20554 and EEH45128	3 ^{e-80} /1	Glycolysis, conversion of pyruvate to phosphoenolpyruvate	Cellular surface	Cabezon et al. (2009)
RNA interference and gene-silencing protein (Qde2)**	QDE2	<i>Paracoccidioides</i> , Pb01/XP_002794686	1 ^{e-36} /3	Nucleic acid binding	Nucleus	Martenssen et al. (2005)
RNA polymerase II transcription factor B subunit 2	RPB2	<i>Paracoccidioides</i> , Pb01, Pb03 and Pb18/XP_002791593, EEH20511 and EEH45083	3 ^{e-26} /1	Transcription regulation	Nucleus	Wang et al. (1995)
Sulfatase domain-containing protein	–	<i>Paracoccidioides</i> , Pb01/XP_002791669	5 ^{e-33} /1	Metabolism (hydrolase activity)	ND	–
Thymine dioxygenase	–	<i>Paracoccidioides</i> , Pb03 and Pb18/EEH17985 and EEH46874	1 ^{e-58} /3	Oxidoreductase activity	ND	–
Transcription elongation factor Spt6**	SPT6	<i>Paracoccidioides</i> , Pb18/EEH49900	9 ^{e-66} /1	Transcription regulation	Nucleus	Bortvin & Winston (1996)
Transcription factor RteF	–	<i>Ajellomyces capsulatus</i> /EGC48019	6 ^{e-77} /1	Transcription regulation	ND	–

Table 2. Continued

Gene products	Protein ID*	Organism/accession number†	E value/ redundancy	Classic function‡	Cellular localization§	References¶
Tubulin alpha-1 chain	TUBA1	<i>Paracoccidioides</i> , Pb01, Pb03 and Pb18/XP_002796639, EEH21480 and EEH43839	$2^{e-107/2}$	Cytoskeleton component (protein polymerization)	Cellular surface	Rodrigues et al. (2008)
Conserved hypothetical protein	-	<i>Paracoccidioides</i> , Pb01/XP_002796245	$4^{e-37/3}$	ND	ND	-
Conserved hypothetical protein	-	<i>Paracoccidioides</i> , Pb18/EEH46259	$4^{e-31/68}$	ND	ND	-
Conserved hypothetical protein	-	<i>Paracoccidioides</i> , Pb01/XP_002789109	$4^{e-32/1}$	ND	ND	-
Conserved hypothetical protein	-	<i>Paracoccidioides</i> , Pb01/XP_002793787	$4^{e-162/1}$	ND	ND	-
Conserved hypothetical protein	-	<i>Paracoccidioides</i> , Pb01/XP_002797737	$7^{e-68/1}$	ND	ND	-
Conserved hypothetical protein	-	<i>Paracoccidioides</i> , Pb01/XP_002796469	$2^{e-59/1}$	ND	ND	-
Predicted protein	-	<i>Paracoccidioides</i> , Pb01/XP_002797078	$2^{e-37/1}$	ND	ND	-
Predicted protein††	-	<i>Paracoccidioides</i> , Pb01/XP_002797017	0.0/1	ND	ND	-
Predicted protein	-	<i>Paracoccidioides</i> , Pb01/XP_002791637	$3^{e-48/1}$	ND	ND	-
Predicted protein	-	<i>Paracoccidioides</i> , Pb01/XP_002789336	$6^{e-50/1}$	ND	ND	-
Hypothetical protein**	-	-	-/2	ND	ND	-
Hypothetical protein**	-	-	-/3	ND	ND	-
Hypothetical protein**	-	-	-/2	ND	ND	-
Hypothetical protein**	-	-	-/1	ND	ND	-
Hypothetical protein**	-	-	-/1	ND	ND	-
Hypothetical protein**	-	-	-/1	ND	ND	-
Hypothetical protein**	-	-	-/1	ND	ND	-
Hypothetical protein**	-	-	-/1	ND	ND	-
Gel2	-	-	-	-	-	-
Anthraniolate synthase component 2	-	<i>Paracoccidioides</i> , Pb01/XP_002789411	0.0/4	Amino acid biosynthesis	ND	-
G protein complex beta subunit CpcB	CPCB	<i>Paracoccidioides</i> , Pb01 and Pb03/XP_002791085 and EEH20774	$6^{e-71/1}$	Cell morphogenesis	Cytoplasm	Valerius et al. (2007)
Mitotic spindle checkpoint protein (Mad2B)**	MAD2B	<i>Paracoccidioides</i> , Pb01/XP_002794342	$5^{e-67/1}$	Cell division control (mitosis)	Nuclear pore complex	Iouk et al. (2002)
MYND domain protein (SamB)**	SAMB	<i>Paracoccidioides</i> , Pb01, Pb03 and Pb18/XP_002795772, EEH49546 and EEH22754	$9^{e-40/1}$	Cell morphogenesis	Cytoplasm	Kruger & Fischer (1998)
Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-Kinase Its3§§	ITS3	<i>Paracoccidioides</i> , Pb01, Pb03 and Pb18/XP_002792211, EEH23461 and EEH49920	$2^{e-09/1}$	Cytokinesis	Cellular surface	Vancurova et al. (1999)
WD repeat protein	-	<i>Paracoccidioides</i> , Pb01/XP_002790747	$2^{e-70/1}$	Cell morphogenesis (protein binding)	ND	-
Conserved hypothetical protein	-	<i>Paracoccidioides</i> , Pb01/XP_002797979	$9^{e-58/1}$	ND	ND	-
GelB	-	-	-	-	-	-
3-Oxoacyl reductase	-	<i>Paracoccidioides</i> , Pb01/XP_002791870	$2^{e-20/1}$	Lipid metabolism	Mitochondrion	Schneider et al. (1997)
5'-3' exoribonuclease	-	<i>Paracoccidioides</i> , Pb01/XP_002789200	$2^{e-102/1}$	Transcription regulation	Nucleus	Amberg et al. (1992)

Table 2. Continued

Gene products	Protein ID*	Organism/accession number†	E. Value/ redundancy	Classic function‡	Cellular localization§	References¶
ATP-dependent RNA helicase Dbp5**	–	<i>Paracoccidioides</i> , Pb03/EEH18264	4 ^{e-60} /1	Protein synthesis regulation	Cytoplasm	Tseng <i>et al.</i> (1998)
Leptomycin B resistance protein Pmd1	PMD1	<i>Paracoccidioides</i> , Pb01/XP_002790798	5 ^{e-43} /1	Transmembrane transport	Cellular surface	Nishi <i>et al.</i> (1992)
Lipase/serine esterase**	–	<i>Paracoccidioides</i> , Pb01/XP_002796507	4 ^{e-75} /1	Lipid metabolism	ND	–
Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase Its3§§	ITS3	<i>Paracoccidioides</i> , Pb01, Pb03, and Pb18/XP_002792211, EEH23461 and EEH49920	9 ^{e-14} /31	Cytokinesis	Cellular surface	Vancurova <i>et al.</i> (1999)
Protein kinase Dsk1	–	<i>Paracoccidioides</i> , Pb01/XP_002796597	4 ^{e-38} /1	Cell division control	Cytoplasm	Takeuchi & Yanagida (1993)
Transcription factor Ctf1B	–	<i>Paracoccidioides</i> , Pb01/XP_002797034	2 ^{e-97} /2	Transcription regulation	ND	–
Conserved hypothetical protein	–	<i>Paracoccidioides</i> , Pb01/XP_002796037	4 ^{e-36} /1	ND	ND	–
Conserved hypothetical protein	–	<i>Paracoccidioides</i> , Pb01/XP_002792818	3 ^{e-110} /1	ND	ND	–
Conserved hypothetical protein	–	<i>Paracoccidioides</i> , Pb18/EEH49628	2 ^{e-32} /1	ND	ND	–
Predicted protein††	–	<i>Paracoccidioides</i> , Pb01/XP_002797017	7 ^{e-13} /1	ND	ND	–

*Protein name abbreviations used in the schematic drawing, Fig. 5.

†GenBank accession numbers (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

‡Classical functions obtained from the UniProt database (<http://www.uniprot.org>).

§Cellular localizations based on fungal literature data.

¶References for cellular localizations of homologs proteins in fungi.

**Interactions confirmed by coimmunoprecipitation.

††Proteins found to interact with both PbGel1 and PbGel3.

**No homology found in the databases searched.

§§Proteins found to interact with both PbGel2 and PbGel3.

ND, not determined.

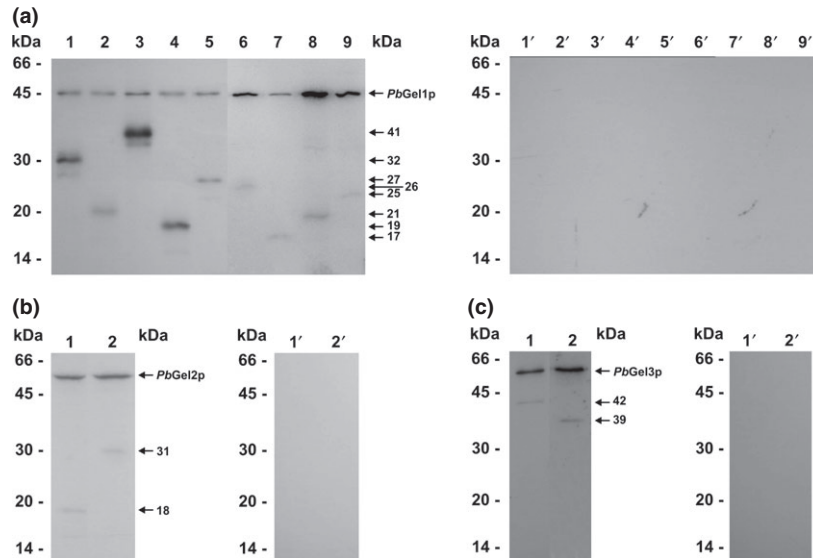


Fig. 4. *Paracoccidioides* Gel1p, Gel2p, and Gel3p interactions confirmed by coimmunoprecipitation assay. Proteins that were predicted to interact with Gel proteins by the yeast two-hybrid assay were *in vitro* synthesized and labeled with ^{35}S -methionine. The translated Gel1p (a), Gel2p (b), and Gel3p (c) fused into the c-myc epitope and the translated partner proteins fused into the hemagglutinin epitope were mixed, and the mixture was incubated with protein A-agarose beads and the monoclonal anti-c-myc. The proteins were separated by SDS-PAGE. The gels were fixed and dried under vacuum, and autoradiographies were obtained. The numbers on the left of the autoradiographies correspond to the molecular weight marker and the numbers on the right correspond to the molecular weight of the proteins obtained in this assay. (a) Gel1p, 45 kDa, and pyruvate dehydrogenase (lane 1), alpha-glucosidase permease MPH2/3 (lane 2), putative acid phosphatase (lane 3), lipase/acylhydrolase of the GDSL family (lane 4), farnesyltransferase (lane 5), glycine dehydrogenase (lane 6), RNA interference and gene-silencing protein Qde2 (lane 7), pyruvate kinase (lane 8), transcription elongation factor Spt6 (lane 9). (b) Gel2p, 52 kDa, and MYND domain protein SamB (lane 1), mitotic spindle checkpoint protein Mad2B (lane 2). (c) Gel3p, 55 kDa, and lipase/serine esterase of the GDSL family (lane 1), ATP-dependent RNA helicase Dbp5 (lane 2). Negative controls were performed [a, b, and c: lanes marked with a quote (') corresponding to the control of the reaction in the lane numbered without the quote].

including the cell wall, cytoplasm and nucleus. Some of these interactions could be related to cell morphogenesis and cytoskeleton organization. It is interesting to highlight that cDNAs coding for Gelsp' interaction partners presented high identity to transcripts from different *Paracoccidioides* cryptic species, reinforcing the notion that those molecules likely play similar functions in this genus. The phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase Its3 participates in the establishment of cell morphology and cell division because of its localization peripheral to the plasma membrane in *S. pombe* (Vancurova *et al.*, 1999). The protein CpcB, which is involved in the regulation of transduction signal pathways, interacts with Gel2p; it is a beta subunit of a G protein and homolog to Cpc2 of *S. cerevisiae* (Hoffmann *et al.*, 2000), which is related to actin cytoskeleton organization during cell wall synthesis (Won *et al.*, 2001). The Gel2p-interactant partners SamB and Mad2B are also involved in cell wall morphogenesis. SamB participates preferentially in morphogenesis regulation pathways in ascomycetes (Kruger & Fischer, 1998), and its transcript is induced during morphological transition in *Paracoccidioides* (Bastos *et al.*, 2007). The Mad2B protein is involved in cell division control through a

mitotic spindle checkpoint (Li & Benezra, 1996). In addition, septin and tubulin interact with Gel1p. In fungi, septins organize in budding points, which can serve as support to proteins involved in functions related to cell morphogenesis of the cell (Casamayor & Snyder, 2003; Longtine & Bi, 2003; Cao *et al.*, 2009). In this context, Phr1p, a *C. albicans* homolog of Gel1p, localizes to the apical growth sites during the induction of vegetative growth (Ragni *et al.*, 2011). These interactions may further indicate that beta-glucanosyltransferases participate in morphogenetic events in *Paracoccidioides*, as indicated here for Gel2p and previously for Gel3p (Castro *et al.*, 2009).

Other interactions support a possible role of Gel1p in chromatin organization, as suggested for ScGas1p (Koch & Pillus, 2009). This is suggested by the interaction between Gel1p and Qde2 argonaute and the transcription elongation factor Spt6, which were confirmed by coimmunoprecipitation. Qde2 argonaute contributes to gene silencing (Fagard *et al.*, 2000). Spt6 is involved in the control of chromatin structure at the level of histone modifications (Youde *et al.*, 2008). These interactions in addition to the nuclear localization and the effects

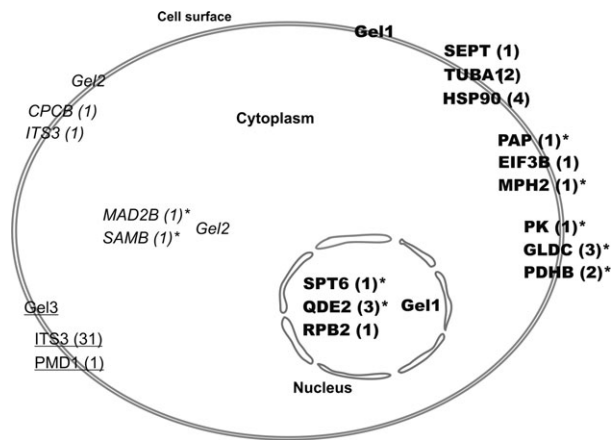


Fig. 5. Schematic drawing of putative localizations of *Paracoccidioides* Gel partner proteins. The localization model involving *Paracoccidioides* Gel proteins and partner proteins was constructed from two-hybrid results based on literature data. Proteins are described by their abbreviated names, which are indicated in Table 2. Interactions with Gel1p, Gel2p, and Gel3p are indicated in bold, italic, and underlined, respectively. Numbers in parentheses indicate the redundancy of partner proteins in the two-hybrid screening, and the asterisk shows partners whose interaction with *Paracoccidioides* Gel proteins was confirmed by coimmunoprecipitation assays. Predicted localizations of *Paracoccidioides* Gel1p partner proteins: SEPT (Longtine & Bi, 2003), TUBA1 (Rodrigues *et al.*, 2008), HSP90 (Cabezon *et al.*, 2009), PAP (Bernard *et al.*, 2002), EIF3B (Albuquerque *et al.*, 2008), MPH2 (Day *et al.*, 2002), PK (Cabezon *et al.*, 2009), GLDC (Albuquerque *et al.*, 2008), PDHB (Rodrigues *et al.*, 2008), SPT6 (Bortvin & Winston, 1996), QDE2 (Martinsen *et al.*, 2005), and RPB2 (Wang *et al.*, 1995). Predicted localizations of *Paracoccidioides* Gel2p partner proteins: CPCB (Valerius *et al.*, 2007), ITS3 (Vancurova *et al.*, 1999), MAD2B (Iouk *et al.*, 2002), and SAMB (Kruger & Fischer, 1998). Predicted localizations of *Paracoccidioides* Gel3p partner proteins: ITS3 (Vancurova *et al.*, 1999) and PMD1 (Nishi *et al.*, 1992).

observed on yeast telomeric silencing strongly support an unexpected role of Gel1p in regulating transcriptional silencing in *Paracoccidioides*.

In conclusion, in this work, the beta-1,3-glucanosyltransferase family of *Paracoccidioides* was characterized. These proteins that are highly conserved in *Paracoccidioides* are members of the GH72 family, and nuclear/cell wall localization of Gel1p was detected as well as cell surface and cytoplasmic localization of Gel2p. Functional and interaction analyses indicate a possible involvement of these proteins in pathways other than those well established at the cell wall.

Acknowledgments

This work at Universidade Federal de Goiás was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvi-

mento Científico e Tecnológico (CNPq, grant number 558405/2008-8), Coordenação de Aperfeiçoamento de Ensino Superior (CAPES), Financiadora de Estudos e Projetos (grants numbers 0106121200 and 0107055200) and Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Goiás (CA 002/2007).

Authors' contribution

P.S.L. and E.F.L.C.B. equally contributed to this study.

References

- Albuquerque PC, Nakayasu ES, Rodrigues ML, Frases S, Casadevall A, Zancope-Oliveira RM, Almeida IC & Nosanchuk JD (2008) Vesicular transport in *Histoplasma capsulatum*: an effective mechanism for trans-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes. *Cell Microbiol* **10**: 1695–1710.
- Amberg DC, Goldstein AL & Cole CN (1992) Isolation and characterization of RAT1: an essential gene of *Saccharomyces cerevisiae* required for the efficient nucleocytoplasmic trafficking of mRNA. *Genes Dev* **6**: 1173–1189.
- Barbosa MS, Bao SN, Andreotti PF, de Faria FP, Felipe MS, Feitosa LS, Mendes-Giannini MJ & Soares CMA (2006) Glyceroldehyde-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* **74**: 382–389.
- Barral P, Suarez C, Batanero E, Alfonso C, Alche Jde D, Rodriguez-Garcia MI, Villalba M, Rivas G & Rodriguez R (2005) An olive pollen protein with allergenic activity, Ole e 10, defines a novel family of carbohydrate-binding modules and is potentially implicated in pollen germination. *Biochem J* **390**: 77–84.
- Bastos KP, Bailao AM, Borges CL, Faria FP, Felipe MS, Silva MG, Martins WS, Fiuza 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.
- Bernard M, Mouyna I, Dubreucq G, Debeaupuis JP, Fontaine T, Vorgias C, Fuglsang C & Latge JP (2002) Characterization of a cell-wall acid phosphatase (PhoAp) in *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology* **148**: 2819–2829.
- Blander G & Guarente L (2004) The Sir2 family of protein deacetylases. *Annu Rev Biochem* **73**: 417–435.
- Borges CL, Parente JA, Barbosa MS, Santana JM, Bao SN, de Sousa MV & Soares CMA (2010) Detection of a homotetrameric structure and protein-protein interactions of *Paracoccidioides brasiliensis* formamidase lead to new functional insights. *FEMS Yeast Res* **10**: 104–113.
- Bortvin A & Winston F (1996) Evidence that Spt6p controls chromatin structure by a direct interaction with histones. *Science* **272**: 1473–1476.

- Bowman SM & Free SJ (2006) The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays* **28**: 799–808.
- Brito WA, Rezende TC, Parente AF, Ricart CA, Sousa MV, Bao SN & Soares CM (2011) Identification, characterization and regulation studies of the aconitase of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Biol* **115**: 697–707.
- Cabezon V, Llama-Palacios A, Nombela C, Monteoliva L & Gil C (2009) Analysis of *Candida albicans* plasma membrane proteome. *Proteomics* **9**: 4770–4786.
- Calderon J, Zavrel M, Ragni E, Fonzi WA, Rupp S & Popolo L (2010) PHR1, a pH-regulated gene of *Candida albicans* encoding a glucan-remodelling enzyme, is required for adhesion and invasion. *Microbiology* **156**: 2484–2494.
- Calzari L, Orlandi I, Alberghina L & Vai M (2006) The histone deubiquitinating enzyme Ubp10 is involved in rDNA locus control in *Saccharomyces cerevisiae* by affecting Sir2p association. *Genetics* **174**: 2249–2254.
- Cao L, Yu W, Wu Y & Yu L (2009) The evolution, complex structures and function of septin proteins. *Cell Mol Life Sci* **66**: 3309–3323.
- Carotti C, Ragni E, Palomares O, Fontaine T, Tedeschi G, Rodriguez R, Latge JP, Vai M & Popolo L (2004) Characterization of recombinant forms of the yeast Gas1 protein and identification of residues essential for glucanosyltransferase activity and folding. *Eur J Biochem* **271**: 3635–3645.
- Carrero LL, Niño-Vega G, Teixeira MM et al. (2008) New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. *Fungal Genet Biol* **45**: 605–612.
- Casamayor A & Snyder M (2003) Molecular dissection of a yeast septin: distinct domains are required for septin interaction, localization, and function. *Mol Cell Biol* **23**: 2762–2777.
- Castillo L, Calvo E, Martinez AI, Ruiz-Herrera J, Valentin E, Lopez JA & Sentandreu R (2008) A study of the *Candida albicans* cell wall proteome. *Proteomics* **8**: 3871–3881.
- Castro NS, Maia ZA, Pereira M & Soares CMA (2005) Screening for glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome. *Genet Mol Res* **4**: 326–345.
- Castro NS, de Castro KP, Orlandi I, Feitosa Ldos S, Rosa e Silva LK, Vainstein MH, Bao SN, Vai M & Soares CMA (2009) Characterization and functional analysis of the beta-1,3-glucanosyltransferase 3 of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *FEMS Yeast Res* **9**: 103–114.
- Cipollina C, Vai M, Porro D & Hatzis C (2007) Towards understanding of the complex structure of growing yeast populations. *J Biotechnol* **128**: 393–402.
- Crabeel M, Abadjieva A, Hilven P, Desimpelaere J & Soetens O (1997) Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* ARG7 gene encoding ornithine acetyltransferase, an enzyme also endowed with acetylglutamate synthase activity. *Eur J Biochem* **250**: 232–241.
- Day RE, Higgins VJ, Rogers PJ & Dawes IW (2002) Characterization of the putative maltose transporters encoded by YDL247w and YJR160c. *Yeast* **19**: 1015–1027.
- Douglas CM (2001) Fungal beta(1,3)-D-glucan synthesis. *Med Mycol* **39**(Suppl 1): 55–66.
- Eckert SE, Heinz WJ, Zakikhany K, Thewes S, Haynes K, Hube B & Muhlschlegel FA (2007) PGA4, a GAS homologue from *Candida albicans*, is up-regulated early in infection processes. *Fungal Genet Biol* **44**: 368–377.
- Fagard M, Boutet S, Morel JB, Bellini C & Vaucheret H (2000) AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. *P Natl Acad Sci USA* **97**: 11650–11654.
- Fonseca CA, Jesuino RS, Felipe MS, Cunha DA, Brito WA & Soares CMA (2001) Two-dimensional electrophoresis and characterization of antigens from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect* **3**: 535–542.
- Fonzi WA (1999) PHR1 and PHR2 of *Candida albicans* encode putative glycosidases required for proper cross-linking of beta-1,3- and beta-1,6-glucans. *J Bacteriol* **181**: 7070–7079.
- Franco M (1987) Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol* **25**: 5–18.
- Garcia R, Bermejo C, Grau C, Perez R, Rodriguez-Pena JM, Francois J, Nombela C & Arroyo J (2004) The global transcriptional response to transient cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signaling pathway. *J Biol Chem* **279**: 15183–15195.
- Gastebois A, Fontaine T, Latge JP & Mouyna I (2010) The beta-(1,3)-glucanosyltransferase Gel4p is essential for *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell* **9**: 1294–1298.
- Hartland RP, Fontaine T, Debeaupuis JP, Simenel C, Delepierre M & Latge JP (1996) A novel beta-(1-3)-glucanosyltransferase from the cell wall of *Aspergillus fumigatus*. *J Biol Chem* **271**: 26843–26849.
- Hill J, Donald KA & Griffiths DE (1991) DMSO-enhanced whole cell yeast transformation. *Nucleic Acids Res* **19**: 5791.
- Hoffmann B, Wanke C, Lapaglia SK & Braus GH (2000) c-Jun and RACK1 homologues regulate a control point for sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **37**: 28–41.
- Iouk T, Kerscher O, Scott RJ, Basrai MA & Wozniak RW (2002) The yeast nuclear pore complex functionally interacts with components of the spindle assembly checkpoint. *J Cell Biol* **159**: 807–819.
- Kanetsuna F, Carbonell LM, Moreno RE & Rodriguez J (1969) Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol* **97**: 1036–1041.
- Kang CM & Jiang YW (2005) Genome-wide survey of non-essential genes required for slowed DNA synthesis-induced filamentous growth in yeast. *Yeast* **22**: 79–90.
- Kapteyn JC, Van Den Ende H & Klis FM (1999) The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochim Biophys Acta* **1426**: 373–383.
- Koch MR & Pillus L (2009) The glucanosyltransferase Gas1 functions in transcriptional silencing. *P Natl Acad Sci USA* **106**: 11224–11229.
- Kruger M & Fischer R (1998) Integrity of a Zn finger-like domain in SamB is crucial for morphogenesis in ascomycetous fungi. *EMBO J* **17**: 204–214.

- Lagorce A, Hauser NC, Labourdette D, Rodriguez C, Martin-Yken H, Arroyo J, Hoheisel JD & Francois J (2003) Genome-wide analysis of the response to cell wall mutations in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **278**: 20345–20357.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP *et al.* (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**: 2947–2948.
- Li Y & Benezra R (1996) Identification of a human mitotic checkpoint gene: hsMAD2. *Science* **274**: 246–248.
- Longtine MS & Bi E (2003) Regulation of septin organization and function in yeast. *Trends Cell Biol* **13**: 403–409.
- Maresca B & Kobayashi GS (2000) Dimorphism in *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces dermatitidis*. *Contrib Microbiol* **5**: 201–216.
- Martienssen RA, Zaratiegui M & Goto DB (2005) RNA interference and heterochromatin in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Trends Genet* **21**: 450–456.
- Matute DR, McEwen JG, Puccia R *et al.* (2006) Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol Biol Evol* **23**: 65–73.
- Mosley AL, Florens L, Wen Z & Washburn MP (2009) A label free quantitative proteomic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* nucleus. *J Proteomics* **72**: 110–120.
- Mouyna I, Fontaine T, Vai M, Monod M, Fonzi WA, Diaquin M, Popolo L, Hartland RP & Latge JP (2000) Glycosylphosphatidylinositol-anchored glucanosyltransferases play an active role in the biosynthesis of the fungal cell wall. *J Biol Chem* **275**: 14882–14889.
- Nishi K, Yoshida M, Nishimura M, Nishikawa M, Nishiyama M, Horinouchi S & Beppu T (1992) A leptomycin B resistance gene of *Schizosaccharomyces pombe* encodes a protein similar to the mammalian P-glycoproteins. *Mol Microbiol* **6**: 761–769.
- Orlandi I, Bettiga M, Alberghina L & Vai M (2004) Transcriptional profiling of ubp10 null mutant reveals altered subtelomeric gene expression and insurgence of oxidative stress response. *J Biol Chem* **279**: 6414–6425.
- Page RD (1996) TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* **12**: 357–358.
- Palomares O, Villalba M & Rodriguez R (2003) The C-terminal segment of the 1,3-beta-glucanase Ole e 9 from olive (*Olea europaea*) pollen is an independent domain with allergenic activity: expression in *Pichia pastoris* and characterization. *Biochem J* **369**: 593–601.
- Popolo L & Vai M (1999) The Gas1 glycoprotein, a putative wall polymer cross-linker. *Biochim Biophys Acta* **1426**: 385–400.
- Popolo L, Vai M, Gatti E, Porello S, Bonfante P, Balestrini R & Alberghina L (1993) Physiological analysis of mutants indicates involvement of the *Saccharomyces cerevisiae* GPI-anchored protein gp115 in morphogenesis and cell separation. *J Bacteriol* **175**: 1879–1885.
- Popolo L, Gilardelli D, Bonfante P & Vai M (1997) Increase in chitin as an essential response to defects in assembly of cell wall polymers in the ggp1delta mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **179**: 463–469.
- Popolo L, Gualtieri T & Ragni E (2001) The yeast cell-wall salvage pathway. *Med Mycol* **39**(Suppl 1): 111–121.
- Ragni E, Coluccio A, Rolli E, Rodriguez-Pena JM, Colasante G, Arroyo J, Neiman AM & Popolo L (2007a) GAS2 and GAS4, a pair of developmentally regulated genes required for spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **6**: 302–316.
- Ragni E, Fontaine T, Gissi C, Latge JP & Popolo L (2007b) The Gas family of proteins of *Saccharomyces cerevisiae*: characterization and evolutionary analysis. *Yeast* **24**: 297–308.
- Ragni E, Calderon J, Fascio U, Sipiczki M, Fonzi WA & Popolo L (2011) Phr1p, a glycosylphosphatidylinositol-anchored $\beta(1,3)$ -glucanosyltransferase critical for hyphal wall formation, localizes to the apical growth sites and septa in *Candida albicans*. *Fungal Genet Biol* **48**: 793–805.
- Ram AF, Kapteyn JC, Montijn RC, Caro LH, Douwes JE, Baginsky W, Mazur P, van den Ende H & Klis FM (1998) Loss of the plasma membrane-bound protein Gas1p in *Saccharomyces cerevisiae* results in the release of beta1,3-glucan into the medium and induces a compensation mechanism to ensure cell wall integrity. *J Bacteriol* **180**: 1418–1424.
- Rodrigues ML, Nakayasu ES, Oliveira DL, Nimrichter L, Nosanchuk JD, Almeida IC & Casadevall A (2008) Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryot Cell* **7**: 58–67.
- Rolli E, Ragni E, Rodriguez-Pena JM, Arroyo J & Popolo L (2010) GAS3, a developmentally regulated gene, encodes a highly mannosylated and inactive protein of the Gas family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **27**: 597–610.
- Sambrook J & Russell D (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3 edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- 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**: 225–242.
- Saporito-Irwin SM, Birse CE, Sypherd PS & Fonzi WA (1995) PHR1, a pH-regulated gene of *Candida albicans*, is required for morphogenesis. *Mol Cell Biol* **15**: 601–613.
- Schneider R, Brors B, Massow M & Weiss H (1997) Mitochondrial fatty acid synthesis: a relic of endosymbiotic origin and a specialized means for respiration. *FEBS Lett* **407**: 249–252.
- Takeuchi M & Yanagida M (1993) A mitotic role for a novel fission yeast protein kinase dsk1 with cell cycle stage dependent phosphorylation and localization. *Mol Biol Cell* **4**: 247–260.
- Teixeira MM, Theodoro RC, de Carvalho MJ, Fernandes L, Paes HC, Hahn RC, Mendoza L, Bagagli E, San-Blas G & Felipe MS (2009) Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol Phylogenet Evol* **2**: 273–283.

- Tomazett PK, Cruz AH, Bonfim SM, Soares CMA & Pereira M (2005) The cell wall of *Paracoccidioides brasiliensis*: insights from its transcriptome. *Genet Mol Res* **4**: 309–325.
- Tseng SS, Weaver PL, Liu Y, Hitomi M, Tartakoff AM & Chang TH (1998) Dbp5p, a cytosolic RNA helicase, is required for poly(A)⁺ RNA export. *EMBO J* **17**: 2651–2662.
- Vai M, Orlandi I, Cavadini P, Alberghina L & Popolo L (1996) *Candida albicans* homologue of GGP1/GAS1 gene is functional in *Saccharomyces cerevisiae* and contains the determinants for glycosylphosphatidylinositol attachment. *Yeast* **12**: 361–368.
- Vai M, Brambilla L, Orlandi I, Rota N, Ranzi BM, Alberghina L & Porro D (2000) Improved secretion of native human insulin-like growth factor 1 from gas1 mutant *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Appl Environ Microbiol* **66**: 5477–5479.
- Valerius O, Kleinschmidt M, Rachfall N, Schulze F, Lopez Marin S, Hoppert M, Streckfuss-Bomeke K, Fischer C & Braus GH (2007) The *Saccharomyces* homolog of mammalian RACK1, Cpc2/Asc1p, is required for FLO11-dependent adhesive growth and dimorphism. *Mol Cell Proteomics* **6**: 1968–1979.
- Vancurova I, Choi JH, Lin H, Kuret J & Vancura A (1999) Regulation of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase from *Schizosaccharomyces pombe* by casein kinase I. *J Biol Chem* **274**: 1147–1155.
- Vanoni M, Vai M, Popolo L & Alberghina L (1983) Structural heterogeneity in populations of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **156**: 1282–1291.
- Wang Z, Buratowski S, Svejstrup JQ, Feaver WJ, Wu X, Kornberg RD, Donahue TF & Friedberg EC (1995) The yeast *TFB1* and *SSL1* genes, which encode subunits of transcription factor IIH, are required for nucleotide excision repair and RNA polymerase II transcription. *Mol Cell Biol* **15**: 2288–2293.
- Won M, Park SK, Hoe KL, Jang YJ, Chung KS, Kim DU, Kim HB & Yoo HS (2001) Rkp1/Cpc2, a fission yeast RACK1 homolog, is involved in actin cytoskeleton organization through protein kinase C, Pck2, signaling. *Biochem Biophys Res Commun* **282**: 10–15.
- Youdell ML, Kizer KO, Kisseleva-Romanova E, Fuchs SM, Duro E, Strahl BD & Mellor J (2008) Roles for Ctk1 and Spt6 in regulating the different methylation states of histone H3 lysine 36. *Mol Cell Biol* **28**: 4915–4926.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Fig. S1. Characterization of the *Paracoccidioides* beta-1,3-glucanosyltransferase family.

Fig. S2. Phylogenetic analysis of proteins belonging to the GH72 family by the Neighbor-Joining method.

Fig. S3. Western blot analysis.

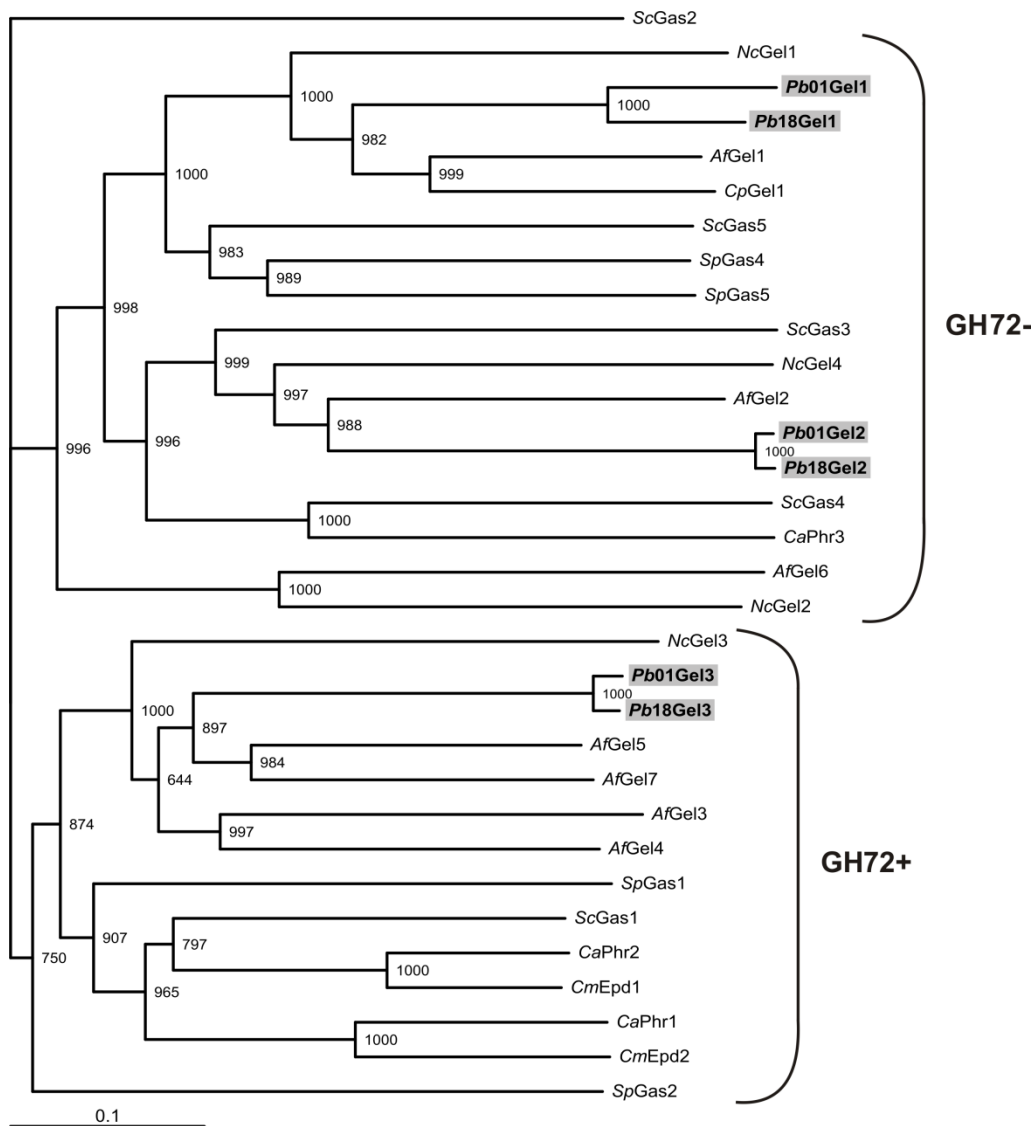
Fig. S4. Localization of Gel1p in *Paracoccidioides*, *Pb18* yeast cells by immunoelectron microscopy.

Fig. S5. Detection of Gel2p in *Paracoccidioides*, *Pb18* yeast cells by immunoelectron microscopy.

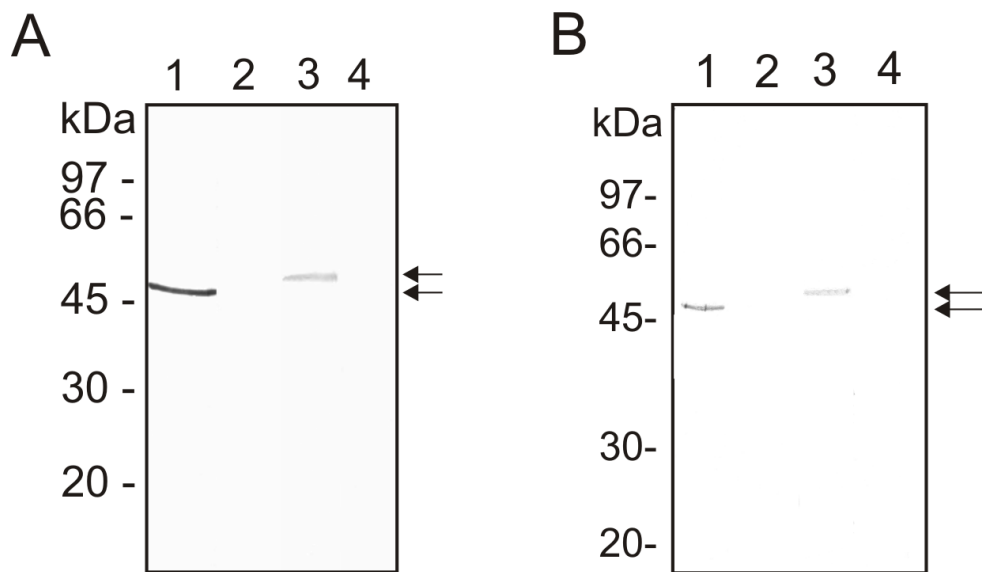
Fig. S6. Detection of Gel1p in *Paracoccidioides* yeast cells and nuclei by immunofluorescence microscopy and western blot analysis.

Please note: Wiley-Blackwell is not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

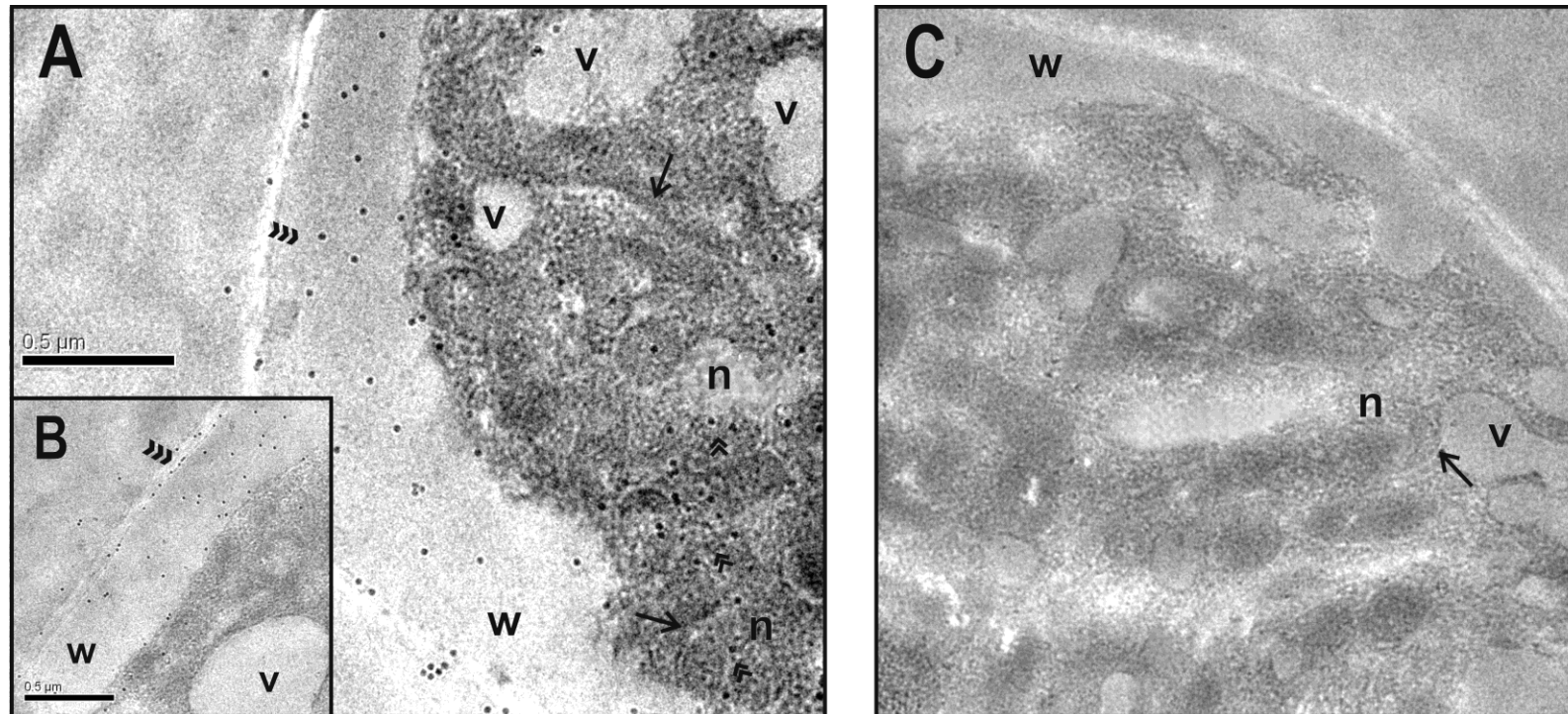
*Figuras
Suplementares*



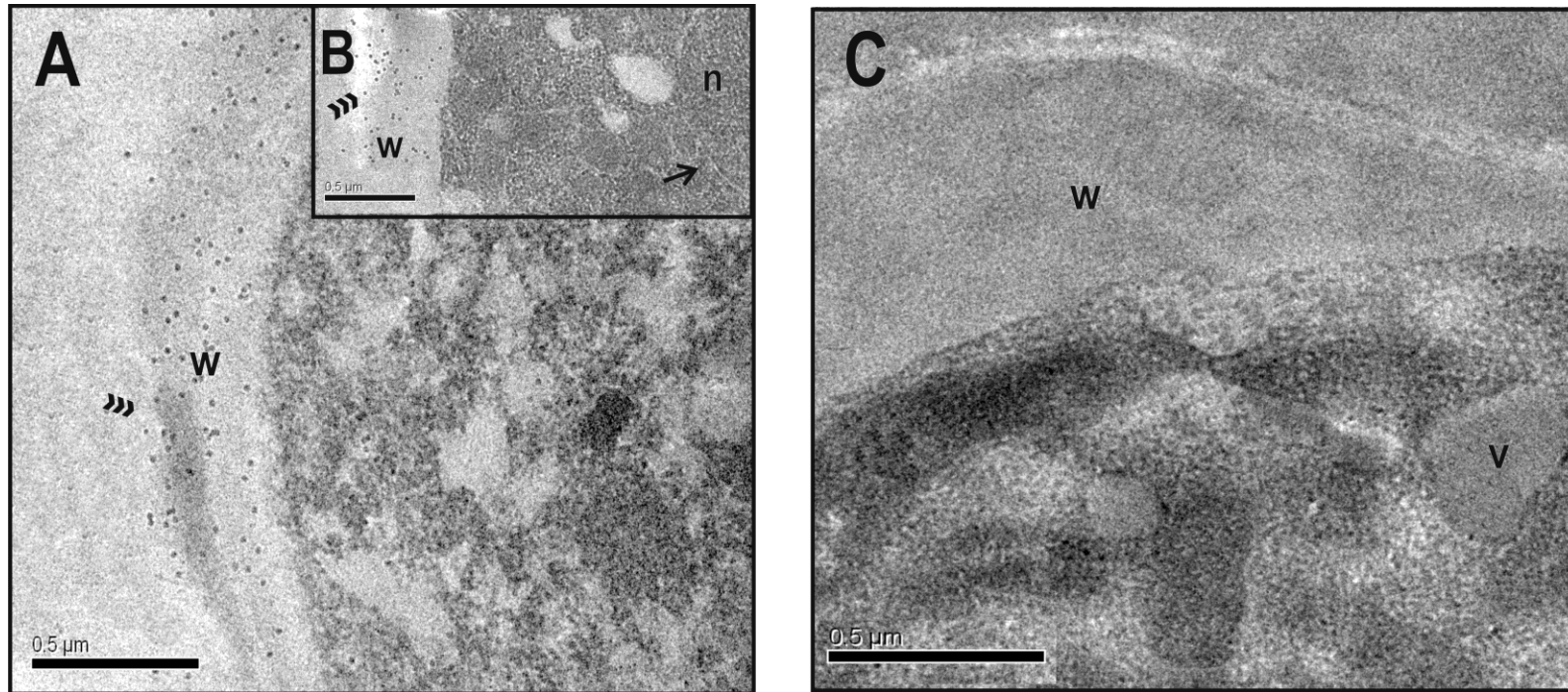
Supp. Fig. 2. Phylogenetic analysis of proteins belonging to the GH72 family by the Neighbor-Joining method. *Paracoccidioides* glucanosyltransferase proteins are indicated by the grey background. The bar marker indicates the genetic distance, which is proportional to the number of amino acid substitutions. The species are abbreviated using a two letter code and the sequences accession numbers (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) are in parentheses as follows: Pb01: *Paracoccidioides*, strain Pb01; (Gel1: XP_002794189; Gel2 XP_002793109 and Gel3 XP_002792932); Pb18 : *Paracoccidioides*, strain Pb18 (Gel1: EEH47188; Gel2: EEH48997 and Gel3: EEH48839) Sc, *Saccharomyces cerevisiae* (Gas1: CAA39809; Gas2: AAB67255; Gas3: AAP63931; Gas4: AAP63932; Gas5: AAP63933); Nc, *Neurospora crassa* (Gel1: CAD21369; Gel2: CAD70378; Gel3: CAD70754; Gel4: CAD21216) ; Af, *Aspergillus fumigatus* (Gel1: AAC35942 ; Gel2: AAF40139; Gel3: AAF40140; Gel4: XP_749664; Gel5: XP_746993; Gel6: XP_754302; Gel7: XP_751119); Cp, *Coccidioides posadasii* (Gel1: AAL09458); Sp, *Schizosaccharomyces pombe* (Gas1: CAC00550; Gas2: NP_596053; Gas4: CAB46773; Gas5: CAB11192); Ca, *Candida albicans* (Phr1: AAA68196; Phr2: AAB80716; Phr3: AAF31451); Cm, *Candida maltosa* (Epd1: BAA21103; Epd2: BAA32730). InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>) was used to discriminate the subfamilies GH72⁺ and GH72⁻.



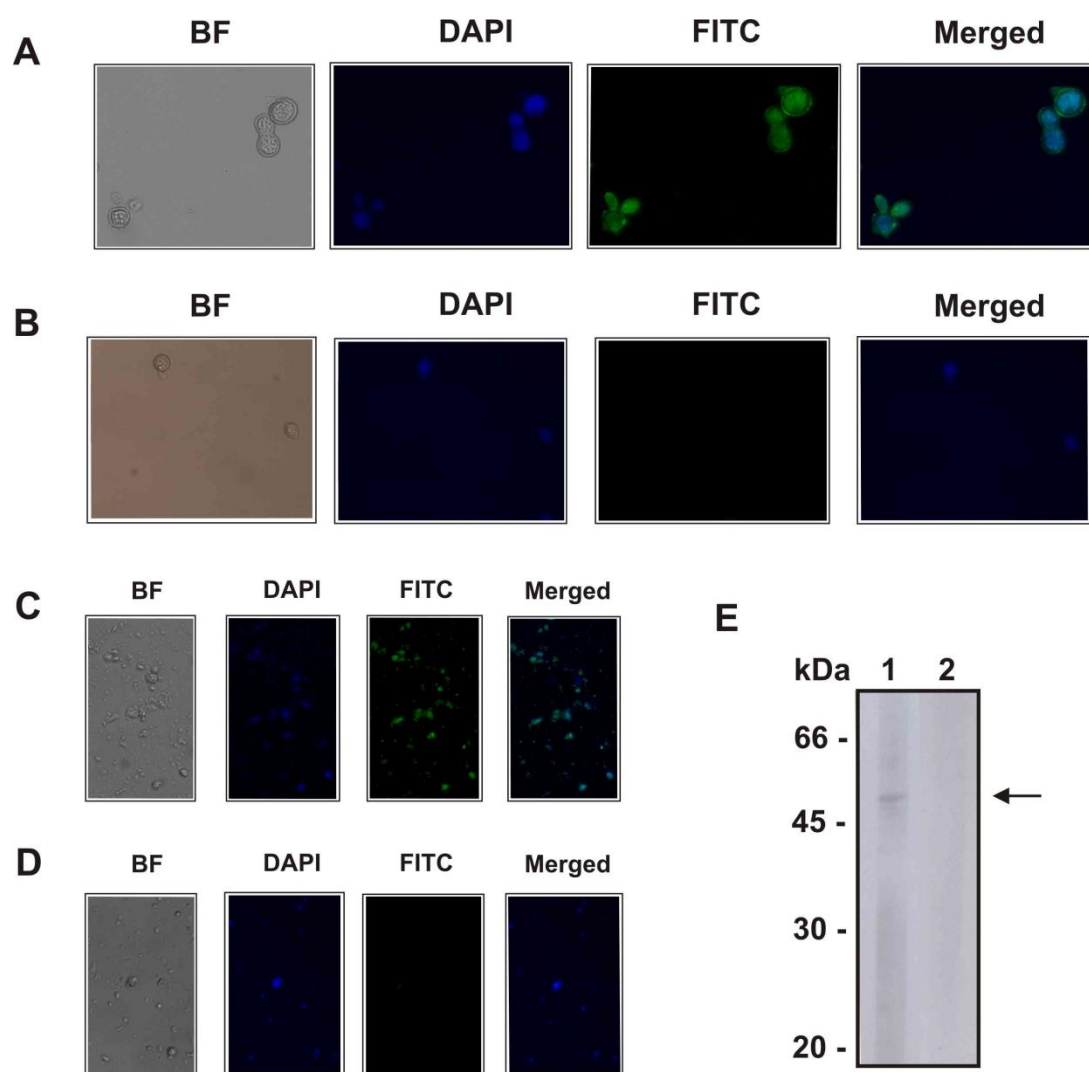
Supp. Fig. 3. Western blot analysis. A total of 20 μ g of protein extracted from *Paracoccidioides* mycelia was fractionated by SDS-PAGE (12%) and transferred to a nitrocellulose membrane. Protein extracts of mycelia, *Pb01* (A) and *Pb18* (B) are shown after reaction with polyclonal antibodies against the proteins: 1- Gel1p; 3- Gel2p. Lanes 2 and 4: reaction to the pre immune serum. The blots were reacted with the rabbit polyclonal antibodies coupled to alkaline phosphatase and developed with 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate/nitrobluetetrazolium (BCIP/NBT).



Supp. Fig. 4. Localization of Gellp in *Paracoccidoides*, *Pb18* yeast cells by immunoelectron microscopy. (A and B) Gold particles are observed at the fungus cell wall (w) (triple arrowheads) and in the nucleus (n) (double arrowheads). The nuclear membranes are indicated by the arrows. (C) Negative controls were exposed to the rabbit preimmune serum in *Pb18* yeast cells. v: vacuole.



Supp. Fig. 5. Detection of Gel2p in *Paracoccidioides*, *Pb18* yeast cells by immunoelectron microscopy. (A and B) Gold particles are observed at the fungus cell wall (w) (triple arrowheads). (C) Negative control was exposed to the rabbit preimmune serum in *Pb18* yeast cells. v: vacuole.



Supp. Fig. 6. Detection of Gellp in *Paracoccidioides* yeast cells and nuclei by immunofluorescence microscopy and western blot analysis. Immunofluorescence analysis showing Gellp of *Paracoccidioides* in yeast cells using anti-Gellp (A) and rabbit pre immune serum as a negative control (B). Immunofluorescence analysis showing Gellp of *Paracoccidioides* in nuclei using anti-PbGellp (C) and rabbit pre immune serum as a negative control (D). Cells and nuclei were incubated with anti-rabbit IgG coupled to fluorescein isothiocyanate (FITC) and with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) to nuclear staining. From left to right: bright field; FITC; DAPI and image overlay. Nuclei protein extracts were fractionated by SDS-PAGE (12%) and transferred to a nitrocellulose membrane (E). Gellp of *Paracoccidioides* was detected after reaction with polyclonal antibody against the protein Gellp (lane-1) and using the pre immune serum as a negative control (lane-2). The blots were developed with using the enhanced chemiluminescence western blotting detection and revealed a single protein specie of 46 kDa (indicated by arrow).



Perspectivas

PERSPECTIVAS

Privação de glicose

- Realizar ensaios de atividade enzimática das proteínas isocitrato liase (Icl) e malato sintase (Mls) em condições controle e privado de glicose;
- Realizar análises *in silico* em *Paracoccidioides* para encontrar homólogos de reguladores transcricionais de privação de glicose e de fontes não-fermentáveis amplamente descritos para *S. cerevisiae*;
- Silenciar a expressão de algum destes alvos de *Paracoccidioides* pela técnica de RNA-antisentido e caracterizar as respostas em meios de cultura privados de glicose ou com outras fontes de carbono.

Hipóxia

- Realizar análise proteômica de *Paracoccidioides* cultivado em condições de normóxia (níveis atmosféricos) e hipóxia (1% de O₂ e 5% CO₂) por cromatografia líquida bi-dimensional acoplada à espectrometria de massas (NanoUPLC-MS^E) nos tempos de 12 e 24 h;
- Confirmar se há expressão diferencial de genes representantes da via do ergosterol em condições de normóxia (níveis atmosféricos) e hipóxia (1% de O₂ e 5% CO₂) por PCR em tempo real;
- Verificar se há expressão diferencial do transcrito e proteína *PbSrbA* em condições privadas ou não do íon ferro por PCR em tempo real e *western blot*;
- Silenciar a expressão da *PbsrbA* pela técnica de RNA-antisentido e caracterizar as respostas dos transformantes em condições de hipóxia ou não;
- Realizar análise proteômica da linhagem selvagem e silenciada para *srbA* de *Paracoccidioides* por cromatografia líquida bi-dimensional acoplada à espectrometria de massas (NanoUPLC-MS^E) na tentativa de listar grupos de proteínas reguladas por este fator de transcrição.



*Considerações
finais*

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A doença causada pelo fungo patogênico humano *Paracoccidioides*, a paracoccidioidomicose (PCM), caracteriza-se como uma enfermidade de alta prevalência e morbidade, endêmica da América Latina, desde o sul do México e América central até a Argentina. A infecção ocorre quando propágulos da forma miceliana do fungo são inalados pelo hospedeiro e, ao atingirem os pulmões, devido principalmente a mudança de temperatura, transitam para a forma parasitária do fungo, a leveduriforme. Neste ambiente, uma das primeiras linhas de defesa do fungo são os macrófagos residentes nos pulmões, considerados pobres em aminoácidos e nutrientes tais como a glicose. Durante a infecção, o fungo também atinge a corrente sanguínea e gânglios linfáticos, onde se dissemina pelo organismo do hospedeiro caracterizando a patogênese como sistêmica. Órgãos tais como fígado, rins e baço podem ser colonizados onde o fungo enfrenta diferentes tensões de oxigênio, menores quando comparadas aos níveis atmosféricos, por exemplo. Neste contexto, a fim de estabelecer a infecção o patógeno enfrenta diferentes estresses a serem vencidos para o sucesso da patogênese. Apesar do tratamento existente, vários fatores ainda interferem na eficiência deste processo o que ainda caracteriza a PCM como uma doença relevante, com alta morbidade e necessidade de estudos que envolvam o patógeno na busca por estratégias co-adjuvantes no tratamento para torná-lo mais eficiente, em menor período de tempo e diminuída reação do hospedeiro, principalmente nas formas mais severa do doença. A PCM, apesar de não ter sido associada à doenças imunossupressoras, tem sido descrita, em elevada porcentagem, em co-infecção com tuberculose (28,4%) e HIV (4,9%) mostrando uma alta taxa de mortes (14,7%) entre a população estudada. Estes aspectos demonstram a severidade da PCM e a possibilidade de co-infecções que interferem no tratamento e prognóstico da doença.

A caracterização das respostas de *Paracoccidioides*, isolado *Pb01*, sob condições de privação de glicose e também dos efeitos da hipóxia nas células deste mesmo organismo se tornam relevantes neste sentido. Estudos da biologia do fungo em condições que simulam as encontradas pelo patógeno durante a infecção podem resultar na elucidação de potenciais fatores de virulência que, em um futuro próximo, contribuirão nas estratégias de erradicação do fungo durante a infecção desde que os mecanismos de adaptação do patógeno no hospedeiro serão cada vez mais conhecidos.

Neste trabalho, as respostas de *Paracoccidioides* às condições de privação de glicose e hipóxia foram estudadas auxiliando de forma significativa no conhecimento da biologia e estratégias de adaptação do fungo nos microambientes do hospedeiro. As respostas do *Pb01* sob condições de privação de glicose foram obtidas a partir de abordagens em larga escala tanto transcricional quanto proteômica mostrando um mapa detalhado das respostas do fungo frente à esta condição. O metabolismo do patógeno foi alterado sendo que as principais mudanças detectadas se concentraram no fluxo de carbono para produção de etanol e gliconeogênese modulando vias tais como a beta-oxidação e ciclos do glioxilato e ácido tricarbóxico na tentativa de adaptação do micro-organismo durante privação nutricional. Além disso, ensaios adicionais tais como dosagem de etanol, peso seco celular e ensaios de interação macrófago-fungo contribuíram ainda mais para o detalhamento das respostas do fungo à condição de privação de glicose.

Outro aspecto tratado de forma ampla neste trabalho foram as respostas hipóxicas de *Paracoccidioides* o que tornaram o estudo ainda mais relevante no contexto da patogênese causada por este micro-organismo. Os resultados mostraram que assim como em outros fungos patogênicos humanos, além da presença de um regulador principal da resposta à condição de hipóxia, a proteína *SrbA*, há mudanças no metabolismo geral das células frente à esta condição. Ensaios de complementação gênica utilizando a linhagem mutante para o gene *srbA* de *A. fumigatus* mostraram que a *PbsrbA* é funcional neste fungo. A susceptibilidade à drogas antifúngicas e o crescimento em meio depletado do íon ferro mostraram que a *PbsrbA* possivelmente está envolvida na regulação de genes da via do ergosterol e homeostase de ferro. Além disso, análises proteômicas em gel bidimensional em condições que simulam hipóxia confirmaram que o fungo realmente responde à esta condição regulando vias metabólicas importantes no processo de adaptação. Contudo, a biologia de *Paracoccidioides* pode ser ainda mais elucidada concernente a aspectos que até o momento não tinham sido estudados de forma tão detalhada e que, com certeza, contribuirão para futuras estratégias de combate ao patógeno.



*Referências
Bibliográficas*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Capítulo 1: Introdução

ALMEIDA, A. J., et al. Cdc42p controls yeast-cell shape and virulence of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Fungal Genet Biol** 46(12):919-926, 2009.

ALMEIDA, F. P. Estudos comparativos do granuloma coccidióidico nos Estados Unidos e no Brasil. Novo gênero para o parasita brasileiro. **Fac. Med. Univ. São Paulo** 5:125–141 1930.

ARNOLD, F., et al. Wound healing: the effect of macrophage and tumour derived angiogenesis factors on skin graft vascularization. **Br J Exp Pathol** 68(4):569-574, 1987.

ASAKURA, M., et al. Multiple contributions of peroxisomal metabolic function to fungal pathogenicity in *Colletotrichum lagenarium*. **Appl Environ Microbiol** 72(9): 6345-6354, 2006.

ASKEW, C., et al. Transcriptional regulation of carbohydrate metabolism in the human pathogen *Candida albicans*. **PLoS Pathog** 5(10):e1000612, 2009.

ASKEW, D. S. *Aspergillus fumigatus*: virulence genes in a street-smart mold. **Curr Opin Microbiol** 11(4): 331-337, 2008.

BAGAGLI, E., et al. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. **Med Mycol** 41(3): 217-223, 2003.

BAGAGLI, E., et al. 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.

BAILAO, A. M., et al. Differential gene expression by *Paracoccidioides brasiliensis* in host interaction conditions: representational difference analysis identifies candidate genes associated with fungal pathogenesis. **Microbes Infect** 8(12-13): 2686-2697, 2006.

BAILAO, A. M., et al. The transcriptional profile of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells is influenced by human plasma. **FEMS Immunol Med Microbiol** 51(1): 43-57, 2007.

BARELLE, C. J., et al. Niche-specific regulation of central metabolic pathways in a fungal pathogen. **Cell Microbiol** 8(6): 961-971, 2006.

BARKER, B. M., et al. Transcriptomic and proteomic analyses of the *Aspergillus fumigatus* hypoxia response using an oxygen-controlled fermenter. **BMC Genomics** 13: 62, 2012.

- BASTOS, K. P., et al. The transcriptome analysis of early morphogenesis in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium reveals novel and induced genes potentially associated to the dimorphic process. **BMC Microbiol** 7: 29, 2007.
- BIEN, C. M.;ESPENSHADE, P. J. Sterol regulatory element binding proteins in fungi: hypoxic transcription factors linked to pathogenesis. **Eukaryot Cell** 9(3): 352-359, 2010.
- BLATZER, M., et al. SREBP coordinates iron and ergosterol homeostasis to mediate triazole drug and hypoxia responses in the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. **PLoS Genet** 7(12): e1002374, 2011.
- BOCCA, A. L., et al. Paracoccidioidomycosis: eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. **Future Microbiol** 8: 1177-1191, 2013.
- BROCK, M. Fungal metabolism in host niches. **Curr Opin Microbiol** 12(4): 371-376, 2009.
- BROWN, A. J., et al. Infection-related gene expression in *Candida albicans*. **Curr Opin Microbiol** 10(4): 307-313, 2007a.
- BROWN, S. M., et al. *Cryptococcus neoformans*, a fungus under stress. **Curr Opin Microbiol** 10(4): 320-325, 2007b.
- BRUMMER, E., et al. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin Microbiol Rev** 6(2): 89-117, 1993.
- BUTLER, G. Hypoxia and gene expression in eukaryotic microbes. **Annu Rev Microbiol** 67: 291-312, 2013.
- CAMARGO, Z. P.;FRANCO, M. F. Current Knowledge on Pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Rev Iberoam Micol** 17: 41-48 2000.
- CARRERO, L. L., et al. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. **Fungal Genet Biol** 45(5): 605-612, 2008.
- CHANG, Y. C., et al. Sre1p, a regulator of oxygen sensing and sterol homeostasis, is required for virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Mol Microbiol** 64(3): 614-629, 2007.
- CHUN, C. D., et al. A link between virulence and homeostatic responses to hypoxia during infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **PLoS Pathog** 3(2): e22, 2007.
- CORREDOR, G. G., et al. The naked-tailed armadillo *Cabassous centralis* (Miller 1899): a new host to *Paracoccidioides brasiliensis*. Molecular identification of the isolate. **Med Mycol** 43(3): 275-280, 2005.
- COSTA, M., et al. Transcriptome profiling of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast-phase cells recovered from infected mice brings new insights into fungal response upon host interaction. **Microbiology** 153(Pt 12): 4194-4207, 2007.

- COUSSENS, P. M. Model for immune responses to *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in cattle. **Infect Immun** 72(6): 3089-3096, 2004.
- CRAMER, T., et al. HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation. **Cell** 112(5): 645-657, 2003.
- DERENGOWSKI, L. S., et al. Upregulation of glyoxylate cycle genes upon *Paracoccidioides brasiliensis* internalization by murine macrophages and in vitro nutritional stress condition. **Med Mycol** 46(2): 125-134, 2008.
- DESJARDINS, C. A., et al. Comparative genomic analysis of human fungal pathogens causing paracoccidioidomycosis. **PLoS Genet** 7(10): e1002345, 2011.
- DEWHIRST, M. W. Concepts of oxygen transport at the microcirculatory level. **Semin Radiat Oncol** 8(3): 143-150, 1998.
- EBEL, F., et al. Analysis of the regulation, expression, and localisation of the isocitrate lyase from *Aspergillus fumigatus*, a potential target for antifungal drug development. **Fungal Genet Biol** 43(7): 476-489, 2006.
- EGI, M., et al. Blood glucose concentration and outcome of critical illness: the impact of diabetes. **Crit Care Med** 36(8): 2249-2255, 2008.
- ELTZSCHIG, H. K.;CARMELIET, P. Hypoxia and inflammation. **N Engl J Med** 364(7): 656-665, 2011.
- ENE, I. V., et al. Host carbon sources modulate cell wall architecture, drug resistance and virulence in a fungal pathogen. **Cell Microbiol** 14(9): 1319-1335, 2012a.
- ENE, I. V., et al. Carbon source-induced reprogramming of the cell wall proteome and secretome modulates the adherence and drug resistance of the fungal pathogen *Candida albicans*. **Proteomics** 12(21): 3164-3179, 2012b.
- ERNST, J. F.;TIELKER, D. Responses to hypoxia in fungal pathogens. **Cell Microbiol** 11(2): 183-190, 2009.
- FAIT, A., et al. GABA shunt deficiencies and accumulation of reactive oxygen intermediates: insight from *Arabidopsis* mutants. **FEBS Lett** 579(2): 415-420, 2005.
- FELIPE, M. S., et al. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. **J Biol Chem** 280(26): 24706-24714, 2005.
- FILLER, S. G.;SHEPPARD, D. C. Fungal invasion of normally non-phagocytic host cells. **PLoS Pathog** 2(12): e129, 2006.
- FRANCO, M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. **J Med Vet Mycol** 25(1): 5-18, 1987.
- GRAHL, N.;CRAMER, R. A., JR. Regulation of hypoxia adaptation: an overlooked virulence attribute of pathogenic fungi? **Med Mycol** 48(1): 1-15, 2010.

- GRAHL, N., et al. Hypoxia and fungal pathogenesis: to air or not to air? **Eukaryot Cell** 11(5): 560-570, 2012.
- GROSE, E.;TAMSITT, J. R. *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from the intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia, S.A. **Sabouraudia** 4(2): 124-125, 1965.
- GROSSKLAUS, D. A., et al. Response to oxidative stress in *Paracoccidioides* yeast cells as determined by proteomic analysis. **Microbes Infect**: 2013.
- GRYSCHKE, R. C., et al. Paradoxical reaction to treatment in 2 patients with severe acute paracoccidioidomycosis: a previously unreported complication and its management with corticosteroids. **Clin Infect Dis** 50(10): e56-58, 2010.
- HALL, L. A.;DENNING, D. W. Oxygen requirements of *Aspergillus* species. **J Med Microbiol** 41(5): 311-315, 1994.
- HAWKSWORTH, D. L. Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. **Studies in Micology**(50): 9–18, 2004.
- HU, G., et al. Metabolic adaptation in *Cryptococcus neoformans* during early murine pulmonary infection. **Mol Microbiol** 69(6): 1456-1475, 2008.
- HUGHES, A. L., et al. SREBP pathway responds to sterols and functions as an oxygen sensor in fission yeast. **Cell** 120(6): 831-842, 2005.
- IDNURM, A.;HOWLETT, B. J. Isocitrate lyase is essential for pathogenicity of the fungus *Leptosphaeria maculans* to canola (*Brassica napus*). **Eukaryot Cell** 1(5): 719-724, 2002.
- JAIN, M.;SZNAJDER, J. I. Effects of hypoxia on the alveolar epithelium. **Proc Am Thorac Soc** 2(3): 202-205, 2005.
- JOHNSTON, M. Feasting, fasting and fermenting. Glucose sensing in yeast and other cells. **Trends Genet** 15(1): 29-33, 1999.
- KANETSUNA, F., et al. Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Bacteriol** 97(3): 1036-1041, 1969.
- LACAZ, C. S. Historical evolution of the knowledge on paracoccidioidomycosis and its etiologic agent, *Paracoccidioides brasiliensis*. . In: **Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, editors. Paracoccidioidomycosis. Boca Raton: CRC Press: 1-11, 1994.**
- LANE, S., et al. The basic helix-loop-helix transcription factor Cph2 regulates hyphal development in *Candida albicans* partly via TEC1. **Mol Cell Biol** 21(19): 6418-6428, 2001.
- LORENZ, M. C.;FINK, G. R. The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. **Nature** 412(6842): 83-86, 2001.

- LORENZ, M. C., et al. Transcriptional response of *Candida albicans* upon internalization by macrophages. **Eukaryot Cell** 3(5): 1076-1087, 2004.
- LOTH, E. A., et al. Occurrence of 102 cases of paracoccidioidomycosis in 18 months in the Itaipu Lake region, Western Parana. **Rev Soc Bras Med Trop** 44(5): 636-637, 2011.
- LUBERTO, C., et al. Identification of App1 as a regulator of phagocytosis and virulence of *Cryptococcus neoformans*. **J Clin Invest** 112(7): 1080-1094, 2003.
- LUTZ, A. Uma mycose pseudococcidica localisada na boca e observada no Brazil. Contribuição ao conhecimento das hyphoblastomycoses americanas. **Brazil-Medico**: 1908.
- MACPHERSON, S., et al. *Candida albicans* zinc cluster protein Upc2p confers resistance to antifungal drugs and is an activator of ergosterol biosynthetic genes. **Antimicrob Agents Chemother** 49(5): 1745-1752, 2005.
- MARQUES-DA-SILVA, S. H., et al. Occurrence of *Paracoccidioides lutzii* in the Amazon region: description of two cases. **Am J Trop Med Hyg** 87(4): 710-714, 2012.
- MARQUES, S. A., et al. [Epidemiologic aspects of paracoccidioidomycosis in the endemic area of Botucatu (Sao Paulo - Brazil)]. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** 25(2): 87-92, 1983.
- MARQUES, S. A. Paracoccidioidomycosis. **Clin Dermatol** 30(6): 610-615, 2012.
- MARQUES, S. A. Paracoccidioidomycosis: epidemiological, clinical, diagnostic and treatment up-dating. **An Bras Dermatol** 88(5): 700-711, 2013.
- MATUTE, D. R., et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Mol Biol Evol** 23(1): 65-73, 2006.
- MULHERN, S. M., et al. *Candida albicans* transcription factor Ace2 regulates metabolism and is required for filamentation in hypoxic conditions. **Eukaryot Cell** 5(12): 2001-2013, 2006.
- NEMECEK, J. C., et al. Global control of dimorphism and virulence in fungi. **Science** 312(5773): 583-588, 2006.
- NIZET, V.;JOHNSON, R. S. Interdependence of hypoxic and innate immune responses. **Nat Rev Immunol** 9(9): 609-617, 2009.
- OTTO, A., et al. Systems-wide temporal proteomic profiling in glucose-starved *Bacillus subtilis*. **Nat Commun** 1: 137, 2010.
- OTZEN, C., et al. Phylogenetic and phenotypic characterisation of the 3-ketoacyl-CoA thiolase gene family from the opportunistic human pathogenic fungus *Candida albicans*. **FEMS Yeast Res** 13(6): 553-564, 2013.

PARENTE, A. F., et al. A proteomic view of the response of *Paracoccidioides* yeast cells to zinc deprivation. **Fungal Biol** 117(6): 399-410, 2013.

PIEKARSKA, K., et al. The activity of the glyoxylate cycle in peroxisomes of *Candida albicans* depends on a functional beta-oxidation pathway: evidence for reduced metabolite transport across the peroxisomal membrane. **Microbiology** 154(Pt 10): 3061-3072, 2008.

PIGOSSO, L. L., et al. Comparative proteomics in the genus *Paracoccidioides*. **Fungal Genet Biol**: In press, 2013.

PINZAN, C. F., et al. Immunological basis for the gender differences in murine *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **PLoS One** 5(5): e10757, 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** 104(3): 513-521, 2009.

PRICE, M. S., et al. *Cryptococcus neoformans* requires a functional glycolytic pathway for disease but not persistence in the host. **MBio** 2(3): e00103-00111, 2011.

RAMIREZ, M. A.;LORENZ, M. C. Mutations in alternative carbon utilization pathways in *Candida albicans* attenuate virulence and confer pleiotropic phenotypes. **Eukaryot Cell** 6(2): 280-290, 2007.

RAPPLEYE, C. A.;GOLDMAN, W. E. Defining virulence genes in the dimorphic fungi. **Annu Rev Microbiol** 60: 281-303, 2006.

RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **Sabouraudia** 23(5): 323-334, 1985.

RESTREPO, A., et al. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Med Mycol** 39(3): 233-241, 2001.

REZENDE, T. C. V., et al. A quantitative view of the morphological phases of *Paracoccidioides brasiliensis* using proteomics. **J Proteomics** 75(2): 572-587, 2011.

RICCI, G., et al. Canine paracoccidioidomycosis. **Med Mycol** 42(4): 379-383, 2004.

RICHINI-PEREIRA, V. B., et al. Molecular approaches for eco-epidemiological studies of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 104(4): 636-643, 2009.

RUDE, T. H., et al. Relationship of the glyoxylate pathway to the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun** 70(10): 5684-5694, 2002.

RUPP, J., et al. *Chlamydia pneumoniae* directly interferes with HIF-1alpha stabilization in human host cells. **Cell Microbiol** 9(9): 2181-2191, 2007.

SALGADO-SALAZAR, C., et al. The human fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* (Onygenales: Ajellomycetaceae) is a complex of two species: phylogenetic evidence from five mitochondrial markers. **Cladistics** 26(6): 613-624, 2010.

SAN-BLAS, G. Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Med Vet Mycol** 31(2): 99-113, 1993.

SAN-BLAS, G., et al. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Med Mycol** 40(3): 225-242, 2002.

SANO, A., et al. [The Research Encouragement Award. Effects of sex hormones on sexual difference of experimental paracoccidioidomycosis]. **Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi** 40(1): 1-8, 1999.

SANTOS, W. A. D., et al. Association between smoking and paracoccidioidomycosis: a case-control study in the State of Espírito Santo, Brazil. **Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro** 19(1): 245-253, 2003.

SETIADI, E. R., et al. Transcriptional response of *Candida albicans* to hypoxia: linkage of oxygen sensing and Efg1p-regulatory networks. **J Mol Biol** 361(3): 399-411, 2006.

SHANKAR, J., et al. Hormones and the Resistance of Women to Paracoccidioidomycosis. **CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS** 24(2): 296-313, 2011.

SHIKANAI-YASUDA, M. A., et al. [Guidelines in paracoccidioidomycosis]. **Rev Soc Bras Med Trop** 39(3): 297-310, 2006.

SHIKANAI-YASUDA, M. A., et al. Neoplasia and paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia** 165(4-5): 303-312, 2008.

SHIMIZU, M., et al. Proteomic analysis of *Aspergillus nidulans* cultured under hypoxic conditions. **Proteomics** 9(1): 7-19, 2009.

SILVA-VERGARA, M. L., et al. Isolation of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibia, State of Minas Gerais, Brazil. **Med Mycol** 36(1): 37-42, 1998.

SILVER, P. M., et al. Role of *Candida albicans* transcription factor Upc2p in drug resistance and sterol metabolism. **Eukaryot Cell** 3(6): 1391-1397, 2004.

SIMMEN, H. P., et al. Analysis of pH, pO₂ and pCO₂ in drainage fluid allows for rapid detection of infectious complications during the follow-up period after abdominal surgery. **Infection** 22(6): 386-389, 1994.

SPLENDORE, A. Zymonematosi con localizzazione nella cavità della bocca, osservata in Brasile. **Bull. Soc. Path. Exotique, T. V.:** 1912.

SYNNOTT, J. M., et al. Regulation of the hypoxic response in *Candida albicans*. **Eukaryot Cell** 9(11): 1734-1746, 2010.

TAVARES, A. H., et al. Early transcriptional response of *Paracoccidioides brasiliensis* upon internalization by murine macrophages. **Microbes Infect** 9(5): 583-590, 2007.

- TEIXEIRA, M. M., et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Mol Phylogenet Evol** 52(2): 273-283, 2009.
- TEIXEIRA, M. M., et al. Molecular and morphological data support the existence of a sexual cycle in species of the genus *Paracoccidioides*. **Eukaryot Cell** 12(3): 380-389, 2013.
- TERÇARIOLI, G. R., et al. Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. **BMC Microbiol** 7: 92, 2007.
- THEODORO, R. C., et al. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. **Med Mycol** 43(8): 725-729, 2005.
- THEODORO, R. C., et al. Genus *Paracoccidioides*: Species recognition and biogeographic aspects. **PLoS One** 7(5): e37694, 2012.
- TODD, B. L., et al. Sterol regulatory element binding protein is a principal regulator of anaerobic gene expression in fission yeast. **Mol Cell Biol** 26(7): 2817-2831, 2006.
- TOVY, A., et al. Glucose starvation boosts *Entamoeba histolytica* virulence. **PLoS Negl Trop Dis** 5(8): e1247, 2011.
- TREJO-CHÁVEZ, A., et al. Disseminated Paracoccidioidomycosis in a Southern Two-Toed Sloth (*Choloepus didactylus*). **Journal of Comparative Pathology** 144(2-3): 231-234, 2011.
- UNTEREINER, W. A., et al. The Ajellomycetaceae, a new family of vertebrate-associated Onygenales. **Mycologia** 96(4): 812-821, 2004.
- VALERA, E. T., et al. Fungal infection by *Paracoccidioides brasiliensis* mimicking bone tumor. **Pediatr Blood Cancer**: 2008.
- VODISCH, M., et al. Analysis of the *Aspergillus fumigatus* proteome reveals metabolic changes and the activation of the pseurotin A biosynthesis gene cluster in response to hypoxia. **J Proteome Res** 10(5): 2508-2524, 2011.
- WANG, Z. Y., et al. The glyoxylate cycle is required for temporal regulation of virulence by the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. **Mol Microbiol** 47(6): 1601-1612, 2003.
- WEST, J. **Respiratory Physiology - The Essentials**. 3 edn. Baltimore, MD, USA: Williams & Wilkins, 1985.
- WILLGER, S. D., et al. A sterol-regulatory element binding protein is required for cell polarity, hypoxia adaptation, azole drug resistance, and virulence in *Aspergillus fumigatus*. **PLoS Pathog** 4(11): e1000200, 2008.
- WILLIAMS, V.;DEL POETA, M. Role of glucose in the expression of *Cryptococcus neoformans* antiphagocytic protein 1, App1. **Eukaryot Cell** 10(3): 293-301, 2011.

ZAVASCKI, A. P., et al. Paracoccidioidomycosis in organ transplant recipient: case report. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** 46(5): 279-281, 2004.

Capítulo 2: Transcritoma e proteoma do fungo *Paracoccidioides* em privação de glicose

ASKEW, C., et al. Transcriptional regulation of carbohydrate metabolism in the human pathogen *Candida albicans*. **PLoS Pathog** 5(10): e1000612, 2009.

BARELLE, C. J., et al. Niche-specific regulation of central metabolic pathways in a fungal pathogen. **Cell Microbiol** 8(6): 961-971, 2006.

BARKER, B. M., et al. Transcriptomic and proteomic analyses of the *Aspergillus fumigatus* hypoxia response using an oxygen-controlled fermenter. **BMC Genomics** 13: 62, 2012.

BOOKOUT, A. L., et al. High-throughput real-time quantitative reverse transcription PCR. **Curr Protoc Mol Biol** Chapter 15: Unit 15 18, 2006.

BRADFORD, M. M. 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, 1976.

BROCK, M. Fungal metabolism in host niches. **Curr Opin Microbiol** 12(4): 371-376, 2009.

BRUMMER, E., et al. Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: killing and restriction of multiplication by activated macrophages. **Infect Immun** 57(8): 2289-2294, 1989.

CARRERO, L. L., et al. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. **Fungal Genet Biol** 45(5): 605-612, 2008.

CLOONAN, N., et al. Stem cell transcriptome profiling via massive-scale mRNA sequencing. **Nat Methods** 5(7): 613-619, 2008.

COONEY, N. M.;KLEIN, B. S. Fungal adaptation to the mammalian host: it is a new world, after all. **Curr Opin Microbiol** 11(6): 511-516, 2008.

COSTA, M., et al. Transcriptome profiling of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast-phase cells recovered from infected mice brings new insights into fungal response upon host interaction. **Microbiology** 153(Pt 12): 4194-4207, 2007.

DERENGOWSKI, L. S., et al. Upregulation of glyoxylate cycle genes upon *Paracoccidioides brasiliensis* internalization by murine macrophages and in vitro nutritional stress condition. **Med Mycol** 46(2): 125-134, 2008.

DESJARDINS, C. A., et al. Comparative genomic analysis of human fungal pathogens causing paracoccidioidomycosis. **PLoS Genet** 7(10): e1002345, 2011.

DEXTER, J. P.;GUNAWARDENA, J. Dimerization and bifunctionality confer robustness to the isocitrate dehydrogenase regulatory system in *Escherichia coli*. **J Biol Chem** 288(8): 5770-5778, 2013.

FAN, W., et al. *Cryptococcus neoformans* gene expression during murine macrophage infection. **Eukaryot Cell** 4(8): 1420-1433, 2005.

FELDMESSER, M., et al. *Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. **Infect Immun** 68(7): 4225-4237, 2000.

FELIPE, M. S., et al. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. **J Biol Chem** 280(26): 24706-24714, 2005.

FLECK, C. B., et al. Nutrient acquisition by pathogenic fungi: nutrient availability, pathway regulation, and differences in substrate utilization. **Int J Med Microbiol** 301(5): 400-407, 2011.

FRADIN, C., et al. Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. **Mol Microbiol** 56(2): 397-415, 2005.

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

GARNAK, M.;REEVES, H. C. Phosphorylation of Isocitrate dehydrogenase of *Escherichia coli*. **Science** 203(4385): 1111-1112, 1979.

GRAHL, N., et al. *In vivo* hypoxia and a fungal alcohol dehydrogenase influence the pathogenesis of invasive pulmonary aspergillosis. **PLoS Pathog** 7(7): e1002145, 2011.

GROSSKLAUS, D. A., et al. Response to oxidative stress in *Paracoccidioides* yeast cells as determined by proteomic analysis. **Microbes Infect**: 2013.

HU, G., et al. Metabolic adaptation in *Cryptococcus neoformans* during early murine pulmonary infection. **Mol Microbiol** 69(6): 1456-1475, 2008.

IBRAHIM-GRANET, O., et al. *In vivo* bioluminescence imaging and histopathologic analysis reveal distinct roles for resident and recruited immune effector cells in defense against invasive aspergillosis. **BMC Microbiol** 10: 105, 2010.

LANGMEAD, B., et al. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. **Genome Biol** 10(3): R25, 2009.

LI, G. Z., et al. Database searching and accounting of multiplexed precursor and product ion spectra from the data independent analysis of simple and complex peptide mixtures. **Proteomics** 9(6): 1696-1719, 2009.

LISTER, R., et al. Highly integrated single-base resolution maps of the epigenome in *Arabidopsis*. **Cell** 133(3): 523-536, 2008.

LO, H. S.;REEVES, R. E. Pyruvate-to-ethanol pathway in *Entamoeba histolytica*. **Biochem J** 171(1): 225-230, 1978.

LORENZ, M. C.;FINK, G. R. The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. **Nature** 412(6842): 83-86, 2001.

LORENZ, M. C., et al. Transcriptional response of *Candida albicans* upon internalization by macrophages. **Eukaryot Cell** 3(5): 1076-1087, 2004.

MATUTE, D. R., et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Mol Biol Evol** 23(1): 65-73, 2006.

MORTAZAVI, A., et al. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. **Nat Methods** 5(7): 621-628, 2008.

MURAD, A. M., et al. Detection and expression analysis of recombinant proteins in plant-derived complex mixtures using nanoUPLC-MS^E. **J Sep Sci** 34(19): 2618-2630, 2011.

MURAD, A. M.;RECH, E. L. NanoUPLC-MS^E proteomic data assessment of soybean seeds using the Uniprot database. **BMC Biotechnol** 12: 82, 2012.

NAGALAKSHMI, U., et al. The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. **Science** 320(5881): 1344-1349, 2008.

OLIVAS, I., et al. Ability to grow on lipids accounts for the fully virulent phenotype in neutropenic mice of *Aspergillus fumigatus* null mutants in the key glyoxylate cycle enzymes. **Fungal Genet Biol** 45(1): 45-60, 2008.

OTTO, A., et al. Systems-wide temporal proteomic profiling in glucose-starved *Bacillus subtilis*. **Nat Commun** 1: 137, 2010.

OTZEN, C., et al. Phylogenetic and phenotypic characterisation of the 3-ketoacyl-CoA thiolase gene family from the opportunistic human pathogenic fungus *Candida albicans*. **FEMS Yeast Res** 13(6): 553-564, 2013.

PARENTE, A. F., et al. Proteomic analysis reveals that iron availability alters the metabolic status of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **PLoS One** 6(7): e22810, 2011.

PIEKARSKA, K., et al. The activity of the glyoxylate cycle in peroxisomes of *Candida albicans* depends on a functional beta-oxidation pathway: evidence for reduced metabolite transport across the peroxisomal membrane. **Microbiology** 154(Pt 10): 3061-3072, 2008.

PIGOSSO, L. L., et al. Comparative proteomics in the genus *Paracoccidioides*. **Fungal Genet Biol**: In press, 2013.

POIRIER, Y., et al. Peroxisomal beta-oxidation-a metabolic pathway with multiple functions. **Biochim Biophys Acta** 1763(12): 1413-1426, 2006.

PRICE, M. S., et al. *Cryptococcus neoformans* requires a functional glycolytic pathway for disease but not persistence in the host. **MBio** 2(3): e00103-00111, 2011.

RAMIREZ, M. A.;LORENZ, M. C. Mutations in alternative carbon utilization pathways in *Candida albicans* attenuate virulence and confer pleiotropic phenotypes. **Eukaryot Cell** 6(2): 280-290, 2007.

RESTREPO, A.;JIMENEZ, B. E. Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase in a chemically defined culture medium. **J Clin Microbiol** 12(2): 279-281, 1980.

RESTREPO, A.;TOBON, A. *Paracoccidioides brasiliensis*. Philadelphia: 2005. 3062-3068.

REZENDE, T. C. V., et al. A quantitative view of the morphological phases of *Paracoccidioides brasiliensis* using proteomics. **J Proteomics** 75(2): 572-587, 2011.

RUDE, T. H., et al. Relationship of the glyoxylate pathway to the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun** 70(10): 5684-5694, 2002.

SAN-BLAS, G., et al. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Med Mycol** 40(3): 225-242, 2002.

SCHOBEL, F., et al. *Aspergillus fumigatus* does not require fatty acid metabolism via isocitrate lyase for development of invasive aspergillosis. **Infect Immun** 75(3): 1237-1244, 2007.

SILVA, S. S., et al. Transcriptional response of murine macrophages upon infection with opsonized *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells. **Microbes Infect** 10(1): 12-20, 2008.

TAVARES, A. H., et al. Early transcriptional response of *Paracoccidioides brasiliensis* upon internalization by murine macrophages. **Microbes Infect** 9(5): 583-590, 2007.

TEIXEIRA, M. M., et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Mol Phylogenet Evol** 52(2): 273-283, 2009.

TEUTSCHBEIN, J., et al. Proteome profiling and functional classification of intracellular proteins from conidia of the human-pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. **J Proteome Res** 9(7): 3427-3442, 2010.

TOVY, A., et al. Glucose starvation boosts *Entamoeba histolytica* virulence. **PLoS Negl Trop Dis** 5(8): e1247, 2011.

TRAVIS, S. M., et al. Activity of abundant antimicrobials of the human airway. **Am J Respir Cell Mol Biol** 20(5): 872-879, 1999.

WANG, L., et al. DEGseq: an R package for identifying differentially expressed genes from RNA-seq data. **Bioinformatics** 26(1): 136-138, 2009a.

WANG, Z., et al. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nat Rev Genet** 10(1): 57-63, 2009b.

WEBER, S. S., et al. Analysis of the secretomes of *Paracoccidioides* mycelia and yeast cells. **PLoS One** 7(12): e52470, 2012.

WILLIAMS, V.;DEL POETA, M. Role of glucose in the expression of *Cryptococcus neoformans* antiphagocytic protein 1, App1. **Eukaryot Cell** 10(3): 293-301, 2011.

YOUSEFF, B. H., et al. Extracellular superoxide dismutase protects *Histoplasma* yeast cells from host-derived oxidative stress. **PLoS Pathog** 8(5): e1002713, 2012.

Capítulo 3: Caracterização das respostas de *Paracoccidioides* em condições de hipóxia

ABRAMOVA, N., et al. Reciprocal regulation of anaerobic and aerobic cell wall mannoprotein gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Bacteriol** 183(9): 2881-2887, 2001.

ADAMS, C. M., et al. Cholesterol and 25-hydroxycholesterol inhibit activation of SREBPs by different mechanisms, both involving SCAP and Insigs. **J Biol Chem** 279(50): 52772-52780, 2004.

ALMEIDA, A. J., et al. Cdc42p controls yeast-cell shape and virulence of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Fungal Genet Biol** 46(12): 919-926, 2009a.

ALMEIDA, R. S., et al. *Candida albicans* iron acquisition within the host. **FEMS Yeast Res** 9(7): 1000-1012, 2009b.

ARQUIER, N., et al. Analysis of the hypoxia-sensing pathway in *Drosophila melanogaster*. **Biochem J** 393(Pt 2): 471-480, 2006.

ASKEW, C., et al. Transcriptional regulation of carbohydrate metabolism in the human pathogen *Candida albicans*. **PLoS Pathog** 5(10): e1000612, 2009.

BARKER, B. M., et al. Transcriptomic and proteomic analyses of the *Aspergillus fumigatus* hypoxia response using an oxygen-controlled fermenter. **BMC Genomics** 13: 62, 2012.

BECERRA, M., et al. The yeast transcriptome in aerobic and hypoxic conditions: effects of *hap1*, *rox1*, *rox3* and *srb10* deletions. **Mol Microbiol** 43(3): 545-555, 2002.

BENCHIMOL, M., et al. A double membrane surrounds the hydrogenosomes of the anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*. **FEMS Microbiol Lett** 154(2): 277-282, 1997.

BIEN, C. M., et al. *Cryptococcus neoformans* Site-2 protease is required for virulence and survival in the presence of azole drugs. **Mol Microbiol** 74(3): 672-690, 2009.

BIEN, C. M.;ESPENSHADE, P. J. Sterol regulatory element binding proteins in fungi: hypoxic transcription factors linked to pathogenesis. **Eukaryot Cell** 9(3): 352-359, 2010.

BLATZER, M., et al. SREBP coordinates iron and ergosterol homeostasis to mediate triazole drug and hypoxia responses in the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. **PLoS Genet** 7(12): e1002374, 2011.

BONACCORSI, E. D., et al. Transcriptional response of the obligatory aerobic *Trichoderma reesei* to hypoxia and transient anoxia: implications for energy production and survival in the absence of oxygen. **Biochemistry** 45(12): 3912-3924, 2006.

BOOKOUT, A. L., et al. High-throughput real-time quantitative reverse transcription PCR. **Curr Protoc Mol Biol** Chapter 15: Unit 15 18, 2006.

BRADFORD, M. M. 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, 1976.

BROCK, M., et al. Bioluminescent *Aspergillus fumigatus*, a new tool for drug efficiency testing and *in vivo* monitoring of invasive aspergillosis. **Appl Environ Microbiol** 74(22): 7023-7035, 2008.

BURG, J. S., et al. Insig regulates HMG-CoA reductase by controlling enzyme phosphorylation in fission yeast. **Cell Metab** 8(6): 522-531, 2008.

BUTLER, G. Hypoxia and gene expression in eukaryotic microbes. **Annu Rev Microbiol** 67: 291-312, 2013.

CAMILO, C. M.;GOMES, S. L. Transcriptional response to hypoxia in the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*. **Eukaryot Cell** 9(6): 915-925, 2010.

CASTELLO, P. R., et al. Mitochondrial cytochrome oxidase produces nitric oxide under hypoxic conditions: implications for oxygen sensing and hypoxic signaling in eukaryotes. **Cell Metab** 3(4): 277-287, 2006.

CHANG, Y. C., et al. Sre1p, a regulator of oxygen sensing and sterol homeostasis, is required for virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Mol Microbiol** 64(3): 614-629, 2007.

CHANG, Y. C., et al. Conservation of the sterol regulatory element-binding protein pathway and its pathobiological importance in *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryot Cell** 8(11): 1770-1779, 2009.

CHUN, C. D., et al. A link between virulence and homeostatic responses to hypoxia during infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **PLoS Pathog** 3(2): e22, 2007.

COHEN, B. D., et al. Induction and repression of DAN1 and the family of anaerobic mannoprotein genes in *Saccharomyces cerevisiae* occurs through a complex array of regulatory sites. **Nucleic Acids Res** 29(3): 799-808, 2001.

COONEY, N. M.;KLEIN, B. S. Fungal adaptation to the mammalian host: it is a new world, after all. **Curr Opin Microbiol** 11(6): 511-516, 2008.

CRAMER, R. A.;LAWRENCE, C. B. Cloning of a gene encoding an Alt a 1 isoallergen differentially expressed by the necrotrophic fungus *Alternaria brassicicola* during *Arabidopsis* infection. **Appl Environ Microbiol** 69(4): 2361-2364, 2003.

DAT, J. F., et al. Sensing and signalling during plant flooding. **Plant Physiol Biochem** 42(4): 273-282, 2004.

DAVIES, B. S.;RINE, J. A role for sterol levels in oxygen sensing in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics** 174(1): 191-201, 2006.

- DUNCAN, E. A., et al. Cleavage site for sterol-regulated protease localized to a leu-Ser bond in the luminal loop of sterol regulatory element-binding protein-2. **J Biol Chem** 272(19): 12778-12785, 1997.
- DUNCAN, E. A., et al. Second-site cleavage in sterol regulatory element-binding protein occurs at transmembrane junction as determined by cysteine panning. **J Biol Chem** 273(28): 17801-17809, 1998.
- EPSTEIN, A. C., et al. *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. **Cell** 107(1): 43-54, 2001.
- ERNST, J. F.;TIELKER, D. Responses to hypoxia in fungal pathogens. **Cell Microbiol** 11(2): 183-190, 2009.
- ESPENSHADE, P. J.;HUGHES, A. L. Regulation of sterol synthesis in eukaryotes. **Annu Rev Genet** 41: 401-427, 2007.
- FAVA NETTO, C., et al. Antígeno polissacarídeo do *Paracoccidioides brasiliensis*. Estudo do tempo de cultura do *P. brasiliensis* necessário ao preparo do antígeno. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** 11: 177-181, 1969.
- FENG, X., et al. HacA-independent functions of the ER stress sensor IreA synergize with the canonical UPR to influence virulence traits in *Aspergillus fumigatus*. **PLoS Pathog** 7(10): e1002330, 2011.
- FLURY, I., et al. INSIG: a broadly conserved transmembrane chaperone for sterol-sensing domain proteins. **Embo J** 24(22): 3917-3926, 2005.
- FONSECA, C. A., et al. Two-dimensional electrophoresis and characterization of antigens from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes Infect** 3(7): 535-542, 2001.
- GAUTHIER, G. M., et al. SREB, a GATA transcription factor that directs disparate fates in *Blastomyces dermatitidis* including morphogenesis and siderophore biosynthesis. **PLoS Pathog** 6(4): e1000846, 2010.
- GORG, A., et al. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics** 4(12): 3665-3685, 2004.
- GRAHL, N.;CRAMER, R. A., JR. Regulation of hypoxia adaptation: an overlooked virulence attribute of pathogenic fungi? **Med Mycol** 48(1): 1-15, 2010.
- GRAHL, N., et al. *In vivo* hypoxia and a fungal alcohol dehydrogenase influence the pathogenesis of invasive pulmonary aspergillosis. **PLoS Pathog** 7(7): e1002145, 2011.
- GRAHL, N., et al. *Aspergillus fumigatus* mitochondrial electron transport chain mediates oxidative stress homeostasis, hypoxia responses and fungal pathogenesis. **Mol Microbiol** 84(2): 383-399, 2012a.
- GRAHL, N., et al. Hypoxia and fungal pathogenesis: to air or not to air? **Eukaryot Cell** 11(5): 560-570, 2012b.

- GREER, S. N., et al. The updated biology of hypoxia-inducible factor. **Embo J** 31(11): 2448-2460, 2012.
- GUIDA, A., et al. Using RNA-seq to determine the transcriptional landscape and the hypoxic response of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. **BMC Genomics** 12: 628, 2011.
- GUILLEMIN, K.;KRASNOW, M. A. The hypoxic response: huffing and HIFing. **Cell** 89(1): 9-12, 1997.
- GUZY, R. D., et al. Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and gene transcription in yeast. **Antioxid Redox Signal** 9(9): 1317-1328, 2007.
- HAN, Y. H., et al. Comparative proteomic analysis of hypoxia-treated and untreated human leukemic U937 cells. **Proteomics** 6(11): 3262-3274, 2006.
- HEDGES, S. B., et al. A molecular timescale of eukaryote evolution and the rise of complex multicellular life. **BMC Evol Biol** 4: 2, 2004.
- HERBERT, B., et al. Reduction and alkylation of proteins in preparation of two-dimensional map analysis: why, when, and how? **Electrophoresis** 22(10): 2046-2057, 2001.
- HOOT, S. J., et al. *Candida albicans* UPC2 is transcriptionally induced in response to antifungal drugs and anaerobicity through Upc2p-dependent and -independent mechanisms. **Microbiology** 154(Pt 9): 2748-2756, 2008.
- HORTON, J. D., et al. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. **J Clin Invest** 109(9): 1125-1131, 2002.
- HUGHES, A. L., et al. SREBP pathway responds to sterols and functions as an oxygen sensor in fission yeast. **Cell** 120(6): 831-842, 2005.
- HUGHES, B. T.;ESPENSHADE, P. J. Oxygen-regulated degradation of fission yeast SREBP by Ofd1, a prolyl hydroxylase family member. **Embo J** 27(10): 1491-1501, 2008.
- IBRAHIM-GRANET, O., et al. In vivo bioluminescence imaging and histopathologic analysis reveal distinct roles for resident and recruited immune effector cells in defense against invasive aspergillosis. **BMC Microbiol** 10: 105, 2010.
- INGAVALE, S. S., et al. Importance of mitochondria in survival of *Cryptococcus neoformans* under low oxygen conditions and tolerance to cobalt chloride. **PLoS Pathog** 4(9): e1000155, 2008.
- JUNG, W. H.;KRONSTAD, J. W. Iron and fungal pathogenesis: a case study with *Cryptococcus neoformans*. **Cell Microbiol** 10(2): 277-284, 2008.
- KIM, J. B., et al. Dual DNA binding specificity of ADD1/SREBP1 controlled by a single amino acid in the basic helix-loop-helix domain. **Mol Cell Biol** 15(5): 2582-2588, 1995.

- KLENGEL, T., et al. Fungal adenylyl cyclase integrates CO₂ sensing with cAMP signaling and virulence. **Curr Biol** 15(22): 2021-2026, 2005.
- KWAST, K. E., et al. Oxygen sensing and the transcriptional regulation of oxygen-responsive genes in yeast. **J Exp Biol** 201(Pt 8): 1177-1195, 1998.
- KWAST, K. E., et al. Genomic analyses of anaerobically induced genes in *Saccharomyces cerevisiae*: functional roles of Rox1 and other factors in mediating the anoxic response. **J Bacteriol** 184(1): 250-265, 2002.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227(5259): 680-685, 1970.
- LANE, S., et al. The basic helix-loop-helix transcription factor Cph2 regulates hyphal development in *Candida albicans* partly via TEC1. **Mol Cell Biol** 21(19): 6418-6428, 2001.
- LEE, C. Y., et al. Regulation of the Sre1 hypoxic transcription factor by oxygen-dependent control of DNA binding. **Mol Cell** 44(2): 225-234, 2011.
- LEE, H., et al. Cobalt chloride, a hypoxia-mimicking agent, targets sterol synthesis in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Mol Microbiol** 65(4): 1018-1033, 2007.
- LEE, M. C., et al. Bi-directional protein transport between the ER and Golgi. **Annu Rev Cell Dev Biol** 20: 87-123, 2004.
- LOENARZ, C., et al. The hypoxia-inducible transcription factor pathway regulates oxygen sensing in the simplest animal, *Trichoplax adhaerens*. **EMBO Rep** 12(1): 63-70, 2011.
- LORENZ, M. C.;HEITMAN, J. Regulators of pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae* identified through multicopy suppressor analysis in ammonium permease mutant strains. **Genetics** 150(4): 1443-1457, 1998.
- MACEK, I., et al. Local adaptation to soil hypoxia determines the structure of an arbuscular mycorrhizal fungal community in roots from natural CO(2) springs. **Appl Environ Microbiol** 77(14): 4770-4777, 2011.
- MACPHERSON, S., et al. *Candida albicans* zinc cluster protein Upc2p confers resistance to antifungal drugs and is an activator of ergosterol biosynthetic genes. **Antimicrob Agents Chemother** 49(5): 1745-1752, 2005.
- MANSFIELD, K. D., et al. Mitochondrial dysfunction resulting from loss of cytochrome c impairs cellular oxygen sensing and hypoxic HIF- α activation. **Cell Metab** 1(6): 393-399, 2005.
- OSBORNE, T. F.;ESPENSHADE, P. J. Evolutionary conservation and adaptation in the mechanism that regulates SREBP action: what a long, strange tRIP it's been. **Genes Dev** 23(22): 2578-2591, 2009.

- OSHEROV, N.;MAY, G. S. Optimization of protein extraction from *Aspergillus nidulans* for gel electrophoresis. **Fungal Genetics Newsletter** 45: 38-40, 1998.
- PEREIRA, M., et al. Cloning, mechanistic and functional analysis of a fungal sterol C24-methyltransferase implicated in brassicasterol biosynthesis. **Biochim Biophys Acta** 1801(10): 1163-1174, 2010.
- PEYSSONAU, C.;JOHNSON, R. S. An unexpected role for hypoxic response: oxygenation and inflammation. **Cell Cycle** 3(2): 168-171, 2004.
- POYTON, R. O., et al. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. **Trends Endocrinol Metab** 20(7): 332-340, 2009a.
- POYTON, R. O., et al. Mitochondria and hypoxic signaling: a new view. **Ann N Y Acad Sci** 1177: 48-56, 2009b.
- RABILLOUD, T., et al. Use of polybuffer as carrier ampholytes in mixed-bed Immobiline gels for isoelectric focusing. **J Biochem Biophys Methods** 16(2-3): 237-241, 1988.
- RAYMOND, J.;SEGRE, D. The effect of oxygen on biochemical networks and the evolution of complex life. **Science** 311(5768): 1764-1767, 2006.
- RESTREPO, A.;JIMENEZ, B. E. Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase in a chemically defined culture medium. **J Clin Microbiol** 12(2): 279-281, 1980.
- SEIDAH, N. G., et al. The family of subtilisin/kexin like pro-protein and pro-hormone convertases: divergent or shared functions. **Biochimie** 76(3-4): 197-209, 1994.
- SEMENZA, G. L. Life with oxygen. **Science** 318(5847): 62-64, 2007.
- SETIADI, E. R., et al. Transcriptional response of *Candida albicans* to hypoxia: linkage of oxygen sensing and Efg1p-regulatory networks. **J Mol Biol** 361(3): 399-411, 2006.
- SEVER, N., et al. Accelerated degradation of HMG CoA reductase mediated by binding of insig-1 to its sterol-sensing domain. **Mol Cell** 11(1): 25-33, 2003.
- SHEPARDSON, K. M., et al. Hypoxia enhances innate immune activation to *Aspergillus fumigatus* through cell wall modulation. **Microbes Infect** 15(4): 259-269, 2012.
- SHEPARDSON, K. M.;CRAMER, R. A. Fungal cell wall dynamics and infection site microenvironments: signal integration and infection outcome. **Curr Opin Microbiol** 16(4): 385-390, 2013.
- SHIMIZU, K.;KELLER, N. P. Genetic involvement of a cAMP-dependent protein kinase in a G protein signaling pathway regulating morphological and chemical transitions in *Aspergillus nidulans*. **Genetics** 157(2): 591-600, 2001.
- SOSINSKA, G. J., et al. Hypoxic conditions and iron restriction affect the cell-wall proteome of *Candida albicans* grown under vagina-simulative conditions. **Microbiology** 154(Pt 2): 510-520, 2008.

- STEWART, E. V., et al. Yeast SREBP cleavage activation requires the Golgi Dsc E3 ligase complex. **Mol Cell** 42(2): 160-171, 2011.
- STEWART, E. V., et al. Yeast sterol regulatory element-binding protein (SREBP) cleavage requires Cdc48 and Dsc5, a ubiquitin regulatory X domain-containing subunit of the Golgi Dsc E3 ligase. **J Biol Chem** 287(1): 672-681, 2012.
- SUMMONS, R. E., et al. Steroids, triterpenoids and molecular oxygen. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci** 361(1470): 951-968, 2006.
- SYNNOTT, J. M., et al. Regulation of the hypoxic response in *Candida albicans*. **Eukaryot Cell** 9(11): 1734-1746, 2010.
- TAYLOR, C. T. Mitochondria and cellular oxygen sensing in the HIF pathway. **Biochem J** 409(1): 19-26, 2008.
- TAYLOR, C. T.;MCELWAIN, J. C. Ancient atmospheres and the evolution of oxygen sensing via the hypoxia-inducible factor in metazoans. **Physiology (Bethesda)** 25(5): 272-279, 2010.
- TERÇARIOLI, G. R., et al. Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. **BMC Microbiol** 7: 92, 2007.
- TODD, B. L., et al. Sterol regulatory element binding protein is a principal regulator of anaerobic gene expression in fission yeast. **Mol Cell Biol** 26(7): 2817-2831, 2006.
- TRINCI, A. P. J., et al. Anaerobic fungi in herbivorous animals. **Mycological Research** 98(2): 129-152, 1994.
- VIK, A.;RINE, J. Upc2p and Ecm22p, dual regulators of sterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Cell Biol** 21(19): 6395-6405, 2001.
- VODISCH, M., et al. Analysis of the *Aspergillus fumigatus* proteome reveals metabolic changes and the activation of the pseurotin A biosynthesis gene cluster in response to hypoxia. **J Proteome Res** 10(5): 2508-2524, 2011.
- ZAREMBER, K.A.; MALECH, H.L. HIF-1alpha: a master regulator of innate host defenses? **J Clin Invest** 115(7): 1702-1704, 2005.
- WANG, W., et al. Effect of oxygen concentration on the composting process and maturity. **Compost Sci. Util.** 15: 184-190, 2007.
- WEBSTER, K. A. Evolution of the coordinate regulation of glycolytic enzyme genes by hypoxia. **J Exp Biol** 206(Pt 17): 2911-2922, 2003.
- WILLGER, S. D., et al. A sterol-regulatory element binding protein is required for cell polarity, hypoxia adaptation, azole drug resistance, and virulence in *Aspergillus fumigatus*. **PLoS Pathog** 4(11): e1000200, 2008.

WILLGER, S. D., et al. Dsc orthologs are required for hypoxia adaptation, triazole drug responses, and fungal virulence in *Aspergillus fumigatus*. **Eukaryot Cell** 11(12): 1557-1567, 2012.

YEH, T. L., et al. The hypoxic regulator of sterol synthesis Nro1 is a nuclear import adaptor. **Structure** 19(4): 503-514, 2011.

YU, J. H., et al. Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. **Fungal Genet Biol** 41(11): 973-981, 2004.