



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

Perfil proteômico de leveduras de *Paracoccidioides* após estresse oxidativo

**Candidata: Daciene de Arruda Grossklaus
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Célia Maria de Almeida Soares**

**Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Patologia
Molecular como requisito para
obtenção do grau de Doutor em
Patologia Molecular**

**Brasília-DF
Dezembro-2012**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade de
Brasília. Acervo 1004614

G878p Grossklaus, Daciene de Arruda.
Perfil proteômico de leveduras de Paracoccidioides após estresse oxidativo / Daciene de Arruda Grossklaus. --. 2012.
xii, 109 p. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) - Universidade de Brasília, Faculdade de Medicina, Pós-Graduação em Patologia Molecular, 2012.

Inclui bibliografia.
Orientação: Célia Maria de Almeida Soares

1. Fungos - Doenças. 2. Micologia - Leveduras - Metabolismo. 3. Microbiologia médica - Patologia molecular. I. Soares, Célia Maria de Almeida. II. Título.

CDU 616.992

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

Apoio Financeiro: CNPq/CAPES/ FAPEG/FUNAPE

BANCA EXAMINADORA

TITULARES:

Profa. Dra. Célia Maria de Almeida Soares

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás

Prof. Dr. Luciano Paulino da Silva

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Núcleo Temático de Biotecnologia, Laboratório de Espectrometria de Massa

Prof. Dr. Wagner Fontes

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília

Prof. Dr. Jaime Martins de Santana

Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília

Prof. Dr. Bergmann Morais Ribeiro

Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília

SUPLENTE

Prof. Dr. Sinji Borges Ferreira Tauhata

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás

*“...Nunca pensaremos todos da
mesma maneira, nunca veremos, senão,
uma parte da verdade e ainda sob
diferentes ângulos...”*

Mahatma Gandhi

Este trabalho é dedicado
exclusivamente à minha orientadora,
Célia Maria de Almeida Soares...
a responsável por fornecer habilmente
todos os meios para que minhas mãos
pudessem desenvolver este trabalho...

Sou eternamente grata...

Grata por ter recebido a vida, um dom de Deus, O qual nos proporciona infinitas bênçãos... como a de ter pais tão amorosos e tão dedicados a instruir-me nos verdadeiros caminhos da vida... benção de ter me concedido o prazer de encontrar um amor verdadeiro.... Juscelino... meu cúmplice e meu companheiro...

Por todos os dias de minha vida serei grata à este bom Deus por presentear-me com amigos que tornam a minha vida mais alegre... que me ajudam a transformar momentos difíceis em momentos mais suaves... por estes e por tantos outros motivos... venho expressar meus sinceros agradecimentos:

Aos meus grandes amigos Patrícia Zambuzzi, Tereza Cristina, Kelly e Ronney quero agradecer especialmente pelos 4 anos de convívio que nos proporcionaram uma verdadeira amizade... jamais poderei esquecer-me de cada sorriso e de cada experiência trocada...

À Sheyla, Leandro, Dayane, Regilda, Luciane e Fabiana... minha surpreendente descoberta... amigos de toda e qualquer hora... e, por falar em hora... muitas horas de almoço e de café... ah...como foram felizes estes momentos com vocês: Nathalie, Mariana, Sara, Sabrina, Rodrigo, Patrícia Lima, Luciana, Elisa, Amanda, Priscila, Hellen, Symone, Karine, Renata, Patrícia Kott, Rogério, Neto, Lucas Oliveira, Edilânia, Simone Weber...

À Mirelle, Laurine, Ana Flávia, Luciene, Laura, Wesley, Luiz Augusto, Luiz Paulo, André, Gabriel, LeLeandro, Hanna, Daniela, Marielle, Lívia, Felipe, Lucas Nojosa, Alessandro e Paulo Henrique e a todos os colegas que integraram ou participaram do LBM durante o período de 2008-2012: Raquel, Marta, Joice, Naiche, Adriano, Nadia, Keyla, Robson, Ademar, João Guilherme, Erika, Camila, Arthur, Raul, Alex, Ana, Pryscila, Ana Lídia, Amanda....

Sou grata também por ter tido a oportunidade de desenvolver este trabalho no Laboratório de biologia molecular-UFG que é coordenado com grande competência e eficiência pela profa. Dra. Célia Maria de Almeida Soares, minha orientadora.

Agradeço também ao jovem prof. Dr. Alexandre Bailão... pelo suporte científico e pela dedicação ao LBM, característica pertinente também aos outros professores: Maristela, Silvia, Juliana e Clayton que sempre estão dispostos para nos ajudar.

Aos professores e aos colegas de disciplinas do programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina-UnB, os quais contribuíram com minha formação...

Aos funcionários da Secretaria da Pós – Graduação em Patologia Molecular Jaqueline, Alessandro e Daniela pela eficiência e atenção.

Aos meus familiares e amigos que, mesmo distante, estão sempre ao meu lado...

À todos, muito obrigada!

SUMÁRIO

	Página
Resumo	XII
Abstract	XIII
1. Introdução	14
1.1. O fungo <i>Paracoccidioides</i>	14
1.1.1. Aspectos morfológicos.....	15
1.1.2. Habitat.....	15
1.1.3. Dimorfismo.....	16
1.2. Paracoccidioidomicose - PCM	17
1.2.1. Aspectos Epidemiológicos.....	17
1.2.2. Patogenia.....	17
1.3. Estresse oxidativo	18
1.3.1. Aspectos gerais.....	18
1.3.2. Espécies reativas de oxigênio – EROs.....	19
1.3.2.1. Fontes de EROs nos sistemas biológicos.....	20
1.3.2.2. Peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	21
1.3.3. Antioxidantes.....	22
1.3.3.1. Catalases.....	23
1.3.3.2. Superóxido dismutases.....	23
1.3.3.3. Peroxidases e sistema thioredoxina.....	23
1.3.4. Resposta adaptativa ao estresse oxidativo.....	24
1.3.4.1. Resposta adaptativa de <i>Paracoccidioides</i> ao estresse oxidativo.....	25
1.3.5. O emprego de análises proteômicas no estudo do estresse oxidativo.....	27
2. Justificativas	31
3. Objetivo	32
4. Manuscrito	33
5. Discussão	85
5.1. Indução ao estresse por H₂O₂	85
5.2. Identificação das proteínas responsivas ao estresse por H₂O₂	85
5.2.1. Defesa e virulência	86
5.2.2. Energia e metabolismo.....	90
5.2.3. Transcrição, síntese protéica e ciclo celular/processamento de DNA.....	93
5.3. Oxidoreduções	94
6. Conclusões	95
7. Perspectivas	96
8. Referências Bibliográficas	97

ABREVIATURAS E SIGLAS

2D-DIGE - Eletroforese de fluorescência diferencial em gel bidimensional

2DE - eletroforese bidimensional

ACN - acetonitrila

AHP1 - proteína da família AhpC/TSA peroxiredoxina

AhpC -componente C de alquil hidroperóxido redutase

A. nidulans - *Aspergillus nidulans*

ATP - adenosina trifosfato

BCIP - 5-bromo-4-chloro-3-indolil fosfato

BSA - soro albumina bovina

Ccp1- gene codificante para citocromo C peroxidase 1

cDNA - DNA complementar

Cl⁻ - radical clorídrico

Cu⁺ - íon cobre reduzido

Cu⁺² - íon cobre oxidado

DNA - ácido desoxirribonucléico

DTT - di-tiotreitol

EBP – proteína que se liga ao estradiol

EDTA - ácido etileno-diamino-tetra acético

ENO – enolase

EROs – Espécies reativas de oxigênio

Fe⁺² - íon ferro reduzido

Fe⁺³ - íon ferro oxidado

GAPDH - gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GST - glutathiona S-transferase

HAD - proteína dehalogenase haloacida

HClO - ácido hipocloroso

HSP - proteína de choque térmico

H₂O – água

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

IgG - imunoglobulina G
kDa - kilodalton
LC-MS/MS – cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa sequencial
M - molar
mA - miliampére
MALDI-Q-TOF - fonte tipo MALDI com dois analisadores híbridos tipo quadrupolo e tempo de voo (TOF)
mg - miligrama
mL - mililitros
mm - milímetros
mM - milimolar
MM - massa molecular
Mn-SOD - superóxido dismutase dependente de manganês
MS - espectrometria de massa
MS/MS - espectrometria de massa sequencial
mRNA - RNA mensageiro
m/z - razão massa-carga
NAD - nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado
NADH - nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NADP - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidado
NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NBT - nitro blue tatrazólio
NO[•] - óxido nítrico
O₂ - oxigênio molecular
O₂⁻ - ânion superóxido
¹O₂ - oxigênio singlete
OH[•] - radical hidroxila
ONOO⁻ - radical peroxinitrito
PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida
Pb18 – isolado 18 de *Paracoccidioides brasiliensis*
Pb01 – isolado 01 de *Paracoccidioides brasiliensis*

PbCatA - catalase A de *Paracoccidioides brasiliensis*

PbCatP - catalase peroxissomal de *Paracoccidioides brasiliensis*

PbCatC - catalase C de *Paracoccidioides brasiliensis*

PbHAD32 – proteína homóloga a dehalogenase haloacida de *Paracoccidioides*

PBS - solução de tampão fosfato

PCM - paracoccidioidomicose

PCR - reação em cadeia da polimerase

pH - potencial hidrogeniônico

pI - ponto isoelétrico

PS2 – espécie filogenética 2

PS3 – espécie filogenética 3

RNA - ácido ribonucleico

RT-qPCR – PCR acoplado a transcrição reversa quantitativa

S1 – espécie 1

SDS - dodecil sulfato de sódio

TPI - triose - fosfato isomerase

RESUMO

O fungo dimórfico *Paracoccidioides* é o agente etiológico da paracoccidioidomicose, uma doença adquirida pela inalação de conídios ou fragmentos de micélio que transitam para a fase patogênica, leveduriforme, nos pulmões do hospedeiro. Após a infecção, a sobrevivência do fungo depende da evasão do sistema imune e adaptação ao ambiente hostil do hospedeiro. Macrófagos alveolares são a primeira linha de defesa contra *Paracoccidioides* e para conter a infecção essas células produzem várias substâncias nocivas como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que desencadeia o estresse oxidativo. Para investigar os efeitos que H_2O_2 causa no proteoma de *Paracoccidioides*, foi utilizada a técnica de eletroforese em gel bidimensional (2-DE) para analisar as proteínas diferencialmente expressas durante a resposta inicial (2 h) e tardia (6 h) ao H_2O_2 . A análise 2-DE revelou um total de 179 proteínas/spots diferencialmente expressos (116 spots com expressão aumentada e 63 com expressão diminuída). As proteínas/spots diferencialmente expressas foram submetidas à identificação por meio da espectrometria de massas e submissão da massa monoisotópica dos peptídeos ao banco de dados do NCBI. Todos os spots/proteínas foram identificados com sucesso e agrupados de acordo com a categoria funcional - FunCat2. Resgate, defesa e virulência celular, metabolismo e energia foram as categorias com as maiores frequências de proteínas/isoformas. Várias enzimas antioxidantes, como catalase, superóxido dismutase, peroxidases e tioredoxinas foram identificadas, bem como outras oxidoredutases que estão provavelmente envolvidas na resposta contra o estresse oxidativo. O perfil metabólico foi caracterizado, verificando-se ativação da via das pentoses fosfato, uma importante fonte geradora de NADPH celular. No intuito de confirmar os dados proteômicos, ensaios confirmatórios de atividade enzimática, citometria de fluxo e análises dos níveis transcricionais e de NADPH foram realizados e se mostraram concordantes com os dados obtidos na análise proteômica. Os resultados sugerem que *Paracoccidioides* possui um amplo repertório antioxidante, composto por diferentes proteínas que atuam de maneira complementar, que foram capazes de detoxificar as EROs e de minimizar os efeitos causados pelo estresse oxidativo.

ABSTRACT

The dimorphic fungus *Paracoccidioides* is the etiologic agent of paracoccidioidomycosis, a disease acquired by inhalation of infective airborne conidia or mycelia fragments that transit to the pathogenic yeast phase in the host lungs. Upon infection, fungal survival depends on evasion from the immune system and adaptation to the host environment. Alveolar macrophages are the first defense cells line against *Paracoccidioides* and aiming to restrict the fungal infection, macrophages produce several harmful substances, such as hydrogen peroxide (H_2O_2) that triggers oxidative stress. To investigate the effect of H_2O_2 on the proteome of *Paracoccidioides*, we used a large scale 2-DE protein gel electrophoresis approach to analyze differentially expressed proteins that were detected in early (2 h) and in late (6 h) H_2O_2 -treatments. The 2-DE analysis revealed a total 179 spots differentially expressed (116 proteins spots with increased expression and 63 with decreased expression). Differentially expressed proteins were subjected to identification by mass spectrometry and by submitting the monoisotopic mass of the peptides to the NCBI non redundant database. All spots were successfully identified and they were grouped according the functional category - FunCat2. Cell rescue, defense and virulence, metabolism and energy were the categories that showed the most number of occurrences of the proteins/isoforms. Several antioxidant enzymes, such as catalase, superoxide dismutase, peroxidases and thioredoxins were identified, as well as others oxidoreductases putatively involved with defense against oxidative stress. A view of the metabolic cell profile depicted an activation of the pentose phosphate pathway, a great source of cellular reducing power in the form of NADPH. Confirmatory assays of enzymatic activity, flow cytometry, transcript levels and NADPH measurements, produced data in agreement with proteomic analysis. The results indicated that *Paracoccidioides* has several antioxidant systems, including various proteins that complementarily were able to detoxified ROS and minimized the damage triggered by oxidative stress.

1- INTRODUÇÃO

Micoses sistêmicas humanas são causadas por uma pequena variedade de fungos, entre eles, os dimórficos representam os principais agentes etiológicos desse tipo de infecções fúngicas (San-Blas & Nino-Vega, 2004). O fungo *Paracoccidioides* é um exemplo desta classe fúngica, apresentando o termodimorfismo e sendo o agente etiológico da micose humana sistêmica granulomatosa conhecida como paracoccidioidomicose (PCM).

1.1 – O fungo *Paracoccidioides*

O agente etiológico da PCM foi originalmente descrito por Adolpho Lutz em 1908, no Instituto Biológico de São Paulo (Brasil), quando o isolou em lesões orais e de linfonodo cervical. Observando exames histológicos, Adolpho Lutz identificou que a ausência de esférulas com esporos diferenciava o fungo causador da PCM de outros espécimes característicos de coccidioidomicose, descritos previamente por Posadas na Argentina em 1892 (Posadas, 1892).

Inicialmente, este fungo foi denominado *Zymonema brasiliensis* por Splendore em 1912, porém em 1930, Floriano de Almeida propôs o nome *Paracoccidioides brasiliensis* quando o distinguiu do agente *Coccidioides immitis*. A doença foi reconhecida oficialmente como paracoccidioidomicose pela Organização Mundial de Saúde em 1971 (Lacaz, 1994; Palmeiro *et al.*, 2005).

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

que foram agrupados em um quarto grupo filogenético, o qual foi denominado “Pb01-like”. Estes autores também sugeriram uma nova especiação filogenética para este grupo e propuseram a nomenclatura de *Paracoccidioides lutzii*, em homenagem a Adolfo Lutz (Teixeira *et al.*, 2009).

1.1.1. Aspectos morfológicos

O fungo termodimórfico *Paracoccidioides* pode se desenvolver como levedura ou sob a forma de micélio. A primeira forma ocorre nos tecidos infectados ou quando o fungo é cultivado *in vitro* a 36 °C; as colônias leveduriformes apresentam os seguintes aspectos macroscópicos: coloração creme, aspecto cerebriforme e não aderente ao meio; evidente crescimento após sete dias de incubação a 37 °C (Carbonell & Rodriguez, 1965; Martinez, 2004). As leveduras de *Paracoccidioides* são esféricas ou ovais, exibem paredes bem definidas, bi-refringentes, que podem apresentar brotamento multipolar característico (forma de roda de leme). O citoplasma contém escasso retículo endoplasmático, gotas de lipídios proeminentes, ribossomos e mitocôndrias, as quais são reduzidas com a idade celular e pela vacuolização citoplasmática (Brummer *et al.*, 1993; Martinez, 2004).

A forma de micélio é observada ao se cultivar o fungo sob temperaturas inferiores a 28 °C ou em condições saprobióticas. Macroscopicamente, as colônias de micélio possuem coloração branca com micélios aéreos, irregulares e curtos; ao microscópio se observam hifas septadas, delgadas e hialinas, com raros clamidósporos terminais ou intercalares (Lacaz, 1994; Lacaz *et al.*, 2002; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006). Sob condições de estresse ou falta de nutrientes, o micélio pode transformar-se em conídios (Restrepo, 1988).

1.1.2. Habitat

Na natureza, *Paracoccidioides* é encontrado na forma de micélio e algumas características relacionadas ao ecossistema favorecem a sua adaptação ao habitat, porém seu nicho ecológico ainda não está completamente esclarecido (Marques *et al.*, 1983; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006). As regiões consideradas endêmicas deste fungo apresentam características ambientais em comum (Mangiaterra *et al.*, 1999). Foi observado que o índice de exposição ao fungo é maior em locais que possuem altitude elevada, chuvas abundantes, vegetação rica e economia baseada principalmente na agricultura e pecuária (Blotta *et al.*, 1999). Adicionalmente foi relatado que condições diferentes de solos alteram a capacidade de

crescimento e a produção de conídios por *Paracoccidioides*, influenciando a sua capacidade de sobrevivência (Theodoro *et al.*, 2005).

Em áreas endêmicas, foi identificada a presença de *Paracoccidioides* em animais selvagens como tatus, porco-espinhos, preguiças entre outros; bem como em animais domésticos, como cães, gatos e ovelhas. Estas observações sugerem que estes animais possam ser o reservatório natural do fungo (Bagagli *et al.*, 2003; Richini-Pereira *et al.*, 2008; Gonzalez *et al.*, 2010; de Farias *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2012).

1.1.3. – Dimorfismo

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

A temperatura é um dos estímulos mais notórios durante o dimorfismo, sendo observada a forma de micélio a 22 °C - 28 °C e de levedura a 35 °C - 37 °C (San-Blas *et al.*, 2002). O hormônio 17- β -estradiol é também um importante fator relacionado ao dimorfismo de *Paracoccidioides* e confere às mulheres a proteção contra a PCM. Estudos prévios mostraram que este hormônio inibe a transição de micélio para levedura de maneira dose-dependente, *in vitro* (Restrepo, 1985) e *in vivo* (Sano *et al.*, 1999). Foi recentemente descoberto que a inibição da transição não é devida somente à presença do hormônio, mas sim, à sua interação com a proteína fúngica denominada EBP (*Estradiol Binding Protein*). Acredita-se que o hormônio feminino 17- β -estradiol e a EBP do citoplasma fúngico se ligam e, como resultado desta interação, ocorre o bloqueio da transição da fase infectiva para a fase patogênica de *Paracoccidioides* (Shankar *et al.*, 2011). Adicionalmente, a proteção de PCM também é relacionada ao tipo de resposta imunológica desencadeada por cada gênero sexual. Ao comparar a resposta imunológica de camundongos machos e fêmeas, infectados com células de *Paracoccidioides* foi possível verificar uma notável influência sobre o estabelecimento da PCM experimental sendo este fato atribuído, pelo menos em parte, aos hormônios sexuais que interferem na resposta imune desencadeada por estes animais. Foi verificado também que a paracoccidioidina, um antígeno fúngico, ativa mais as células imunes inatas de fêmeas fazendo com que estas sejam mais resistentes à infecção por *Paracoccidioides* (Pinzan *et al.*, 2010). Desta maneira, os resultados observados confirmam que as mulheres são mais resistentes à

PCM porque elas possuem o hormônio 17- β -estradiol e porque elas possivelmente apresentam uma resposta imunológica mais eficaz contra *Paracoccidioides*, motivo pelo qual o acometimento da PCM é predominante em indivíduos do sexo masculino.

1.2 – Paracoccidioidomicose - PCM

1.2.1. - Aspectos Epidemiológicos

A distribuição geográfica da PCM apresenta-se restrita a países da América Latina com maior prevalência no Brasil, Argentina, Colômbia e Venezuela. A micose foi diagnosticada em países da Europa, nos Estados Unidos da América e Ásia onde os pacientes acometidos provinham de áreas endêmicas (Joseph *et al.*, 1966; Kamei *et al.*, 2003; Buitrago *et al.*, 2011).

Por não ser uma doença de notificação compulsória, os dados sobre a real prevalência e incidência da PCM ainda são pouco precisos. Os cálculos são baseados em relatos e estima-se que aproximadamente 80% de todos os casos diagnosticados ocorram no Brasil, com maior prevalência nas regiões Sul e Sudeste. O país é considerado o maior centro endêmico e acredita-se que aproximadamente 200 mortes por ano são decorrentes da PCM (Coutinho *et al.*, 2002).

O manejo do solo para plantações em áreas rurais é considerado o fator ocupacional predisponente para a aquisição da PCM, assim os trabalhadores rurais do sexo masculino com idades entre 30 e 60 anos são os indivíduos mais acometidos pela doença (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

1.2.2. - Patogenia

A inalação de propágulos infectantes da fase miceliana do fungo é considerada a principal via de contágio da doença. Assim, após penetrar em via área superior, estes propágulos chegam aos alvéolos pulmonares, onde, sob o estímulo da temperatura se transformam em leveduras, iniciando o processo infeccioso pela formação do complexo primário pulmonar (Giraldo *et al.*, 1976; McEwen *et al.*, 1987; Franco *et al.*, 1998). O processo infeccioso pode regredir ou progredir para a doença na dependência da resposta do hospedeiro e da virulência do fungo (Franco *et al.*, 1987).

A doença pode ser classificada em PCM subclínica e clínica. Esta classificação foi estabelecida em Medellín (1986) e atualmente é a classificação mais utilizada (Franco *et al.*, 1987). A PCM subclínica é a denominação referente ao período em que a doença se encontra silenciosa, sem sinais ou sintomas aparentes. Apesar disso, o hospedeiro pode desenvolver

uma resposta imunológica específica contra o fungo que levaria à regressão do foco infeccioso com formação de cicatrizes estéreis, ou à regressão do foco infeccioso, porém com foco quiescente (presença de fungos viáveis). Pode ainda ocorrer à progressão do foco infeccioso, levando ao aparecimento de sinais e sintomas da doença (Lacaz *et al.*, 2002; Martinez, 2004).

PCM clínica é caracterizada pelo surgimento de sinais e sintomas e pode ser subdividida nas formas aguda e crônica. A forma aguda ou subaguda, tipo juvenil, acomete principalmente crianças e adolescentes, correspondendo 3 a 5% dos casos da doença. A partir de uma lesão primária, ocorre a rápida progressão por disseminação linfática e hematogênica ao sistema mononuclear fagocitário (baço, fígado, linfonodos e medula óssea) causando disfunções nos órgãos acometidos. Os sintomas iniciais são de infecção respiratória, porém, no curso da doença, pode-se observar a presença de linfadenomegalia, manifestações digestivas, hepatoesplenomegalia, envolvimento ósteo-articular e lesões cutâneas (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006). A forma crônica, ou tipo adulto, responde por mais de 90% dos casos e os pacientes acometidos são adultos com idade entre 30 e 60 anos e, predominantemente, do sexo masculino. Na forma crônica a doença progride lentamente para acometimento pulmonar com sintomas de infecção respiratória inespecífica. As manifestações podem ser subdivididas em unifocal ou multifocal de acordo com o número de órgãos ou sistemas acometidos. Casos disseminados, geralmente, são resultantes da reativação de lesão quiescente por via hematogênica (Lacaz *et al.*, 2002; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

1.3 – Estresse oxidativo

1.3.1. – Aspectos gerais

Organismos aeróbios foram evolutivamente adaptados a viver em um ambiente com alta tensão de oxigênio e a utilizar este elemento químico como aceptor de elétrons em uma série de reações oxidativas celulares, por exemplo, durante a respiração e durante os processos de β -oxidação de ácidos graxos (Mates *et al.*, 2008). Em comparação com a fermentação, a fosforilação oxidativa foi vantajosa para os organismos aeróbios, uma vez estes puderam obter mais energia; no entanto, durante a fosforilação oxidativa nem todo o oxigênio consumido é completamente reduzido à água. Quando isto ocorre, observa-se o escape de elétrons da cadeia respiratória que reagem com outras moléculas gerando as espécies reativas de oxigênio (EROs) (Winyard *et al.*, 2005; Grivennikova & Vinogradov, 2006; Halliwell, 2007). O desequilíbrio entre a produção e remoção de EROs, decorrentes do aumento dessas espécies

ou da redução dos antioxidantes endógenos, causa o estresse oxidativo (Halliwell, 2006b; Lushchak, 2010).

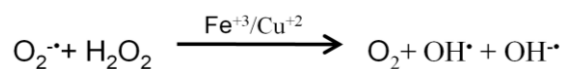
1.3.2. –Espécies reativas de oxigênio – EROs

EROs são moléculas intermediárias, ou subprodutos, do processo de redução do oxigênio em diferentes estados de excitação e/ou redução. Estas moléculas podem estar associadas ao hidrogênio, nitrogênio, cloro ou carbono e normalmente apresentam alta toxicidade devido à possibilidade de reagir com outros radicais livres ou macromoléculas na célula (Gutteridge & Halliwell, 1989; Halliwell, 2006b; Stowe & Camara, 2009). Algumas EROs também são consideradas radicais livres por possuir um átomo ou grupo de átomos com elétrons não emparelhados em sua camada de valência, fazendo com que apresentem uma forte propensão para reagir com outras moléculas, por meio da doação ou recebimento de elétron(s); desta forma estes tornam-se mais estáveis eletronicamente. São exemplos de radicais livres o radical hidroxila (OH^\bullet), ânion superóxido (O_2^-) e óxido nítrico (NO^\bullet). Radicais livres exibem uma alta reatividade e uma alta instabilidade eletrônica que é evidenciada pela rápida meia vida destes compostos (Droge, 2002; Jones, 2008; Halliwell, 2011).

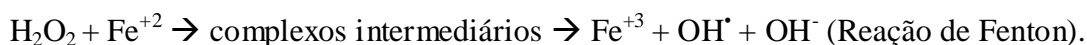
O H_2O_2 e oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) não são radicais livres, porém são consideradas EROs pois ao reagir com outras moléculas pode produzir radicais livres que são moléculas mais reativas e deletérias ao organismo. Existem diferentes reações químicas envolvendo EROs, porém destaca-se a reação de dismutação do radical ânion superóxido (O_2^-) que é o radical livre mais comum nos sistemas biológicos, naturalmente gerado pelo metabolismo aeróbico durante a redução parcial do oxigênio. Esta reação pode ser espontânea ou por meio de catálise enzimática utilizando-se a enzima superóxido dismutase:



O radical O_2^- também pode reagir com uma molécula de H_2O_2 (reação de Haber-Weiss):



Outra forma de geração de radical OH^\bullet é por meio da reação de Fenton, que envolve o H_2O_2 , metais e oxigênio:



A reação de Fenton é muito importante fisiologicamente, pois envolve metais de transição como o ferro e cobre que apresentam dois estados redox, ou seja, podem se

apresentar na forma reduzida ($\text{Cu}^+/\text{Fe}^{+2}$) ou oxidada ($\text{Cu}^{+2}/\text{Fe}^{+3}$). Os organismos necessitam destes metais em seu estado reduzido para que possam ser utilizados como co-fatores nos variados processos metabólicos e na presença de EROs, estes metais geralmente são deslocados para a reação de Fenton, podendo desta maneira causar a inativação desses processos (Puig *et al.*, 2002; Stowe & Camara, 2009). O maior efeito deletério da reação de Fenton é a produção do radical hidroxila, que teoricamente pode oxidar todos os tipos de biomoléculas, incluindo proteínas, DNA e lipídios (Halliwell, 2007).

1.3.2.1 – Fontes de EROs nos sistemas biológicos

A célula é submetida a uma série de processos metabólicos capazes de produzir EROs. Na mitocôndria, a cadeia respiratória por meio da transferência de elétrons é considerada a principal fonte endógena de EROs. Elétrons são transferidos a partir de moléculas reduzidas para o O_2 através de uma cadeia de complexos enzimáticos, I-IV. A redução parcial do O_2 gera $\text{O}_2^{\cdot-}$ ou H_2O_2 principalmente nos complexos I e III. O complexo IV (citocromo C oxidase) assegura a completa redução do O_2 para a água, sem formação de EROs (Forman & Azzi, 1997; Lehninger *et al.*, 2005; Grivennikova & Vinogradov, 2006; Rigoulet *et al.*, 2010). Os peroxissomos e as células do sistema imunológico também são produtores de EROs.

Nos peroxissomos, algumas reações oxidativas na degradação dos aminoácidos e ácidos graxos longos produzem radicais livres e H_2O_2 . A β -oxidação produz o H_2O_2 no primeiro passo oxidativo, onde os elétrons do FADH_2 são diretamente transferidos ao oxigênio. Desta maneira, a produção do H_2O_2 se torna comum nesta organela e para evitar possíveis danos causados pelo H_2O_2 , os peroxissomos possuem altas concentrações de catalase, a enzima responsável por converter imediatamente o H_2O_2 em H_2O e O_2 (Lehninger *et al.*, 2005; Terlecky & Koepke, 2007).

Paradoxalmente, EROs podem ser utilizadas na proteção do hospedeiro contra agentes infecciosos onde, após a fagocitose, os microrganismos invasores são expostos a um coquetel de substâncias tóxicas, compostas principalmente por espécies reativas de nitrogênio e por EROs (Bogdan, 2007; Brown *et al.*, 2009). Fagócitos ativam o complexo enzimático NADPH-oxidase após detectar a presença de corpos estranhos, como bactérias, fungos, vírus ou imunocomplexos. Após ser ativado, o sistema NADPH-oxidase cataliza a redução do O_2 , por meio da transferência de elétrons de NADPH, para então gerar $\text{O}_2^{\cdot-}$. Em seguida este radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ pode reagir com o óxido nítrico (NO) formando o radical peroxinitrito ($\text{ONOO}^{\cdot-}$) ou pode

sofrer a dismutação, conforme reação exemplificada anteriormente, gerando assim o H_2O_2 (Forman & Torres, 2001; Halliwell, 2006; Brown *et al.*, 2009a). Outra enzima utilizada na proteção do hospedeiro é a mieloperoxidase que converte o H_2O_2 e o radical clorídrico (Cl^\cdot) a ácido hipocloroso (HClO) (But *et al.*, 2002; Cruz, 2010).

Embora o radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ possa inativar proteínas ferro-sulfurosas de alguns patógenos, este radical é considerado um fraco agente bactericida; desta forma, sua produção torna-se relevante para o sistema imune devido à sua capacidade em gerar produtos secundários com forte atividade antimicrobiana, tais como HClO , ONOO^- e o H_2O_2 (Fang, 2004; Barreiros *et al.*, 2006; Vasconcelos *et al.*, 2007).

Como descrito, as principais fontes de EROs são endógenas, porém algumas condições exógenas como radiação, toxinas e poluentes também podem causar estresse oxidativo na célula (Elsayed, 2001; Droge, 2002; Herrero *et al.*, 2008; Brown *et al.*, 2009).

1.3.2.2. – Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

O H_2O_2 é uma das principais EROs formada endogenamente. A concentração intracelular do H_2O_2 é altamente regulada pela célula e sua presença é ubíqua em todos os organismos aeróbios (Giorgio *et al.*, 2007; Halliwell, 2007). Na célula, o H_2O_2 pode desempenhar diferentes funções, por exemplo, atuar como um mensageiro secundário durante o processo de sinalização ou atuar na regulação da proliferação, desenvolvimento e morte celulares pela direta interferência no sistema redox (Belozerskaia & Gessler, 2007; Mates *et al.*, 2008; Vandenbroucke *et al.*, 2008).

O H_2O_2 é um oxidante relativamente estável, não apresentando carga elétrica e, por isso, na ausência de metais de transição, se torna pouco reativo frente às moléculas orgânicas (Godon *et al.*, 1998; Costa *et al.*, 2002; Bienert *et al.*, 2007). Entre as características do H_2O_2 destacam-se a meia vida relativamente longa em relação às outras EROs (Giorgio *et al.*, 2007; Halliwell, 2007). Devido a estas características, o H_2O_2 tem sido amplamente utilizado pela comunidade científica como um indutor do estresse oxidativo.

Acredita-se que devido ao fato de não reagir imediatamente, o H_2O_2 pode migrar pela célula e atingir alvos distantes de onde foi gerado causando danos a diferentes alvos celulares. Os danos causados pelo H_2O_2 podem ocorrer de forma direta por meio da peroxidação lipídica, carbonilação ou oxidação de proteínas e danos no DNA ou de forma indireta por sua

capacidade de gerar o radical OH^\bullet em presença de metais como ferro (Jamieson, 1998; Temple *et al.*, 2005; Le Moan *et al.*, 2006).

Por muitos anos acreditou-se que o H_2O_2 atravessasse livremente as membranas celulares (Halliwell *et al.*, 2000), no entanto atualmente tem-se observado que esta difusão parece ser dependente de canais protéicos específicos, localizados nas membranas celulares e que estes canais regulariam a permeabilidade do H_2O_2 de maneira rápida e sensível (Branco *et al.*, 2004; Bienert *et al.*, 2007). Pedroso e colaboradores, ao avaliar a resposta de *S. cerevisiae* ao tratamento com H_2O_2 , verificaram que o perfil lipídico da membrana plasmática é alterado em resposta a este tratamento, possivelmente na tentativa de reduzir a permeabilidade, minimizando assim, os conseqüentes danos que este composto poderia causar na célula (Pedroso *et al.*, 2009). Mishina e colaboradores avaliaram a dinâmica do H_2O_2 produzido endógenamente e puderam observar que esta molécula não se difunde livremente através do citoplasma, mas em vez disso se localiza em regiões próximas de onde foi gerado, sugerindo assim que o H_2O_2 poderia agir apenas nas proximidades de sua formação (Mishina *et al.*, 2011).

1.3.3. – Antioxidantes

Para garantir a homeostase celular e proteger a célula contra danos oxidativos, os organismos aeróbicos mantêm EROs a um nível basal por meio de um sistema antioxidante eficaz que neutraliza as EROs impedindo, conseqüentemente, que as biomoléculas sejam danificadas. Um antioxidante pode ser definido como qualquer substância que retarda, impede ou elimina os danos oxidativos para uma molécula-alvo (Scandalios, 2005; Gutteridge & Halliwell, 2010).

Fungos apresentam antioxidantes de natureza enzimática ou não enzimática que são produzidos pelo metabolismo secundário (Chauhan *et al.*, 2006). Glutationa, melanina, β -carotenos, zeaxantina, ascorbato e vitamina E são alguns exemplos de moléculas antioxidantes não enzimáticas. Dentre os antioxidantes de natureza enzimática encontramos aquelas que constituem as defesas primárias, destacando-se as catalases, superóxido dismutases, citocromo C peroxidase, glutathione peroxidase e tioredoxinas (Scandalios, 2005; Gutteridge & Halliwell, 2000; Halliwell, 2011).

As defesas antioxidantes secundárias são compostas por sistemas proteolíticos, como as peptidases e proteinases, que impedem o acúmulo de proteínas danificadas pela oxidação ou

por compostos que atuam no sistema de reparo, como proteínas do choque térmico. Adicionalmente, o transporte de compostos tóxicos para vacúolos, a quelação de metais entre outros mecanismos também favorecem a resistência de fungos ao estresse oxidativo (Sigler *et al.*, 1999; Belozerskaia & Gessler, 2007).

1.3.3.1 – Catalases

As catalases são oxidoreduases homotetraméricas que apresentam um átomo de ferro ou manganês ligado à porfirina, promovendo a decomposição do H_2O_2 em O_2 e H_2O (Kirkman & Gaetani, 2007; Dominguez *et al.*, 2010). As catalases são classificadas de acordo com suas similaridades funcionais e estruturais, podendo ser agrupadas de três modos: catalases manganês, catalases peroxidases e catalases monofuncionais. Catalases manganês ou pseudocatalases são caracterizadas pela presença do manganês ligado à porfirina. Catalases peroxidases ou catalases bifuncionais são caracterizadas pela função que apresentam, ou seja, são denominadas bifuncionais por degradar o H_2O_2 e outras EROs. O terceiro grupo, classificado como catalases monofuncionais ou catalases verdadeiras, são enzimas homotetraméricas que degradam somente o peróxido de hidrogênio (Kawasaki & Aguirre, 2001; Chelikani *et al.*, 2005; Vlasits *et al.*, 2010).

1.3.3.2 – Superóxido dismutases (SODs)

São metaloproteínas abundantes em células aeróbicas que catalisam a dismutação do ânion radicalar $O_2^{\cdot-}$ em O_2 e H_2O_2 . Estas enzimas apresentam diferentes grupos prostéticos em sua composição e podem conter cobre/zinco, ferro ou manganês em seu sítio ativo. A Cu/Zn-SOD está presente principalmente no citosol das células eucarióticas, enquanto que a Mn-SOD é encontrada principalmente nas mitocôndrias (Culotta, 2000; Landis & Tower, 2005; Leitch *et al.*, 2009).

1.3.3.3 – Peroxidases e sistema tioredoxina

As peroxidases são um grupo de enzimas oxireduases que utilizam diferentes substratos orgânicos como doadores de elétrons para reduzir o H_2O_2 à H_2O . Exemplos de peroxidases são a citocromo C peroxidase, glutathiona peroxidase e ascorbato peroxidase (Bindoli *et al.*, 2008; Battistuzzi *et al.*, 2010). As tioredoxinas são proteínas de baixa massa molecular (~12 kDa) com dois resíduos de cisteína, cujos grupos tiólicos se alternam entre as formas reduzida (SH) e oxidada (S-S) e possuem um papel determinante na manutenção do estado redox de tíois de diversas proteínas. A transferência de elétrons pela oxidação reversível do grupamento SH a

pontes dissulfeto é a principal atividade exercida por esta família enzimática (Trotter & Grant, 2005; Lillig & Holmgren, 2007).

1.3.4. – Resposta adaptativa ao estresse oxidativo

Os processos biológicos que estão na base da resposta adaptativa ao estresse oxidativo têm sido amplamente estudados nos mais diferentes sistemas biológicos. A resposta adaptativa ideal é aquela que promove uma proteção mais elevada e flexível durante a adaptação do organismo às variadas condições ambientais. Para que esta resposta seja alcançada, os organismos desenvolveram um sistema antioxidante complexo que apresenta várias possibilidades de resposta ao estresse por meio da redundância ou sobreposição entre as vias de defesa. Estas respostas seriam particularmente importantes durante o processo infeccioso, onde os microorganismos patogênicos precisam utilizar diferentes mecanismos para resistir ao ataque do sistema imunológico. A principal resposta adaptativa ao estresse parece ser a ativação de enzimas antioxidantes, que tem se mostrado ativas em diferentes tipos de estresse (Missall *et al.*, 2004; Seider *et al.*, 2010).

Nos últimos anos tem-se investigado a resposta global a estresses objetivando identificar uma resposta comum a estas variadas condições. Estes estudos têm revelado que, embora haja especificidade na resposta para um determinado tipo de estresse, existe sim uma resposta comum aos diferentes tipos de estresses como ao térmico, osmótico e oxidativo (Gasch *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2009; Yin *et al.*, 2009). Têm-se relatado também, que a submissão prévia de microorganismos, à baixa dose de indutores de estresse, favorece a indução de uma resposta adaptativa protetora, tornando-os mais resistentes a doses mais elevadas desses estressores (Jamieson, 1998; Li *et al.*, 2008b; Kim *et al.*, 2011).

Em *Saccharomyces cerevisiae*, considerado um modelo experimental, foram realizados estudos transcricionais para avaliar a resposta celular a diferentes tipos de estresse, inclusive o oxidativo estimulado pelo H₂O₂. O estudo revelou a indução de vários genes que foram associados à reação redox celular, detoxificação de EROs, metabolismo de carboidratos, metabolismo de ácidos graxos, modificação da parede celular, enovelamento, degradação de proteínas, reparo no DNA, transporte de metabólitos, sinalização intracelular, autofagia, bem como genes relacionados a função vacuolar e mitocondrial; em contrapartida foi observada a repressão de genes envolvidos com metabolismo de RNA, síntese de proteínas, biossíntese de

nucleotídeos, síntese protéica e ao crescimento celular; caracterizando desta maneira, a resposta comum de genes responsivos aos diferentes tipos de estresses (Gasch *et al.*, 2000).

A regulação transcricional e traducional de *Schizosaccharomyces pombe* durante diferentes condições de estresse foi recentemente caracterizada. Análise de correlação entre o perfil transcricional e o perfil traducional revelou-se altamente concordantes, o que indica haver um fino ajuste na regulação gênica e uma coordenação global das respostas aos diferentes tipos de estresse avaliados (térmico, oxidativo e de danos ao DNA). Para o estudo do estresse oxidativo, os autores correlacionaram também o perfil proteômico que se apresentou concordante com o perfil transcricional indicando que as variações globais na expressão protéica foram melhor correlacionada com as alterações na expressão de mRNA do que com as alterações traducionais, sugerindo que, em condição de estresse oxidativo, a resposta transcricional predomine sobre a traducional para controlar a abundância protéica na célula, coordenando desta forma a eficaz resposta ao estresse (Lackner *et al.*, 2012).

1.3.4.1 – Resposta adaptativa de *Paracoccidioides* ao estresse oxidativo

Durante o ciclo de vida, *Paracoccidioides* pode ser exposto a diferentes condições de estresse como choque térmico, choque osmótico e estresse oxidativo. Condições de estresse podem desencadear mudanças no balanço redox intracelular dos organismos resultando na produção de EROs (Fedoroff, 2006). Como descrito anteriormente, estas moléculas podem causar danos a diferentes componentes celulares e para que *Paracoccidioides* consiga resistir ao ataque destas EROs, se faz necessário que o fungo desenvolva diferentes estratégias para a detoxificação destas espécies. *Paracoccidioides* apresenta uma notável resistência ao tratamento *in vitro* com H₂O₂. Leveduras de *Paracoccidioides* na fase estacionária e na fase exponencial de crescimento foram tratadas com altas concentrações de H₂O₂ (25, 50, 75 e 100 mM) e apresentaram taxas de sobrevivência superior a 70% após 1 e 6 horas de tratamento (Dantas *et al.*, 2008). Essa resistência não foi observada em *S. cerevisiae* que mostrou-se muito mais sensível, com sobrevivência de apenas 2% destas células ao tratamento com 10 mM de H₂O₂ por 15 minutos de exposição (Collinson & Dawes, 1992). A alta resistência de *Paracoccidioides* ao H₂O₂ sugere que este fungo apresente um complexo e eficaz sistema antioxidante.

Estudos têm focado na análise de genes e proteínas de *Paracoccidioides* relacionados ao estresse oxidativo. O projeto Genoma Funcional e diferencial de *Paracoccidioides* permitiu a identificação de genes expressos nas formas de levedura e micélio deste fungo (Felipe *et al.*,

2003; Felipe *et al.*, 2005a). A partir dos dados gerados, Campos e colaboradores realizaram análises para identificação de sequências de cDNA que possivelmente seriam envolvidas na resposta fúngica ao estresse oxidativo (Campos *et al.*, 2005). A análise revelou que este fungo apresenta várias enzimas antioxidantes como catalase, superóxido dismutase, peroxiredoxina, citocromo C peroxidase, glutatona e tioredoxina as quais favoreceriam a sua proteção frente às EROs.

No complexo de enzimas antioxidantes de *Paracoccidioides*, destacam-se as catalases. Estas enzimas têm sido bem caracterizadas. Em 2001, Fonseca e colaboradores realizaram análises de imunoproteômica com soros de pacientes acometidos por PCM e observaram que uma das moléculas antigênicas de *Paracoccidioides* era a proteína catalase, que foi confirmada através de sequenciamento N- terminal e de peptídeos internos (61 kDa) (da Fonseca *et al.*, 2001). Posteriormente, Moreira e colaboradores (2004) isolaram o cDNA codificante para a catalase peroxissomal. Esta proteína apresentou motivos de assinatura para catalases monofuncionais e de endereçamento aos peroxissomos. A expressão do mRNA codificante de catalase peroxissomal mostrou-se aumentada na presença de H₂O₂ e durante a transição morfológica do fungo (Moreira *et al.*, 2004). Em 2008, Dantas e colaboradores correlacionaram o aumento da atividade da catalase total e da citocromo C peroxidase com a resistência de *Paracoccidioides* ao tratamento com H₂O₂, sugerindo que estas enzimas podem desenvolver uma importante atividade na defesa fúngica contra o estresse oxidativo (Dantas *et al.*, 2008). Neste mesmo ano, Chagas e colaboradores identificaram e descreveram três diferentes tipos de catalases (*PbCatA*, *PbCatP* e *PbCatC*) em *Paracoccidioides*. De acordo com os estudos *PbCatA* e *PbCatC* foram associadas à proteção de *Paracoccidioides* contra o estresse oxidativo endógeno, enquanto *PbCatP* foi associada principalmente ao estresse oxidativo exógeno (Chagas *et al.*, 2008). Como a produção de H₂O₂ por macrófagos desempenha um importante papel na morte de fungos patogênicos em tecidos infectados (Shibuya *et al.*, 2006) estes autores adicionalmente, investigaram se as catalases desempenhariam alguma função protetora ao fungo, em condição de estresse oxidativo, causado por macrófagos durante o processo infectivo. Por meio de ensaios de RT-qPCR foi demonstrado que a expressão de transcritos de *PbcatP* e *PbcatA* foi aumentada durante a infecção, indicando que a produção destas catalases pode favorecer a sobrevivência de *Paracoccidioides* nos fagossomos de macrófagos (Chagas *et al.*, 2008).

A resposta transcricional de *Paracoccidioides* ao microambiente de macrófagos peritoneais murinos, por meio da técnica de microarranjo, foi caracterizada por Tavares e colaboradores e revelou que o fungo induz a expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo tais como Cu/Zn - superóxido dismutase e HSP 60 (Tavares *et al.*, 2007). Adicionalmente, a resposta ao estresse oxidativo é possivelmente um processo nicho específico em *Paracoccidioides*. Embora a resposta ao estresse oxidativo seja um aspecto geral do metabolismo de células leveduriformes derivadas de tecidos infectados em modelo animal e durante o tratamento com sangue e plasma humanos (Bailao *et al.*, 2006; Bailao *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2009), verifica-se a especificidade da resposta para diferentes condições experimentais, sugerindo regulação nicho-específica no hospedeiro. Dessa maneira, em células leveduriformes derivadas de fígado infectado predomina a expressão de genes codificantes para tioredoxina e para uma proteína de resistência à oxidação (Bailao *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2009). Em células leveduriformes incubadas na presença de plasma predomina a expressão do gene codificante para catalase A (Bailao *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2009). Avaliando estes dados em conjunto é possível observar que *Paracoccidioides* apresenta um sistema antioxidante eficaz que promove sua habilidade em resistir às injúrias provocadas pelo estresse oxidativo.

1.3.5 – O emprego de análises proteômicas no estudo do estresse oxidativo

O termo proteoma foi utilizado pela primeira vez em 1996 para descrever o complemento protéico total do genoma (Wilkins *et al.*, 1996). Atualmente, o termo proteômica tem sido definido como a análise em grande escala de proteínas expressas por uma determinada célula, tecido ou organismo numa condição específica. O objetivo da análise proteômica não é apenas identificar todas as proteínas na célula, mas também criar um mapa tridimensional da célula indicando onde as proteínas estão localizadas e o ambiente no qual a célula é estudada. Assim, o proteoma fornece informações das proteínas presentes em uma célula em um determinado momento, contrariamente ao genoma que funciona como um repositório essencialmente estático da informação genética (Graves & Haystead, 2002).

Sabe-se que a expressão protéica pode ser alterada em resposta a estímulos ambientais variados e que esta resposta pode ser modulada por modificações pós-traducionais. Assim, o perfil protéico de uma célula pode ser determinado por meio da identificação das proteínas responsivas a estímulos ambientais, ou seja, aquelas proteínas que tiveram seus padrões de

expressão elevada ou diminuída. Portanto o proteoma de uma célula reflete o ambiente no qual a célula ou organismo está exposto e assim um mesmo genoma pode potencialmente originar um número infinito de proteomas (Wilkins *et al.*, 1996; Graves & Haystead, 2002). Neste contexto, a análise proteômica tem se revelado uma importante ferramenta utilizada no estudo do estresse oxidativo.

Utilizando a técnica 2D-DIGE (Eletroforese de fluorescência diferencial em gel bidimensional) foi possível analisar o perfil de expressão diferencial de *Kluyveromyces lactis* sob estresse oxidativo. Como esperado, foram observadas a indução de várias enzimas antioxidantes, de chaperonas e de oxidoredutases, bem como de outras proteínas relacionadas à produção de energia, metabolismo de carboidratos e aminoácidos (Garcia-Leiro *et al.*, 2010). Técnicas similares foram utilizadas para avaliar a resposta de *C. albicans* ao tratamento com H₂O₂. Estas análises também demonstraram o aumento da expressão de enzimas antioxidantes como peroxiredoxina, redutases e também chaperonas (Yin *et al.*, 2009). Em *A. fumigatus* a resposta adaptativa ao estresse oxidativo foi caracterizada pela indução das enzimas tioredoxina peroxidases, citocromo C peroxidase, Cu/Zn superoxide dismutase, catalase, bem como proteínas do choque térmico e enzimas da via das pentoses fosfato (Lessing *et al.*, 2007).

Em *Paracoccidioides* análises proteômicas também têm sido empregadas com sucesso. Parente e colaboradores (2011) empregaram a técnica de eletroforese bidimensional (2-DE) acoplado à identificação por espectrometria de massa MALDI-QTOF MS e MS/MS para investigar o perfil de proteínas citoplasmáticas de *Paracoccidioides* sob restrição do íon ferro. Foram induzidas enzimas da via glicolítica e proteínas de resposta ao choque térmico, enquanto várias enzimas do ciclo do ácido tricarboxílico, ciclo do metilcitrato e glioxalato e proteínas da cadeia transportadora de elétrons mostraram-se reprimidas. Os autores sugerem que o fungo responda à restrição de ferro por meio do remodelamento do metabolismo onde o as vias metabólicas não dependentes de ferro sejam priorizadas pelo fungo durante a limitação do micronutriente. Rezende e colaboradores (2011), utilizando a mesma técnica, avaliaram o perfil proteômico da transição dimórfica de *Paracoccidioides*, aspecto que é relacionado à patogenicidade do fungo. Foram comparados os proteomas da forma miceliana, leveduriforme e da transição micélio-levedura, possibilitando a identificação de 100 proteínas/isoformas sendo que 81 apresentaram-se diferencialmente expressas nas três fases do fungo, enquanto

que 19 proteínas/isoformas foram constitutivamente expressas. A expressão de proteínas como superóxido dismutase e peroxiredoxina mitocondrial foi mais abundante na fase miceliana. Nos estágios iniciais da transição (22 h) algumas enzimas envolvidas na glicólise, como enolase e fosfoglicomutase, foram aumentadas. Proteínas de choque térmico e ATP sintase também foram significativamente aumentadas durante o evento de transição. Proteínas preferencialmente expressas na fase leveduriforme foram identificadas e relacionadas com a via glicolítica, ciclo do glioxalato e ao metabolismo de lipídeos. Os dados obtidos por estes autores demonstraram que o fungo promove um remodelamento do seu metabolismo durante a transição morfológica.

Vallejo e colaboradores também utilizaram ferramentas proteômicas (LC-MS/MS) para caracterizar o proteoma extracelular de leveduras de *Paracoccidioides* – isolado *Pb18*. Foram identificadas 120 proteínas, sendo que 75 foram caracterizadas como extracelulares. O estudo sugere que algumas proteínas extracelulares são mediadoras da interação parasita-hospedeiro porque podem auxiliar a disseminação fúngica pela liberação de proteases e lipases ou ainda por neutralizar mecanismos de defesa do hospedeiro como exemplo a secreção de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, demonstrando desta forma que as proteínas extracelulares são moléculas potencialmente relevantes para a virulência e patogênese fúngica (Vallejo *et al.*, 2012).

Estudo relacionado às proteínas extracelulares de *Paracoccidioides* foi realizado por Weber e colaboradores. O estudo descreve o perfil das proteínas secretadas das fases miceliana e leveduriforme do isolado *Pb01*. Os autores identificaram 42 e 50 proteínas/isoformas preferencialmente secretadas por levedura e micélio, respectivamente. Análises *in silico* mostraram que 65% das proteínas extracelulares foram preditas serem secretadas por vias não convencionais indicando ser esta a principal via de exportação de proteínas neste fungo. Adicionalmente, foi investigada a influência da inibição da secreção protéica em leveduras durante a fagocitose por macrófagos. A adição de Brefeldina A ao meio de cultura diminuiu significativamente a quantidade de proteínas secretadas e de leveduras internalizadas por macrófagos, indicando que a secreção de proteínas por *Paracoccidioides* pode facilitar aos estágios iniciais da invasão/colonização do fungo no hospedeiro (Weber *et al.*, - *in press*).

A proteômica tem contribuído para um melhor conhecimento de processos biológicos como morfogênese, virulência, resposta ao hospedeiro, bem como para o desenvolvimento de potenciais alvos antifúngicos e abordagens terapêuticas (Pitarch *et al.*, 2003). Desta maneira, a técnica de eletroforese bidimensional (2-DE) acoplada à identificação por espectrometria de massa (MALDI-QTOF MS e MS/MS) foi selecionada como a ferramenta proteômica para investigar o perfil de proteínas de leveduras de *Paracoccidioides* durante o estresse oxidativo após 2 e 6 horas de exposição ao H₂O₂.

2 – JUSTIFICATIVA

Fungos patogênicos são expostos a vários tipos de estresses durante a invasão ao hospedeiro ou mesmo em seus nichos ecológicos, por exemplo, estresse nutricional, térmico, nitrosativo, oxidativo, além daqueles decorrentes da alteração no pH, de variações na tensão de oxigênio e da exposição a agentes tóxicos.

Ao entrar em contato com o hospedeiro, *Paracoccidioides* interage com várias células efetoras do sistema imunológico as quais utilizam diferentes mecanismos para controlar a infecção, como a fagocitose por macrófagos ativados. No interior do fagossoma, as leveduras de *Paracoccidioides* são expostas ao H₂O₂ e a outras substâncias tóxicas que causam diferentes danos às estruturas celulares, podendo assim, promover a morte destas leveduras. Em resposta ao ataque oxidativo, *Paracoccidioides*, a exemplo de outros patógenos, modulam respostas moleculares para resistir aos danos causados pelas EROs por meio da indução de fatores antioxidantes que atuam neutralizando estas espécies ou atuam no reparo aos danos causados por estas EROs.

A principal meta de estudos proteômicos consiste em obter uma visão biológica integrada de todas as proteínas presentes em uma determinada célula. Por ser altamente dinâmico, o proteoma fornece informações das proteínas celulares em um determinado momento e devido a esta possibilidade a técnica se torna uma importante ferramenta para o estudo da resposta celular aos estímulos internos e externos, como ao estresse induzido pelo H₂O₂.

Diferentes estudos têm apresentado o perfil proteômico responsivo ao estresse oxidativo em procariotos e alguns eucariotos, entretanto para o fungo *Paracoccidioides* nada se tem descrito sobre este assunto. Até o momento, foram publicados relatos descritivos de genes possivelmente envolvidos com o estresse oxidativo ou estudos específicos de enzimas antioxidantes. Embora esses estudos tenham proporcionado uma base para se entender a resposta de *Paracoccidioides* ao estresse oxidativo, os nossos conhecimentos sobre os mecanismos moleculares ainda permanecem obscuros. Assim, acreditamos que a caracterização do perfil diferencial de expressão protéica de *Paracoccidioides* em condições de estresse oxidativo se faz muito importante, já que esta é uma condição possivelmente encontrada pelo fungo durante o processo de infecção ao hospedeiro.

3 – OBJETIVOS

Visando o estudo da complexa interação *Paracoccidioides*-hospedeiro o presente trabalho objetivou caracterizar o perfil de expressão protéica deste fungo após a exposição ao H₂O₂, um agente indutor do estresse oxidativo.

Para alcançar esse objetivo o presente estudo utilizou as seguintes estratégias:

- Induzir o estresse oxidativo em células leveduriformes de *Paracoccidioides* por meio do tratamento com H₂O₂;
- Produzir mapas eletroforéticos bidimensionais de proteínas totais da forma leveduriforme de *Paracoccidioides*;
- Realizar análises computacionais dos mapas bidimensionais de proteínas capturadas em sistema de fotodocumentação e processá-las, detectando o número de *spots* de proteínas, a massa molecular e ponto isoelétrico em cada condição de estresse oxidativo;
- Realizar análises estatísticas para identificar proteínas/isoformas diferencialmente expressas;
- Identificar proteínas diferencialmente expressas por meio da ionização, fragmentação, análise, detecção e produção dos espectros de massas, comparando-os aos bancos de dados de mapas peptídicos para aquelas proteínas candidatas disponibilizadas em bancos de dados;
- Caracterizar e classificar por meio da função teórica as proteínas obtidas;
- Avaliar a resposta inicial e tardia de *Paracoccidioides* ao H₂O₂;
- Realizar análise transcricional de possíveis genes codificantes para enzimas antioxidantes responsivas ao tratamento com H₂O₂;
- Realizar experimentos de validação para proteínas identificadas;
- Propor possíveis estratégias moleculares utilizadas pelo fungo *Paracoccidioides* em resposta ao estresse oxidativo estimulado pelo tratamento com H₂O₂.

4 – MANUSCRITO

Elsevier Editorial System(tm) for Microbes and Infection
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Response to oxidative stress in *Paracoccidioides* yeast cells as determined by proteomic analysis

Article Type: Original article

Keywords: *Paracoccidioides*; oxidative stress; proteomic analysis; antioxidant enzymes; metabolic profile

Corresponding Author: Mrs Celia Maria de Almeida Soares, PhD

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal de Goias

First Author: Daciene A Grossklaus, MsC

Order of Authors: Daciene A Grossklaus, MsC; Alexandre M Bailão, PhD; Tereza Cristina V Rezende, PhD; Clayton L Borges, PhD; Milton Adriano P Oliveira, PhD; Juliana A Parente, PhD; Celia Maria de Almeida Soares, PhD

Abstract: An efficient oxidative stress response is important to the fungal pathogen *Paracoccidioides* to survive within the human host. In this study, oxidative stress was mimicked by exposure of yeast cells to hydrogen peroxide (2 mM H₂O₂). To investigate the effect of H₂O₂ on the proteome of *Paracoccidioides*, we used a large scale 2-DE protein gel electrophoresis approach to analyze differentially expressed proteins that were detected in early (2 h) and in late (6 h) oxidative stress treatments. All proteins were grouped based on their functional categories that revealed a global activation of antioxidant enzymes, such as catalase, superoxide dismutase, cytochrome C peroxidase and thioredoxin. A view of the metabolic cell profile, as determined by proteomics, depicted a shift in the yeast cells metabolism as suggested by the activation of the pentose phosphate pathway, a great source of cellular reducing power in the form of NADPH. Additionally, *in silico* analyses depicted 34 oxidoreductases putatively involved with defense against oxidative stress. Confirmatory assays of enzymatic activity, flow cytometry, transcript levels and NADPH measurements, produced data in agreement with proteomic analysis.

Suggested Reviewers: Marcio L Rodrigues PhD

Full Professor, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro
marciolrodrig@gmail.com

Augusto Schrank PhD

Full Professor, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul
aschrank@cbiot.ufrgs.br

Hubertus Haas PhD

Full Professor, Division of Molecular Biology, Innsbruck Medical University
hubertus.haas@i-med.ac.at

Alan G Smulian MD

Full Professor, Division of Infectious Diseases, University of Cincinnati

smuliaag@ucmail.uc.edu

James Kronstad
Full Profesor, Michael Smith Laboratories, University of British Columbia
kronstad@mssl.ubc.ca

Opposed Reviewers:



*To the
Associated Editor
Microbes and Infection
Joshua Nosanchuk*

Goiânia, October 18, 2012.

Dear Dr Nosanchuk

It is our pleasure to submit our article entitled “Response to oxidative stress in *Paracoccidioides* yeast cells as determined by proteomic analysis” to the Microbes and Infection editorial board. In this manuscript, we had described, for the first time, the proteome of yeast cells of the dimorphic fungus *Paracoccidioides*, submitted to oxidative stress treatment. This dimorphic fungus presents a broad distribution in Latin America, causing the most frequent systemic mycosis in the region. It is known that an efficient oxidative stress response is important to the fungal pathogen *Paracoccidioides* to survive within the human host. In this way, we employed proteomic approaches to address the question of whether H₂O₂-treatment of yeast cells of *Paracoccidioides* would result in a proteome with significant differences from that of unstressed cells.

Our data demonstrated proteins differentially expressed, that allowed to describe an adaptive response of *Paracoccidioides* to oxidative stress. The fungus presents a prominent activation of antioxidant enzymes and a rearrangement of the metabolism, observed by activation of several proteins reported to the pentose phosphate pathway, gluconeogenesis and generation of amino acids important to compose the repertoire of molecules to the oxidative stress response. Importantly, proteomic data correlated to transcript level and enzymatic activity of selected proteins. Additionally, the redox potential of cells submitted to oxidative stress was altered in agreement to the generation of NADPH by the pentose phosphate pathway.

We believe that information about the identified proteins provides a useful resource for studying the host-fungus interaction and the strategies the fungus employ to survive in the hostile environment. We believe that this article represents a great contribution for those involved in the area of fungal pathogens.

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:55-62-35211110
e-mail: cmasoares@gmail.com*

Response to oxidative stress in *Paracoccidioides* yeast cells as determined by proteomic analysis

Daciene de Arruda Grossklaus^{a,b}, Alexandre Melo Bailão^a, Tereza Cristina Vieira Rezende^a, Clayton Luiz Borges^a, Milton Adriano Pelli de Oliveira^c, Juliana Alves Parente^a, Célia Maria de Almeida Soares^{a*}

^a.Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Campus II, Universidade Federal de Goiás, 74001-970, Goiânia, Goiás, Brazil.

^b. Programa de Pós Graduação em Patologia Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, 70910-900, Brasília, Distrito Federal, Brazil.

^c. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, 70910-900, Goiânia, Goiás, Brazil.

* Correspondence author:

Célia Maria de Almeida Soares, Laboratório de Biologia Molecular, ICBII, Campus II, Universidade Federal de Goiás, 74001-970, Goiânia-Goiás, Brazil. Tel./fax: +55 6235211110; e-mail: cmasoares@gmail.com

Abstract

An efficient oxidative stress response is important to the fungal pathogen *Paracoccidioides* to survive within the human host. In this study, oxidative stress was mimicked by exposure of yeast cells to hydrogen peroxide (2mM H₂O₂). To investigate the effect of H₂O₂ on the proteome of *Paracoccidioides*, we used a large scale 2-DE protein gel electrophoresis approach to analyze differentially expressed proteins that were detected in early (2 h) and in late (6 h) oxidative stress treatments. All proteins were grouped based on their functional categories that revealed a global activation of antioxidant enzymes, such as catalase, superoxide dismutase, cytochrome C peroxidase and thioredoxin. A view of the metabolic cell profile, as determined by proteomics, depicted a shift in the yeast cells metabolism as suggested by the activation of the pentose phosphate pathway, a great source of cellular reducing power in the form of NADPH. Additionally, in silico analyses depicted 34 oxidoreductases putatively involved with defense against oxidative stress. Confirmatory assays of enzymatic activity, flow cytometry, transcript levels and NADPH measurements, produced data in agreement with proteomic analysis.

Keywords: *Paracoccidioides*, oxidative stress, proteomic analysis, antioxidant enzymes, metabolic profile.

1. Introduction

Oxidative stress is a disorder caused by enhanced reactive oxygen species (ROS) due to imbalance between ROS generation and elimination. Normally, ROS are maintained at certain steady-state levels in aerobic organisms and they are continuously produced during the cellular respiration [1, 2]. In the mitochondria, most oxygen molecules are reduced to water, although about 1–5% undergoes incomplete reduction, forming the main part of ROS, such as the hydroxyl radical (OH), superoxide anion (O_2^-), and hydrogen peroxide (H_2O_2). ROS also are generated by some enzymes such as oxidases that are important to the immune system to protect the host organism against infectious agents [3, 4]. The oxidative stress, that pathogens are subjected within the phagosome, is induced presumably due to the toxic cocktail of reactive oxygen, nitrogen and chloride species generated by phagocytes and these reactive species cause damage to DNA, proteins and lipids [3, 5].

Paracoccidioidomycosis is an important human systemic mycosis with a broad distribution in Latin America. The disease, caused by the dimorphic fungus *Paracoccidioides*, a complex of several phylogenetic species [6-8] is acquired by inhalation of infective airborne conidia or mycelia fragments that transit to the pathogenic yeast phase in the host lungs [9]. The infection depends on the fungal escape from the immune system and alveolar macrophages are the first defense cells against *Paracoccidioides*. In order to restrict *Paracoccidioides* infection, macrophages produce several harmful substances, such as H_2O_2 that causes oxidative stress [5, 10, 11]. On the other hand *Paracoccidioides* yeast cells stimulate induction of antioxidant molecules to survive within the phagocyte [12-14].

Some studies had focused on genes and proteins related to the oxidative stress response in *Paracoccidioides*. Data obtained from a *Paracoccidioides* assembled expressed sequence tag (EST) database [15], allowed the description of cDNA sequences potentially involved in the fungus response to oxidative stress [16] such as catalase, superoxide dismutase isoenzymes, peroxiredoxin, cytochrome C peroxidase, glutathione and thioredoxin. Additionally, a complete sequence of cDNA encoding small-subunit monofunctional catalase, named peroxisomal catalase was identified and characterized. Western blot analysis evidenced up-regulation of the peroxisomal catalase in response to H_2O_2 -treatment [17]. The increased activities of catalases and cytochrome C peroxidase were correlated with *Paracoccidioides* resistance to H_2O_2 -treatment, suggesting that these enzymes might play role in the fungal defense against oxidative stress [18]. The expression of the three members of the *Paracoccidioides* catalase family: *PbCatA*, *PbCatB* and *PbCatP* was evaluated and described. According to the studies *PbCatA* and *PbCatB* were associated to *Paracoccidioides* protection against endogen oxidative stress, while *PbCatP* was mostly associated to exogenous oxidative stress [19]. Summarizing, molecular and biochemical approaches have been employed to investigate the oxidative stress response in *Paracoccidioides* and responsive genes and

proteins have been identified, indicating that the fungus uses several antioxidant systems to combat ROS [16-19].

Proteomic approaches in *Paracoccidioides* have been successfully employed by our group in studies focusing on the fungus phase transition [20], as well as the fungal response to iron starvation [21]. Here we employed proteomic strategies to address the question of whether H₂O₂-treatment of yeast cells of *Paracoccidioides* would result in a proteome with significant differences from that of unstressed cells. In this study, we mapped the protein expression profile of *Paracoccidioides* yeast cells exposed to H₂O₂ for early (2 h) and late (6 h) stress, by quantitative differences in two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) protein profiles. We utilized confirmatory assays to the proteomic data, such as quantitative real-time reverse transcription (RT-qPCR), flow cytometry measurements and enzymatic assays. The cellular redox state was monitored by determination of NADP⁺/NADPH ratio during the oxidative stress. Proteomic analysis revealed a prominent activation of ROS-detoxifying enzymes such as catalase, superoxide dismutase, cytochrome C peroxidase and thioredoxin, as well as activation of several proteins related to the pentose phosphate pathway that favors a reductive environment by production of NADPH. The results make up an integrated view of *Paracoccidioides* yeast cells during oxidative stress.

2. Materials and methods

2.1. Microorganism and oxidative stress

The oxidative stress response was investigated in yeast cells of *Paracoccidioides*, Pb01 (ATCC MYA– 826). The yeast cells were sub-cultured every seven days on solid Fava-Netto medium [0.3% (w/v) protease peptone, 1% (w/v) peptone, 0.5% (w/v) meat extract, 0.5% (w/v) yeast extract, 4% (w/v) glucose, 0.5% (w/v) NaCl, pH 7.2] at 36 °C. A total of 2.5 x 10⁸ yeast cells/ml were exposed to 2 mM H₂O₂ at 36 °C for 2 and 6 h, on a shaker at 150 rpm, as previously described [19]. Controls were obtained and all experiments were performed in triplicate. The percentage of viable cells was determined by trypan blue dye exclusion.

2.2. Preparation of protein extracts

Yeast cells were collected at the described time points and submitted to total protein extraction. The cells were centrifuged at 10,000 x g for 15 min at 4 °C, frozen in liquid nitrogen, and disrupted by maceration [22]. Extraction buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.8; 2 mM CaCl₂) containing a mixture of protease inhibitors (serine, cysteine and calpain inhibitors) (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) was added to the yeast cells. After addition of glass beads (0.45 mm), the cells were vigorously mixed for 1 h at 4 °C, followed by centrifugation at 10,000 × g for 15 min at the same temperature. The supernatant was collected, and the protein concentrations were determined by using the Bradford reagent (Sigma Aldrich, Co., St. Louis, MO). The samples were stored in aliquots at -80 °C.

2.3. 2-DE gel and image analysis

Protein samples were treated with 2-D Clean-up Kit (GE Healthcare) following the procedure recommended by the manufacturer. The samples were resuspended in rehydration buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 2 % [w/v] CHAPS, 65 mM DTT, 0.5 % [v/v] IPG [immobilized pH gradient] buffer, 0.001 % [w/v] bromophenol blue). The isoelectric focusing of 300 µg protein was performed in 13 cm immobilized pH gradient (3–11 pH NonLinear) IPG strips on Ettan IPGPhor III Isoelectric Focusing System (GE Healthcare). The isoelectric focusing was performed with a limiting current of 50 µA/strip under the following steps: 500 V/h, step; 800 V/h, gradient; 11,300 V/h, gradient; 2,900 V/h, step; resulting in a total of 15,950 kV/h. IPG strips were equilibrated twice for 45 min with gentle agitation, in the solution (6 M urea, 0.5 M Tris-HCl, pH 8.8, 30% [v/v] glycerol, 2% [w/v] SDS, 0.001% [w/v] bromophenol blue). DTT (0.5% [w/v]) was added to the first step of equilibration while iodoacetamide (2.5% [w/v]) was added at the second step. The second dimension was performed in a Hoefer SE 600 electrophoresis system at 15 °C at 100 V for 1 h, followed by 200 V for 3 h. 2-DE gels were stained with Coomassie brilliant blue, scanned with Labscan software (GE Healthcare) version 3.0 and stored at 4 °C.

The relative determination of the spot volumes was performed with the ImageMaster Platinum 6.0 software (GE Healthcare). To refine automatic spot matching, mismatched spots were manually corrected. Student's *t*-test (Statistics software version 7.0) was used to compare the differences in the mean spot volume. Differentially accumulated proteins/spots with $p < 0.05$ were considered statistically significant and were selected to mass spectrometry analysis.

2.4. Mass spectrometry analysis

Spots of interest were manually excised from 2-DE gels and the gel pieces were submitted to manual digestion. The gel pieces were dehydrated with pure acetonitrile (ACN) and dried in a speed vacuum. The gel pieces were reduced with a solution containing 10 mM DTT in 25 mM NH_4HCO_3 for 1 h at 56 °C and alkylated with a solution of 55 mM iodoacetamide in 25 mM NH_4HCO_3 for 45 min at room temperature. After, the gel pieces were washed in 25 mM NH_4HCO_3 for 10 min by vigorous mixing, dehydrated in 25 mM NH_4HCO_3 /ACN solution (50 % [v/v]) and dried in a speed vacuum. For tryptic digestion, the gel pieces were incubated on ice for 15 min with 10 ng/µL trypsin solution (sequencing grade modified trypsin, Promega, Madison, WI, USA) followed by removal of the supernatant. A solution of 25 mM NH_4HCO_3 was added to the gel pieces followed by incubation at 37 °C for 16 h. The supernatant was placed into a clean tube and to the gel pieces it was added a solution containing trifluoroacetic acid (5 % [v/v]) and ACN (50 % [v/v]), for 10 min under vigorous mixing. Finally, gel pieces were sonicated for 3 min. The recovered supernatant was dried in a speed vacuum. ZipTip C18 pipetting tips (Millipore, Bedford, MA, USA) were used, according to manufacturer's instructions, to concentrate and purify small protein spots by reverse phase extraction.

MALDI-MS and MALDI-MS/MS analysis were performed on a MALDI-Synapt MSTM spectrometer (Waters-Micromass, Manchester, UK) operating in positive ion reflector

mode with a laser intensity of 250. The instrument was calibrated to an accuracy level of <10 ppm using a mixture of known standard synthetic peptides with an m/z range of 800 to 4000 Da. The instrument was set to acquire Peptide Mass Fingerprint (PMF) spectra, and peaks of sufficient intensity were automatically fragmented in the argon collision cell. Mass spectra were collected and processed using Mass Lynx (Waters-Micromass, Manchester, UK). The peak lists were created by ProteinLynx Global Server 2.2.5v (Waters). PMF data were searched against the NCBI non redundant database and matched with their corresponding proteins sequences using MASCOT (<http://www.matrixscience.com>).

The query for database searching was performed with 100 ppm as maximal tolerance, a single trypsin missed cleavage, carbamidomethylation of cysteine residues as fixed modification, and oxidation of methionine as variable modification. Each search was restricted to fungi. For confirmation of protein identification by PMF, the resulting MS/MS ion spectra were processed and converted into *.pkl files, and the peak list was again compared with the NCBI nonredundant database (fungi) with a peptide mass tolerance of ± 100 ppm and a fragment mass tolerance of 0.2-0.6 Da. For both MS and MS/MS, only proteins with statistical significance (p value < 0.05) as determined by the MASCOT algorithm were accepted as a protein sequence match. Analysis by MS/MS confirmed the proteins identified on the basis of the PMFs, validating the identifications. The ORF sequences of identified proteins were analyzed by using the Pedant-Pro Sequence Analysis Suite of Biomax GmbH (<http://pedant.gsf.de>.) and all identified proteins were categorized according Functional Catalogue (FunCat2).

In order to investigate the nature of the post-translational modifications (PTM) of the isoforms identified in this work, we performed a search in the *Paracoccidioides* structural genome database at the Broad Institute of MIT and Harvard (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/Paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html) to search the presence of more than one gene coding for a specific protein.

2.5. Enzymatic activities

The total catalase activity was measured by the Catalase Assay Kit (Sigma Aldrich, Co., St. Louis, MO), which measures reduction on the absorbance during the conversion of H₂O₂ to oxygen [23]. Catalase activity for each sample was calculated using a standard curve and one unit of activity was defined as the amount of enzyme that catalyzed the consumption of 1 μ mol of H₂O₂ per minute. The superoxide dismutase determination kit (Sigma Aldrich) measured superoxide dismutase enzymatic activity. In brief, the kit utilizes the water-soluble tetrazolium salt-WST-1 (2-[4-Iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-[2,4-disulfophenyl]-2H-tetrazolium, monosodium salt), which produces a water-soluble formazan dye upon reduction with O₂⁻, and the product can be determined by a colorimetric method at 440 nm. Cytochrome C oxidase activity was measured by a colorimetric assay based on observation of the decrease in absorbance at 550 nm of ferrocytochrome C oxidized by cytochrome C oxidase. To perform this activity assay it were employed the cytochrome C oxidase Assay Kit as described in

manufacturer's instructions (Sigma Aldrich). Glutathione S-transferase activity was determined by the glutathione S-transferase Assay Kit (Sigma Aldrich). This assay is based on the conjugation of L-glutathione to CDNB (1-Chloro-2,4-dinitrobenzene) through the thiol group of the glutathione by the action of glutathione S-transferase. The product of this reaction, GS-DNB Conjugate, absorbs at 340 nm and the rate of increase in the absorption is directly proportional to the enzyme activity in the sample. Enzymatic activities were performed in three independent replicates and statistical comparisons were performed using Student's *t*-test and sample with *p*-values < 0.05 were considered statistically significant.

2.6. Determination of protein expression by flow cytometry

Enolase, triosephosphate isomerase and malate synthase were employed in this assay by using polyclonal antibodies produced to the respective proteins [24-26]. Briefly, a total of 2×10^5 *Paracoccidioides* yeast cells upon oxidative stress were incubated for 30 min with cold methanol. After, the cells were washed three times with PBS 1x and incubated with PBS 1x containing Triton X-100 (0.25% [v/v]) for 15 min at room temperature. The cells were blocked for 30 min with PBS 1x containing BSA (5% [w/v]) and Tween 20 (0.1% [v/v]) at room temperature. In addition, yeast cells were washed three times with PBS 1x and incubated for 20 min at room temperature with the polyclonal antibodies: mouse anti-triosephosphate isomerase (diluted 1:100), mouse anti-malate synthase (diluted 1:100) and mouse anti-enolase (diluted 1:1000). Control cells were incubated with non-immunized mouse serum. After three washes with PBS 1x, the cells were incubated with anti-rabbit IgG coupled to fluorescein isothiocyanate (FITC; 1:100 dilution) for 20 min at room temperature. The flow cytometry assay was performed using a C6 Accuri flow cytometer (Accuri Cytometers, Ann Arbor, MI, USA) that was routinely operated at the Fast Flow Rate setting and a minimum of 5,000 cells per sample was acquired with the FL1-Hchannel. Data was collected and analyzed using FCS Express 4 Plus Research Edition software (Denovo Software, Los Angeles, CA, USA).

2.7. Interaction of *Paracoccidioides* with macrophage cells

J774 A.1 macrophage cells (Banco de Células do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil) were employed in the phagocytic assays. *Paracoccidioides* yeast cells were employed to infect macrophages, in a 5:1 ratio. The cells were co-cultivated for 24 h at 37°C in 5% CO₂ to allow fungi adhesion and internalization. Cells were rinsed twice with PBS 1x for removal of any non-internalized yeast cells. The wells were washed with distilled water to promote macrophages lyses. The suspensions were collected in individual tubes and centrifuged at 10,000 x g, 10 min, at 4 °C. The cells were submitted to RNA extraction.

2.8. Quantification of transcripts by RT-qPCR

Total RNA was extracted by using the Trizol Reagent (Invitrogen Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. A total of 1 µg of RNA was used to synthesize the first-strand cDNA by using the High Capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). The cDNA samples were diluted 1:5 in water, and RT-qPCR was performed

by using the SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) in the Step One Plus PCR System (Applied Biosystems Inc.). The data were normalized with transcript encoding α -tubulin amplified in each set of RT-qPCR experiments. A non-template control was also included to eliminate contamination or non-specific reaction. Samples of each cDNA were pooled and serially diluted 1:5 to generate a relative standard curve. Relative expression levels of the genes of interest were calculated using the standard curve method for relative quantification [27]. Statistical comparisons were performed by using Student's *t*-test and sample with *p*-values < 0.05 were considered statistically significant. The oligonucleotides used in RT-qPCR experiments were listed in Supplementary Table 1.

2.9. Determination of the intracellular NADPH/NADP⁺ ratio

In order to evaluate the redox state in *Paracoccidioides* yeast cells we employed the NADP⁺/NADPH Assay Kit (Abcam, Cambridge, UK) according to the manufacturer's instructions. Briefly, the *Paracoccidioides* cells were collected and washed with 1 ml of cold PBS 1x. The cells were resuspended in reaction buffer and the supernatants were used to perform the NADP⁺ and NADPH quantification. The quantifications were performed in 96 wells microplate reader at 450 nm. The concentrations of the pyridine nucleotides were obtained in three independent determinations and statistical comparisons were performed by using Student's *t*-test. Samples that present *p*-values < 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Proteomic analysis of yeast cells submitted to oxidative stress

In order to verify H₂O₂ effects on yeast cells viability it was performed assays using trypan blue as a vital dye. There were no significant differences in yeast cells viability up to 8 h of treatment with H₂O₂ (data not shown). Hence, we selected two incubation times, 2 and 6 h to perform early and late oxidative stress conditions, respectively.

The changes in protein profiles upon exposure of yeast cells to H₂O₂ were analyzed using 2-DE gel electrophoresis. The analysis employed three independent experiments of control and H₂O₂-treatment to early and late stress that generated three replicates and a total of 12 gels. Using the gel image software a total of 1,071 spots from early and late conditions were successfully matched between control and H₂O₂-treatments. As shown in Fig. 1, it is shown the presence of differences between control and H₂O₂-treatment as demonstrated in the 2-DE gels. Early and late stress conditions were analyzed and statistical analysis revealed differences in protein abundance for 102 and 77 protein/spots respectively, for early and late treatments, summing a total of 179 differentially regulated proteins. The early stress (Fig. 1A) allowed a match of 487 proteins/isoforms that were statistically analyzed. From the 487 proteins/isoforms detected in the 2-DE gels from the early treatment, it were identified 102 differentially expressed, and from those 75 spots with increased expression and 27 with decreased expression. The late stress analysis (Fig. 1B) revealed 584 spots matched in 2-DE

gels. Seventy-seven proteins/isoforms presented differences that were statistically significant and from those 41 proteins/isoforms presented increased expression rates and 36 proteins/isoforms with decreased expression rates.

Taking in account the early and late stress conditions, it was possible to identify 92 proteins/isoforms by both PMF and MS/MS; 60 proteins/isoforms were identified by PMF and 27 proteins/isoforms identified by MS/MS analysis. The analysis yielded a total of 179 proteins/isoforms successfully identified that are listed in Supplementary Table 2. The protein identification at the Broad Institute (database accession numbers-PAAG), experimental and theoretical isoelectric points (pI) and molecular weight (MW), as well as PMF and MS/MS mascot scores, p -value from statistical analysis and protein fold change observed after H_2O_2 -treatment are presented in Supplementary Table 2.

3.2. *Proteins induced and repressed by H_2O_2 -treatment*

All proteins/isoforms identified in this work, were listed according to the level of expression. Table 1 describes 116 up regulated proteins/isoforms that were related to various functional categories. Several antioxidant proteins, such as peroxisomal catalase isoforms, thioredoxin isoforms, superoxide dismutases, cytochrome C peroxidase and chaperones were significantly induced. Levels for peroxisomal catalase and thioredoxin increased from the first 2 h and continued at the 6 h treatment. Cu/Zn-superoxide dismutase (PAAG_02926.1) and Mn-superoxide dismutase (PAAG_04164.1) presented increased levels at early and late treatments, respectively. Three heat shock proteins (HSP70, HSP 90 and SSC1 protein) with potential chaperone activity were found to be part of the H_2O_2 -stress response machinery.

Members of the electron transport category such as cytochrome b2 were induced. All the enzymes required for the bypass reactions of gluconeogenesis were induced by the oxidative stress. Induced proteins showed the 6-phosphogluconate dehydrogenase that catalyzes the third, irreversible step of oxidative branch of the pentose phosphate pathway. In addition, in the non-oxidative part, transketolase and transaldolase were increased in early oxidative stress. In addition, enzymes of the biosynthesis of methionine, cysteine and sulfur were up regulated.

The expression of 63 proteins/isoforms was down regulated, as depicted in Table 2. This subset includes members of the tricarboxylic acid pathway in a total of 9 proteins, members of the heat shock response, as examples.

3.3. *An overview of the Paracoccidioides response to oxidative stress*

The *Paracoccidioides* response to oxidative stress, as revealed by proteomic analysis, is summarized in Fig. 2, that depicts the induction of the classical antioxidant enzymes such as peroxisomal catalase, superoxide dismutases, peroxidases and thioredoxins, as well as, the inducing of metabolic processes that increase the NAD(P)H in the cytoplasm. In this way, glycogen could be broken down to provide glucose 6-phosphate to the pentose phosphate pathway, to promote NADPH production, an electron source for the glutathione peroxidase system. Glutamate could be converted in α -ketoglutarate that could be oxidized to succinyl-

CoA rendering NADH. The electrons from the mitochondrial NADH can be transferred to cytosolic NAD by the action of the up regulated enzymes pyruvate carboxylase, malate dehydrogenase and phosphoenolpyruvate carboxykinase. Additionally, the fungus regulates some proteins probably to avoid endogenous ROS production. In this sense, the cytochrome C oxidase, branched-chain amino acid aminotransferase and fumarate reductase, are down regulated probably due to the fact these molecules can generate superoxide inside the cells [28]. Also, aconitase induction represents a mechanism to protect the microorganism against oxidative stress once this molecule is related to ROS response [29].

3.4. *In silico analysis of oxidoreductases*

Oxidoreductases are enzymes that catalyze redox reactions and this biochemical property may be important in response to oxidative stress. From 116 up regulated proteins/isoforms analyzed, it were identified a total of 34 that belong to the family of oxidoreductases, and are therefore possibly involved in the maintenance of the redox homeostasis during oxidative stress (Supplementary Table 3). Among these oxidoreductases, it was observed the presence of proteins with isoforms, such as, α -ketoglutarate dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase that presented five and four isoforms, respectively.

3.5. *Post-translational modifications analysis*

We found 30 redundant proteins (i.e., the same protein identified in several spots and encoded by the same gene), that may reflect PTM or proteolysis. To analyze PTM in redundant protein, we added the variable modifications when identifying the PMF spectra by NCBI database search, as follows: oxidation of histidine/tryptophan; acetylation of lysine; sulfonylation and phosphorylation of serine/tyrosine/tryptophan. From 30 proteins analyzed, 27 exhibited PTM as described in the Supplementary Table 4. The most common PTM identified in *Paracoccidioides* protein isoforms were phosphorylation of serine/tyrosine/tryptophan and oxidation of histidine/tryptophan.

3.6. *Confirmatory assays for protein differential expression*

Enzymatic activity was employed to confirm proteomic data. To perform enzymatic activity we selected catalases, superoxide dismutases, glutathione S-transferase and cytochrome C oxidase that were affected by the oxidative stress, as determined by 2-DE gel analysis. Enzymatic assays depicted a significant increase in catalases and superoxide dismutases activities at early and late treatments, as shown in Fig. 3A, panels a and b, respectively. The enzymes glutathione S-transferase and cytochrome C oxidase (Fig.3A, panels c and d, respectively) depicted decreased activities during late and early treatments respectively. All the enzymatic activities measurements were in agreement with the 2-DE gel analysis. Additionally, cytometry was used to determine the levels of the proteins triosephosphate isomerase (6 h), malate synthase (2 h) and enolase (6 h) after H₂O₂-treatment. The flow cytometry was accomplished using antibodies specific to the three proteins above affected by the H₂O₂-treatment, as demonstrated by the 2-DE gel analysis. The results were presented as the mean fluorescence intensity that was obtained by subtracting the fluorescence

of the treated cells from controls. The data revealed a significant increase in the level of triosephosphate isomerase, while malate synthase and enolase depicted decreased levels, as shown in Fig. 3B and Supplementary Table 5. The flow cytometry measurements were in agreement with the 2-DE gel analysis.

Also, transcriptional profiles were used in the confirmatory experiments. The transcriptional profiles of the peroxisomal catalase (PAAG_01454.1) and Mn-superoxide dismutase (PAAG_02926.1), were quantified by RT-qPCR in yeast cells submitted to early treatment and in yeast cells derived from infected macrophages as shown in Fig. 3C. The transcript level of peroxisomal catalase was highly increased in response to the H₂O₂-treatment. Of special note, the levels of both transcripts also were significantly up regulated in yeast cells derived from macrophages.

3.8. Measurement of the intracellular NADP⁺/NADPH concentrations

The intracellular concentrations of NADPH, NADP⁺ and NADP⁺/NADPH ratio in *Paracoccidioides* yeast cells were obtained, as described in material and methods. In agreement to the increased expression of enzymes of the pentose phosphate pathway at early H₂O₂-treatment, the amount of NADPH increased in yeast cells in comparison to the control, as depicted in Fig. 4.

4. Discussion

Pathogenic microorganisms develop a series of specific strategies for adaptation and to survival in the harsh environments of the host, such as scavenging of the H₂O₂, a toxic compound produced by macrophages that promotes oxidative stress[5, 13, 30]. In this sense, the objective of this study was to evaluate the response of *Paracoccidioides* to H₂O₂-treatment. We attempted to provide detailed reference maps of the adaptive response to early and late oxidative stress in *Paracoccidioides* yeast cells, by proteomic analysis. We identified 179 oxidative stress-responsive proteins/isoforms that were grouped by functional categorization. *Paracoccidioides* response was mainly performed by up regulated proteins/isoforms that represented a total of 64.8% of all proteins/isoforms identified in our proteomic analysis.

A successful pathogen must be able to overcome the complex array of ROS-mediated host defenses by production of ROS scavenging enzymes such as superoxide dismutases, thioredoxins, cytochrome C peroxidase and catalases. These enzymes are present in most organisms performing the important function of detoxifying ROS [4]. To resist highly oxidative stress, *Paracoccidioides* express not only antioxidant proteins to decompose ROS but also several chaperones to prevent the misfolding or unfolding of proteins under long term stress condition. The up regulation of ROS scavenging enzymes during the treatment of *Paracoccidioides* with H₂O₂ could be an indication of the involvement of enzymatic ROS scavenging enzymes in protecting the fungus from the general stress generated by host defense mechanisms. This fact is in agreement to the up regulation of the transcripts to the genes

encoding peroxisomal catalase and Mn-superoxide dismutase in yeast cells derived from infected macrophages, as here depicted.

Under long term oxidative stress, fungi reduce the glucose and ammonia uptake [31, 32]. In this way, it has been observed that several enzymes of the carbon metabolism characterized in the MIPS terms such as pentose phosphate pathway, gluconeogenesis, amino acid and nitrogen metabolism were responsive to the oxidative stress in *Paracoccidioides*. The key regulator of stress responses is a dynamic rearrangement of the metabolic flux to the pentose phosphate pathway leading to the generation of the reduced electron carrier NADPH. Neutralization of free radicals largely depends on NADPH and in order to control the cellular redox homeostasis during oxidative stress, the cells usually provides a potential reducing for most antioxidant and redox regulatory enzymes [33-35]. A satisfactory NADPH production is of pivotal importance in the maintenance of the thioredoxin-dependent elements of the antioxidant defense [33, 34]. Additionally, NADH producer enzymes such as members of the α -ketoglutarate dehydrogenase complex also were up regulated in response to oxidative stress. In this sense, *Paracoccidioides* yeast cells during the H_2O_2 -treatment, may transfer electrons from the mitochondrial NADH to cytosolic NAD by the action of the enzymes, such as pyruvate carboxylase, malate dehydrogenase and phosphoenolpyruvate carboxykinase. In fact, data corroborate that *Paracoccidioides* yeast cells possibly redirects the metabolic flux in order to restore the cellular redox potential by generation of the NAD(P)H in response to oxidative stress.

Analysis of the proteomic profiles suggested the up regulation of gluconeogenesis, as revealed by the presence of the three enzymes of the gluconeogenesis bypass, fructose 1,6 biphosphatase, phosphoenolpyruvate carboxykinase and pyruvate carboxylase. Under long-term, chronic oxidative stress, glucose uptake is reduced in fungi [32].

The biosynthesis of some amino acids is supposed to be induced during oxidative stress in *Paracoccidioides*. Sulfate adenyltransferase catalyzes the activation of sulfate ions by ATP to form adenosine-5' phosphosulfate, the first enzymatic step in sulfate utilization following its uptake. The sulfur containing amino acid biosynthetic pathways were represented by adenosylhomocysteinase and cobalamin-independent methionine synthase. The three-carbon amino acid serine is the precursor of the two-carbon glycine through removal of one carbon atom by serine hydroxymethyl transferase. Also glutamate dehydrogenase, which catalyzes the biosynthesis of glutamate, is induced in response to H_2O_2 -treatment. So, *Paracoccidioides* may be synthesizing cysteine, glycine and glutamate in order to provide amino acids building up glutathione that can be used in removing peroxides. The biosynthesis of cysteine was induced in *Aspergillus nidulans* upon long-term menadione exposure [36]. Additionally, increased abundance of glutamate dehydrogenase that allows assimilation of nitrogen and biosynthesis of glutamate when primary nitrogen sources are lacking, is consistent with previous findings that reduced ammonia uptake prevails during oxidative stress [32].

An important class of enzymes to the response to oxidative stress is the oxidoreductases. These enzymes contribute to maintain the cellular redox state by transferring electrons from the oxidant to reductant molecule. In silico analysis revealed 34 oxidoreductases, such as α -ketoglutarate dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase. In briefly, α -ketoglutarate dehydrogenase contributes to production of NADH [37] and during H_2O_2 -treatment in mammalian cells culture, this protein depicted antioxidant activity [38]. Similarly, the aldehyde dehydrogenases detoxify stress-generated aldehydes and help maintain the intracellular redox balance [39, 40].

To compare different times of H_2O_2 -treatment related to their impact on *Paracoccidioides* response, the accumulation of proteins was monitored at early and late treatment. The increased in expression of antioxidant proteins, such as peroxisomal catalase, thioredoxin and superoxide dismutases, starts at the early and continues at the late condition suggesting that *Paracoccidioides* cellular defense systems are effective at the entire H_2O_2 -treatment. In order to confirm the induction of these enzymes, we determined the catalase and superoxide dismutase activities at both times of H_2O_2 -treatment. The results from enzymatic activities corroborated proteomic data, indicating that the increased activities are important to protect *Paracoccidioides* yeast cells against the oxidative stress caused by H_2O_2 -treatment. The response of *Aspergillus niger* to oxidative stress also revealed to be time dependent. The activity of enzymes involved in H_2O_2 -detoxification were increased during oxidative stress [41].

The oxidative stress induced regulation of NADPH production that increased in the early time of H_2O_2 -treatment, putatively due to a metabolic shift to the pentose phosphate pathway, that depicted enzymes induced at this time. Additionally, the increased $NADP^+/NADPH$ ratio may be due to NADPH-consuming defense mechanisms such as catalases and superoxide dismutases that were more active during oxidative stress. These ROS-detoxifying enzymes are important in nullifying oxidative stress; the efficacy of these enzymes depends on the reductive environment promoted by NADPH. *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas fluorescens* under oxidative stress also evoked a metabolic adaptation favoring the increase of NADPH synthesis, in agreement with our data [42, 43].

In the present study, we described an adaptive response of *Paracoccidioides* to oxidative stress. This fungus presented a prominent activation of antioxidant enzymes and a rearrangement of the metabolism, observed by activation of pathways to provide NAD(P)H, an reducer substrate used to minimize oxidative effects caused by H_2O_2 -treatment. Additionally, the fungus seems to shift the metabolism to the production of glucose by gluconeogenesis and to the production of amino acids important to compose the repertoire of molecules to the oxidative stress response.

Acknowledgments

This work at Universidade Federal de Goiás was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (process numbers 558923/2009-7, 563398/2010-5 and 473277/2011-5) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás- FAPEG.

Figures

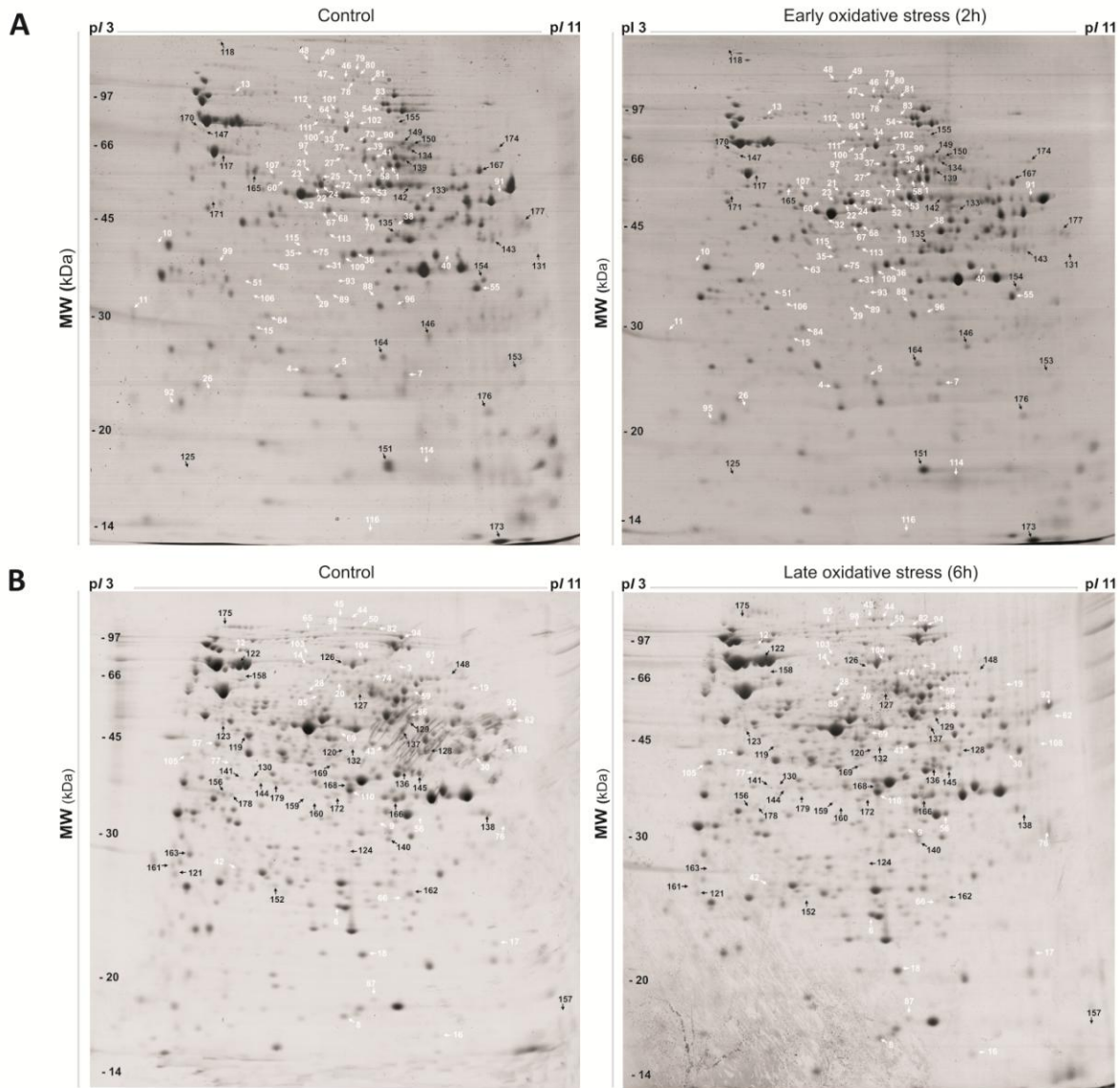


Figure 1. The protein expression patterns in *Paracoccidioides*, Pb01 subjected to oxidative stress. *Paracoccidioides* yeast cells were submitted to oxidative stress caused by H₂O₂-treatment. Proteins were obtained, fractionated by two dimensional gel electrophoresis and stained by Coomassie brilliant blue. The gels were obtained in triplicate; a representative gel of each triplicate is shown. A) Representative gel obtained after 2 h of oxidative stress (early condition). B) Representative gel obtained after 6 h of oxidative stress (late condition). White and black arrows indicate up-regulated and down-regulated proteins, respectively. Identified protein spots are numbered and listed in supplementary Table 2. The pH gradient is marked above the gel and the molecular mass protein standards (kDa) are indicated on the left of the gel.

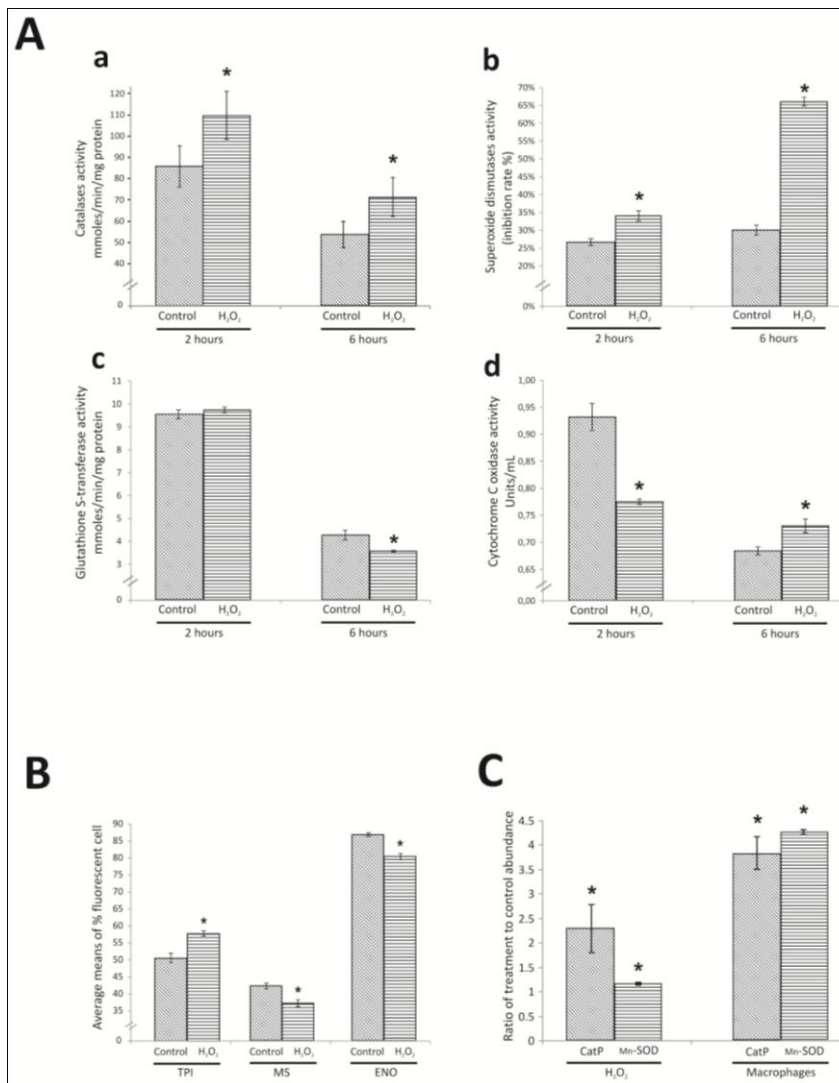


Figure 3. Enzymatic activity, flow cytometry and quantitative real-time reverse transcription analysis confirm proteomic data of *Paracoccidioides* yeast cells during oxidative stress. A) Activity assays of the catalases (a), superoxide dismutases (b), glutathione S-transferase (c) and cytochrome C oxidase (d) in response to early (2 h) and late (6 h) oxidative stress. B) Flow cytometry detection of triosephosphate isomerase (TPI), malate synthase (MS) and enolase (ENO). *Paracoccidioides* yeast cells were incubated in the absence and presence of 2 mM H₂O₂ for 2 h (MS) or 6 h (TPI and ENO). The cells were fixed and labeled by using specific primary polyclonal antibodies, followed by the secondary antibody FITC anti-mouse IgG. C) Transcriptional response to oxidative stress of yeast cells derived from H₂O₂-treatment for 2 h or derived from infected macrophages. Data were obtained by RT-qPCR and were presented as ratio of treatment to control abundance of transcripts. All data, shown in this figure, were analyzed by Student's *t*-test. Error bars correspond to the standard deviation of measurements performed in triplicate and asterisks indicate differences in expression with statistical significance ($p < 0.05$).

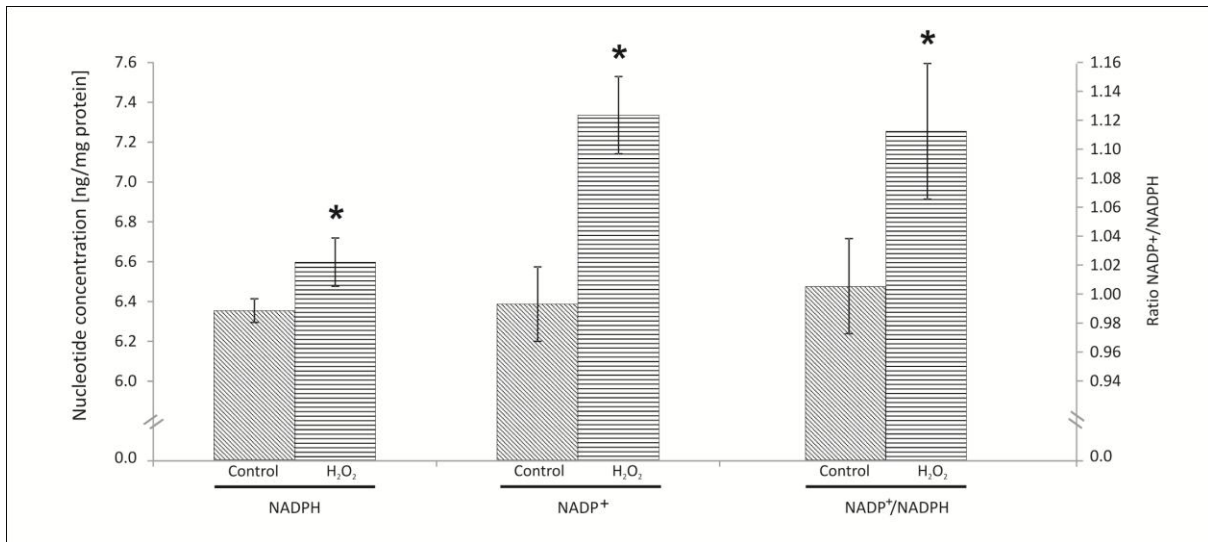


Figure 4. Intracellular concentrations of NADP⁺, NADPH and NADP⁺/NADPH ratio in *Paracoccidioides* yeast cells under early oxidative stress. Experiments were performed as described in materials and methods. Student's *t*-test was used for statistical comparisons. Error bars represent standard deviation from three replicates while * represents statistical significance ($p < 0.05$).

Table 1- *Paracoccidioides* yeast cells proteins with increased expression, upon 2 and 6 hours of H₂O₂ treatment and their predicted biological function -FunCat2*

Time ^a	Spot ^b	Protein Identification	Accession number	Exp. MW/pI ^c	Theo. MW/pI ^d	PMF	MS/MS	<i>p</i> -value ^g	Protein fold change ^h
						Score/Matched mass ^e	Score/Matched peptides ^f		
Cell rescue, defense and virulence									
2 h	1	Peroxisomal catalase	PAAG_01454.1	57.00/7.87	57.65/6.42	217/25	48/2	0.0010	1.71
2 h	2	Peroxisomal catalase	PAAG_01454.1	58.33/7.46	57.65/6.42	193/28	-	0.000008	2.17
6 h	3	Peroxisomal catalase	PAAG_01454.1	65.77/8.25	57.47/ 6.50	88/29	-	0.0464	1.61
2 h	4	Thioredoxin	PAAG_07772.1	24.16/6.47	23.75/6.21	108/9	56/2	0.0049	2.18
2 h	5	Thioredoxin	PAAG_07772.1	24.50/6.94	23.61/6.21	101/15	119/4	0.0275	1.53
6 h	6	Thioredoxin	PAAG_07772.1	23.88/7.34	23.61/6.21	145/17	-	0.0359	1.47
2 h	7	Cu/Zn-Superoxide dismutase	PAAG_02926.1	24.00/8.18	28.02/9.17	78/14	78/2	0.0276	1.81
6 h	8	Mn-Superoxide dismutase	PAAG_04164.1	16.00/7.45	15.97/5.92	117/8	82/2	0.0412	3.41
6 h	9	Cytochrome C peroxidase	PAAG_03292.1	32.00/7.95	41.74/8.84	123/21	71/3	0.0191	1.58
2 h	10	DNA damage checkpoint protein rad24	PAAG_00773.1	39.16/4.09	32.48/4.74	118/22	-	0.0017	1.94
2 h	11	Heat shock protein 70	PAAG_08003.1	29.16/4.41	70.91/5.08	95/41	135/3	0.0129	1.63
6 h	12	Heat shock protein 90	PAAG_05679.1	76.88/5.46	80.32/4.96	79/46	-	0.0232	2.13
2 h	13	Heat shock protein SSC1	PAAG_01339.1	92.50/5.30	73.82/5.92	-	82/4	0.0031	1.64
6 h	14	Heat shock protein SSC1	PAAG_01339.1	67.00/6.73	73.82/5.92	86/25	122/8	0.0492	2.94
2 h	15	Haloacid Dehalogenase (HAD) - superfamily hydrolase	PAAG_00503.1	28.83/5.71	27.32/5.67	83/16	-	0.0023	2.17
6 h	16	Alkyl hydroperoxide reductase subunit C/ thiol specific antioxidant (AhpC/TSA family protein)	PAAG_05061.1	14.77/9.03	20.02/9.75	79/10	-	0.0076	3.35
6 h	17	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase H	PAAG_01778.1	19.66/10.0	20.02 /8.80	146/16	200/7	0.0179	2.97
6 h	18	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A2	PAAG_05788.1	19.66/7.76	26.49/8.46	102/12	88/3	0.0062	1.73
6 h	19	T-complex protein 1 subunit delta	PAAG_01727.1	54.77/9.41	54.66/ 9.04	-	68/2	0.0364	1.99
6 h	20	T-complex protein 1 subunit eta	PAAG_07851.1	59.11/7.31	61.64/6.02	74/22	47/2	0.00003	6.34
2 h	21	Betaine aldehyde dehydrogenase	PAAG_05392.1	54.50/6.58	51.70/5.84	75/27	74/2	0.0076	2.92
2 h	22	Aldehyde dehydrogenase	PAAG_05249.1	52.33/6.49	54.55/5.87	182/25	168/6	0.0029	2.75
2 h	23	Aldehyde dehydrogenase	PAAG_05249.1	51.66/6.64	54.55/5.87	85/28	-	0.0018	1.68
2 h	24	Aldehyde dehydrogenase	PAAG_05249.1	51.66/6.75	54.69/5.92	219/30	177/6	0.0092	1.34

2 h	25	Aldehyde dehydrogenase	PAAG_05249.1	53.50/6.71	54.69/5.92	89/28	100/3	0.0108	1.63
2 h	26	3-demethylubiquinone-9 3-methyltransferase	PAAG_06595.1	21.83/4.96	22.41/4.93	-	79/2	0.0112	1.68
Energy									
<i>Electron transport and membrane-associated energy conservation</i>									
2 h	27	Cytochrome b2	PAAG_01603.1	59.16/7.09	57.21/6.00	101/15	-	0.0362	1.45
6 h	28	Vacuolar ATP synthase subunit β	PAAG_06288.1	54.13/6.72	56.21/ 5.59	-	65/3	0.0458	2.15
2 h	29	12-oxophytodienoate reductase	PAAG_03631.1	32.66/6.66	43.24/8.69	-	128/5	0.0151	2.82
6 h	30	12-oxophytodienoate reductase	PAAG_03631.1	41.00/9.67	43.24/ 8.69	159/29	237/6	0.0046	3.02
<i>Pentose-phosphate pathway</i>									
2 h	31	Transaldolase	PAAG_04166.1	36.16/6.77	35.86/6.17	179/24	139/6	0.0003	2.40
2 h	32	6-phosphogluconate dehydrogenase	PAAG_01178.1	54.50/6.33	54.58/5.77	189/37	-	0.0003	2.77
2 h	33	Transketolase	PAAG_04444.1	68.33/7.01	74.95/5.97	126/29	-	0.0026	2.64
2 h	34	Transketolase	PAAG_04444.1	67.83/7.14	74.95/5.97	136/33	-	0.0002	1.58
<i>Glycolysis and gluconeogenesis</i>									
2 h	35	Fructose 1.6-bisphosphatase	PAAG_02682.1	40.83/6.50	38.97/5.80	74/15	-	0.0369	1.99
2 h	36	Fructose 1.6-biphosphate aldolase 1	PAAG_01995.1	38.66/7.30	39.72/6.14	183/25	136/4	0.0392	2.16
2 h	37	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	PAAG_08203.1	61.16/7.27	63.89/6.10	82/35	-	0.0216	2.71
2 h	38	Phosphoglycerate kinase	PAAG_02869.1	44.83/8.00	45.22/6.48	160/30	65/3	0.0325	1.76
2 h	39	Pyruvate kinase	PAAG_06380.1	60.83/7.47	59.48/6.31	98/38	-	0.0092	1.81
2 h	40	Alcohol dehydrogenase	PAAG_00403.1	38.16/8.93	38.00/7.55	170/29	152/5	0.0097	2.99
2 h	41	Phosphoglucomutase	PAAG_02011.1	58.83/7.62	87.61/7.04	78/15	-	0.0006	2.14
6 h	42	Triosephosphate isomerase	PAAG_02585.1	26.55/5.63	27.15/ 5.39	175/20	215/5	0.0467	1.33
6 h	43	Phosphoglycerate kinase	PAAG_02869.1	41.33/8.08	45.31/6.48	108/32	-	0.0213	1.72
6 h	44	Pyruvate carboxylase	PAAG_00726.1	106.7/7.48	131.91/6.14	253/64	131/6	0.0121	2.78
6 h	45	Pyruvate carboxylase	PAAG_00726.1	107.4/7.33	132.01/6.14	100/61	-	0.0472	2.25
<i>Tricarboxylic-acid pathway</i>									
2 h	46	α -ketoglutarate dehydrogenase E1	PAAG_02732.1	104.00/7.1	121.63/6.68	137/48	-	0.0134	2.36
2 h	47	α -ketoglutarate dehydrogenase E1	PAAG_02732.1	104.00/7.0	121.63/6.68	144/73	35/2	0.0001	5.35
2 h	48	α -ketoglutarate dehydrogenase E1	PAAG_02732.1	117.83/6.5	121.63/6.90	78/45	49/2	0.0302	1.99
2 h	49	α -ketoglutarate dehydrogenase E1	PAAG_02732.1	117.50/6.7	121.70/6.90	88/48	-	0.0069	1.85
6 h	50	α -ketoglutarate dehydrogenase E1	PAAG_02732.1	96.44/7.62	121.63/6.68	-	128/8	0.0167	2.52
2 h	51	Pyruvate dehydrogenase E1- β	PAAG_01534.1	35.16/5.40	41.04/8.11	96/16	50/2	0.0004	2.51
2 h	52	Pyruvate dehydrogenase E3	PAAG_03330.1	51.50/7.35	55.43/6.24	105/32	33/1	0.0006	2.24
2 h	53	Pyruvate e dehydrogenase E3	PAAG_03330.1	51.83/7.55	55.43/8.02	202/44	-	0.0076	2.70

2 h	54	Aconitase	PAAG_05048.1	80.3/7.64	82.47/ 7.03	265/44	317/13	0.0076	4.67
2 h	55	Malate dehydrogenase	PAAG_00053.1	34.66/8.73	36.02/8.99	175/24	292/7	0.0251	6.15
6 h	56	Malate dehydrogenase	PAAG_00053.1	33.00/8.64	36.02/8.99	251/30	160/4	0.0343	1.82
6 h	57	Succinyl-CoA ligase subunit β	PAAG_01463.1	41.11/5.19	48.56/5.61	142/44	159/9	0.0425	1.31
<i>Glyoxylate cycle</i>									
2 h	58	Isocitrate lyase	PAAG_06951.1	56.66/7.70	60.14/6.79	112/36	-	0.0041	2.50
6 h	59	Isocitrate lyase	PAAG_06951.1	56.88/8.45	60.17/6.79	354/48	144/9	0.0164	5.52
Metabolism									
<i>Lipid, fatty acid and isoprenoid metabolism</i>									
2 h	60	ATP citrate lyase	PAAG_05151.1	53.16/6.26	52.95/5.99	80/24	60/3	0.0120	1.62
6 h	61	ATP-citrate synthase subunit 1	PAAG_05150.1	67.00/8.89	72.41/ 8.00	96/53	-	0.0037	1.91
6 h	62	Acyl-CoA dehydrogenase	PAAG_00435.1	46.77/10.3 6	48.54/9.13	131/39	115/6	0.0240	1.78
2 h	63	2-methylisocitrate lyase	PAAG_04549.1	38.66/5.88	67.25/8.73	-	60/3	0.0083	1.29
<i>C-compound and carbohydrate metabolism</i>									
2 h	64	Glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase	PAAG_00850.1	73.83/6.95	76.77/ 6.51	-	55/4	0.0404	1.29
6 h	65	Glycogen phosphorylase	PAAG_00545.1	92.88/6.72	100.10/ 5.58	157/65	110/6	0.0275	1.48
6 h	66	Lactam utilization protein- lamB	PAAG_02162.1	24.66/8.48	28.35/6.50	86/14	-	0.0236	2.16
<i>Amino acid, nitrogen, sulfur and selenium metabolism</i>									
2 h	67	Adenosylhomocysteinase	PAAG_02859.1	47.00/6.78	49.02/5.83	170/33	176/5	0.0100	3.97
2 h	68	Adenosylhomocysteinase	PAAG_02859.1	47.00/6.89	49.51/5.93	187/33	99/7	0.0077	3.36
6 h	69	Adenosylhomocysteinase	PAAG_02859.1	43.66/7.32	49.51/5.93	104/37	-	0.0130	2.93
2 h	70	O-acetylhomoserine (thiol)-lyase	PAAG_08100.1	46.16/7.48	46.99/6.24	142/21	-	0.0247	2.21
2 h	71	Sulfate adenylyltransferase	PAAG_05929.1	57.00/7.20	64.11/6.26	131/30	169/6	0.0462	1.57
2 h	72	Sulfate adenylyltransferase	PAAG_05929.1	52.16/6.95	64.11/6.26	-	106/4	0.0421	1.86
2 h	73	Sulfate adenylyltransferase	PAAG_05929.1	64.33/7.34	64.11/6.26	96/29	-	0.0050	2.62
6 h	74	Sulfate adenylyltransferase	PAAG_05929.1	62.88/7.84	64.11/ 6.26	178/40	64/4	0.0442	1.72
2 h	75	2-nitropropane dioxygenase	PAAG_01321.1	39.00/6.58	37.74/6.01	102/12	119/4	0.0078	2.62
6 h	76	2-nitropropane dioxygenase	PAAG_04233.1	33.66/10.0	35.77/8.96	-	53/1	0.0466	6.80
6 h	77	2-nitropropane dioxygenase	PAAG_06693.1	38.66/5.46	38.80/5.40	109/17	-	0.0468	2.06
2 h	78	NAD-specific glutamate dehydrogenase	PAAG_01002.1	103.00/7.27	126.56/6.08	76/77	-	0.0001	1.96
2 h	79	NAD-specific glutamate dehydrogenase	PAAG_01002.1	108.00/7.26	126.56/6.08	157/31	100/5	0.0005	2.75
2 h	80	NAD-specific glutamate dehydrogenase	PAAG_01002.1	40.03/7.34	121.10/6.12	114/72	63/5	0.0286	1.75
2 h	81	Glycine dehydrogenase	PAAG_01568.1	53.00/7.54	117.40/6.89	114/39	-	0.0029	1.75

6 h	82	Glycine dehydrogenase	PAAG_01568.1	95.00/7.90	117.42/ 7.02	-	134/6	0.0315	1.91
2 h	83	Cobalamin-independent methionine synthase	PAAG_07626.1	86.50/7.58	85.40/6.33	113/20	146/5	0.0254	2.35
2 h	84	Chorismate mutase	PAAG_05198.1	29.66/5.92	28.57/5.80	160/32	64/2	0.0028	1.89
6 h	85	Acetamidase	PAAG_04596.1	54.50/6.99	59.28/5.80	122/30	109/4	0.0287	2.72
6 h	86	Serine hydroxymethyltransferase	PAAG_08512.1	48.13/8.48	58.92/8.56	165/28	-	0.0357	1.93
<i>Biosynthesis of vitamins, cofactors, and prosthetic groups</i>									
6 h	87	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase	PAAG_00851.1	16.88/7.94	18.59/6.30	102/16	-	0.0036	2.80
<i>Pyrimidine nucleotide/nucleoside/nucleobase metabolism</i>									
2 h	88	Ribose-phosphate pyrophosphokinase	PAAG_02633.1	32.50/7.71	35.40/6.56	124/20	103/3	0.0021	2.49
2 h	89	S-methyl-5-thioadenosine phosphorylase	PAAG_01302.1	33.50/6.82	34.29/6.04	75/15	180/5	0.0387	2.37
2 h	90	Bifunctional purine biosynthesis protein ADE17	PAAG_00731.1	63.83/7.61	64.93/7.18	154/44	112/5	0.0339	1.47
Protein synthesis									
2 h	91	Elongation factor 1- α	PAAG_02024.1	52.33/9.71	50.55/9.24	-	88/2	0.0474	3.24
6 h	92	Elongation factor 1- α	PAAG_02024.1	49.50/10.3	50.55/9.24	142/31	73/4	0.0271	2.11
2 h	93	Elongation factor 2	PAAG_00594.1	34.50/6.99	94.15/6.46	-	174/6	0.0205	2.29
6 h	94	Elongation factor 2	PAAG_00594.1	88.63/8.46	94.15/ 6.36	176/39	230/9	0.0226	4.41
2 h	95	Eukaryotic translation initiation factor 1A	PAAG_06140.1	21.16/4.41	17.32/ 4.90	-	142/4	0.0095	1.66
2 h	96	Eukaryotic translation initiation factor 4E-1	PAAG_09045.1	31.33/7.94	27.06/6.46	86/13	-	0.0037	2.88
2 h	97	Seryl-tRNA synthetase	PAAG_08702.1	58.16/6.59	56.48/5.77	-	46/2	0.00002	2.62
6 h	98	Polyadenylate binding protein	PAAG_00244.1	90.50/7.23	86.91/6.31	198/51	-	0.0098	3.24
2 h	99	60S acidic ribosomal protein P0 lyase	PAAG_00801.1	36.50/5.10	33.69/5.09	136/20	114/3	0.0025	1.58
2 h	100	Arginyl-tRNA synthetase	PAAG_00150.1	69.66/6.84	81.89/7.89	90/57	-	0.0018	1.95
Protein fate									
2 h	101	Thimet oligopeptidase	PAAG_03719.1	80.83/7.01	95.59/6.15	198/48	174/5	0.0178	1.42
2 h	102	Dipeptidyl peptidase III	PAAG_07467.1	72.00/7.37	86.54/7.99	98/44	-	0.0179	1.94
6 h	103	Dipeptidyl peptidase III	PAAG_07467.1	72.88/6.77	86.54/7.99	156/50	66/4	0.0220	1.48
6 h	104	Dipeptidyl peptidase III	PAAG_07467.1	93.81/7.64	86.54/ 7.99	197/48	57/4	0.0102	2.30
6 h	105	ran-specific GTPase-activating protein	PAAG_02466.1	39.89/4.64	18.34/5.29	-	40/1	0.0006	2.30
2 h	106	Vesicular-fusion protein sec17	PAAG_06233.1	32.50/5.60	32.72/5.35	78/22	-	0.0032	2.03
2 h	107	rab GDP-dissociation inhibitor	PAAG_06344.1	55.16/5.69	52.53/5.44	182/33	-	0.0362	1.52

6 h	108	NIPSNAP family protein	PAAG_05960.1	41.55/10.1	46.12/ 9.05	175/33	90/4	0.0547	3.40
Biogenesis of cellular components									
2 h	109	Arp2/3 complex subunit Arc16	PAAG_03624.1	38.33/7.11	36.15/5.87	86/15	133/4	0.0027	3.28
6 h	110	Arp2/3 complex subunit Arc16	PAAG_03624.1	35.55/7.49	36.15/ 5.87	86/17	179/5	0.0099	1.31
2 h	111	1,4- α -glucan branching enzyme	PAAG_08038.1	74.50/6.71	80.33/5.79	74/36	-	0.0081	2.56
2 h	112	1,4- α -glucan branching enzyme	PAAG_08038.1	78.16/6.61	80.33/5.79	106/33	-	0.0405	2.53
2 h	113	Mannitol-1-phosphate dehydrogenase	PAAG_06473.1	42.00/6.86	43.10/5.73	138/22	101/3	0.0028	3.39
Cell cycle and DNA processing									
2 h	114	ssDNA binding protein	PAAG_07296.1	14.92/10.06	16.50/8.58	188/17	141/5	0.0362	5.39
Unclassified									
2 h	115	Conserved hypothetical protein	PAAG_00335.1	41.66/6.46	40.91/5.89	-	36/2	0.0045	2.04
2 h	116	Hypothetical protein	PAAG_06752.1	13.33/7.59	11.47/9.69	-	76/2	0.0003	2.97

^a Time in oxidative stress condition

^b Spots numbers refer to figure 1

^c Experimental molecular weight / isoelectric point

^d Theoretical molecular weight / isoelectric point

^e Number of mass values matched (%)

^f Number of peptides values matched (%)

^g *p* values were accessed by Student's *t*-test

^h The ratio of protein abundance (percentage / volume) relative to control

*Functional classification by FunCat2 (http://pedant.helmholtz-muenchen.de/pedant3htmlview/pedant3view?Method=analysis&Db=p3_r48325_Par_bras_i_Pb01)

Table 2 - *Paracoccidioides* yeast cells proteins with decreased expression, upon 2 and 6 hours of H₂O₂-treatment and their predicted biological function -FunCat2*

Time ^a	Spot ^b	Protein Identification	Accession number	Exp. MW/pI ^c	Theo. MW/pI ^d	PMF	MS/MS	<i>p</i> -value ^g	Protein fold change ^h
						Score/Matched mass ^e	Score/Matched peptides ^f		
<i>Tricarboxylic-acid pathway</i>									
6 h	130	Pyruvate dehydrogenase complex component Pdx1	PAAG_00666.1	36.66/5.80	31.68/5.44	80/17	-	0.0473	1.81
2 h	131	Pyruvate dehydrogenase E3	PAAG_03330.1	39.66/10.43	56.06/8.27	-	94/2	0.0069	2.92
6 h	132	Pyruvate dehydrogenase E1- α	PAAG_08295.1	41.44/7.53	45.31/8.62	154/33	89/5	0.0343	1.80
2 h	133	Fumarate hydratase	PAAG_00588.1	49.00/8.48	60.71/9.07	-	55/2	0.0435	1.31
2 h	134	Fumarate reductase	PAAG_04851.1	62.16/8.21	68.04/6.90	167/50	94/4	0.0024	2.00
2 h	135	Isocitrate dehydrogenase subunit 2	PAAG_07729.1	42.16/8.03	41.85/8.75	80/29	-	0.0014	1.40
6 h	136	Isocitrate dehydrogenase subunit 2	PAAG_07729.1	38.44/8.45	37.40/9.51	105/32	97/4	0.0286	1.85
6 h	137	Citrate synthase	PAAG_08075.1	43.11/8.48	52.20/8.75	78/28	-	0.0395	1.61
6 h	138	Malate dehydrogenase	PAAG_00053.1	33.33/9.77	36.03/9.25	199/27	-	0.0347	5.03
<i>Glyoxylate cycle</i>									
2 h	139	Malate synthase	PAAG_04542.1	58.50/8.14	61.02/6.94	238/56	113/5	0.0028	3.76
Metabolism									
<i>C-compound and carbohydrate metabolism</i>									
6 h	140	Sorbitol utilization protein SOU2	PAAG_04181.1	33.11/8.17	31.48/7.05	-	89/2	0.0244	1.85
6 h	141	Aldose 1-epimerase	PAAG_03243.1	36.77/5.64	21.26/11.32	78/22	57/2	0.0391	1.69
<i>Lipid, fatty acid and isoprenoid metabolism</i>									
2 h	146	Enoyl-CoA hydratase	PAAG_06309.1	27.50/8.59	32.11/8.89	94/19	134/7	0.0409	2.78
2 h	147	Enoyl-CoA hydratase	PAAG_06309.1	64.50/4.87	31.57/8.87	121/23	439/11	0.0027	1.56
6 h	148	Carnitine O-acetyltransferase	PAAG_06224.1	62.77/9.19	69.88/8.21	124/27	81/4	0.0372	1.48
<i>Pyrimidine nucleotide/nucleoside/nucleobase metabolism</i>									
2 h	149	Bifunctional purine biosynthesis protein ADE17	PAAG_00731.1	64.50/8.12	64.93/7.18	130/34	-	0.0016	2.53
2 h	150	Bifunctional purine biosynthesis protein ADE17	PAAG_00731.1	64.16/8.30	67.20/6.70	108/31	274/8	0.0033	2.93
2 h	151	Nucleoside diphosphate kinase	PAAG_04291.1	17.16/7.91	16.90/6.84	77/4	-	0.0356	1.34
6 h	152	Uracil phosphoribosyltransferase	PAAG_06643.1	25.33/6.24	24.78/5.96	86/11	-	0.0205	1.43

Protein synthesis

2 h	153	60S ribosomal protein L9	PAAG_00347.1	25.33/10.19	21.82/9.54	92/16	-	0.0169	3.64
2 h	154	40S ribosomal protein S3	PAAG_01785.1	34.83/9.46	29.76/8.91	-	142/3	0.0246	2.21
2 h	155	Lysyl-tRNA synthetase	PAAG_08172.1	74.50/7.96	69.80/5.88	193/49	280/11	0.0069	1.93
6 h	156	60S acidic ribosomal protein P0 lyase	PAAG_00801.1	34.88/5.26	33.76/5.02	149/21	105/3	0.0303	2.81
6 h	157	40S ribosomal protein S19	PAAG_05778.1	17.33/10.99	16.22/9.81	87/17	-	0.0391	1.60

Protein fate

6 h	158	Leukotriene A-4 hydrolase	PAAG_08994.1	59.25/5.58	69.90/5.31	80/33	-	0.00006	1.50
6 h	159	Metallophosphoesterase domain-containing protein	PAAG_00265.1	34.88/6.73	35.23/5.85	93/31	-	0.0054	2.45
6 h	160	Metallophosphoesterase domain-containing protein	PAAG_00265.1	34.44/6.86	29.75/5.88	72/20	-	0.0471	1.72
6 h	161	Proteasome subunit alpha type	PAAG_03687.1	26.82/4.79	27.33/4.37	118/26	121/5	0.0031	2.86
6 h	162	Proteasome subunit beta type	PAAG_01150.1	31.44/6.39	25.11/8.59	-	49/2	0.0147	4.65
6 h	163	Ubiquitin C-terminal hydrolase	PAAG_02254.1	27.11/5.01	28.00/4.73	90/17	63/3	0.0226	5.74
2 h	164	GTP-binding nuclear protein GSP1/Ran*	PAAG_04651.1	25.83/7.81	24.05/6.90	190/6	-	0.0198	1.35
2 h	165	rab GDP-dissociation inhibitor	PAAG_06344.1	54.16/6.01	52.53/5.44	118/37	48/2	0.0003	5.15

Cellular communication/signal transduction mechanism

6 h	166	G-protein complex beta subunit CpcB	PAAG_06996.1	34.77/8.28	35.48/ 6.59	229/20	266/8	0.0001	3.16
-----	-----	-------------------------------------	--------------	------------	-------------	--------	-------	--------	------

Biogenesis of cellular components

2 h	167	UTP-glucose-1-phosphate urydyltransferase	PAAG_06817.1	56.33/9.39	52.90/9.07	178/27	179/7	0.0413	1.28
6 h	168	Arp2/3 complex subunit Arc16	PAAG_03624.1	36.33/7.49	36.15/ 5.87	-	85/3	0.0167	1.45
6 h	169	Mannitol-1-phosphate 5-dehydrogenase	PAAG_06473.1	38.89/7.21	43.10/5.73	104/19	-	0.0147	1.77

Transcription

2 h	170	RNA-processing protein	PAAG_03277.1	66.33/4.80	68.46/5.04	78/35	-	0.0047	2.09
2 h	171	ATP-dependent RNA helicase eIF4A	PAAG_00689.1	48.16/5.02	45.01/5.14	192/32	436/13	0.0391	1.39
6 h	172	Nucleic acid-binding protein	PAAG_04814.1	35.22/7.30	30.53/9.20	166/19	120/5	0.0175	2.76

Cell cycle and DNA processing

2 h	173	ssDNA binding protein	PAAG_07296.1	13.16/9.28	14.97/10.06	156/14	63/3	0.0345	1.41
2 h	174	Nuclear segregation protein-Bfr1	PAAG_02186.1	61.33/9.68	56.59/9.01	185/93	246/7	0.0059	2.69

6 h	175	Cell division cycle protein	PAAG_05518.1	101.44/5.23	90.56/4.98	212/85	-	0.0299	3.05
Unclassified									
2 h	176	Conserved hypothetical protein	PAAG_00340.1	21.16/9.54	19.20/8.61	75/13	84/5	0.0277	1.56
2 h	177	Conserved hypothetical protein	PAAG_02068.1	44.66/10.1	34.80/9.64	149/23	266/8	0.00006	4.00
6 h	178	Conserved hypothetical protein	PAAG_02836.1	34.77/5.38	35.25/5.29	-	111/4	0.0231	3.10
6 h	179	DUF833 domain-containing protein	PAAG_06515.1	36.33/6.19	35.55/5.50	73/10	-	0.0357	1.58

^a Time in oxidative stress condition

^b Spots numbers refer to figure 1

^c Experimental molecular weight / isoelectric point

^d Theoretical molecular weight / isoelectric point

^e Number of mass values matched (%)

^f Number of peptides values matched (%)

^g *p* values were accessed by Student's *t*-test

^h The ratio of protein abundance (percentage / volume) relative to control

*Functional classification by FunCat2 (http://pedant.helmholtz-muenchen.de/pedant3htmlview/pedant3view?Method=analysis&Db=p3_r48325_Par_bra1_Pb01)

Supplementary Table 1. Oligonucleotides used in RT-qPCR

Gene	Nucleotide sequence (5'-3')	Accession number
Superoxide dismutase (Mn-SOD)	F: ACTGCGCAAGTTATGATGGAA	XP_002795450.1
	R: CACGGAAGGGTCCATTTTC	
Peroxisomal catalase	F: AGGTGCAGGAGCTTACGGTG	XP_002796446.1
	R: CCCAATTTCTTGCTCGGTG	
Tubulin alpha	F: ACAGTGCTTGGA ACTATAACC	XP_002796639.1
	R: GGGACATATTTGCCACTGCC	

The gene sequences were obtained from the Broad Institute of MIT and Harvard (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/Paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html).

F: Forward primer; R: Reverse primer.

Supplementary Table 2 – *Paracoccidioides* yeast cells proteins induced or repressed by oxidative stress as identified by MALDI-Q-TOF-MS and/or MALDI-Q-TOF-MS/MS

Time ^a	Spot ^b	Protein Identification	Accession number	Exp. MW/pI ^c	Theo. MW/pI ^d	PMF	MS/MS	<i>p</i> -value ^g	Protein fold change ^h
						Score/Matched mass ^e	Score/Matched peptides ^f		
2 h	1	Peroxisomal catalase	PAAG_01454.1	57.00/7.87	57.65/6.42	217/25	48/2	0.0010	↑1.71
2 h	2	Peroxisomal catalase	PAAG_01454.1	58.33/7.46	57.65/6.42	193/28	-	0.000008	↑2.17
6 h	3	Peroxisomal catalase	PAAG_01454.1	65.77/8.25	57.47/ 6.50	88/29	-	0.0464	↑1.61
2 h	4	Thioredoxin	PAAG_07772.1	24.16/6.47	23.75/6.21	108/9	56/2	0.0049	↑2.18
2 h	5	Thioredoxin	PAAG_07772.1	24.50/6.94	23.61/6.21	101/15	119/4	0.0275	↑1.53
6 h	6	Thioredoxin	PAAG_07772.1	23.88/7.34	23.61/6.21	145/17	-	0.0359	↑1.47
2 h	7	Cu/Zn-Superoxide dismutase	PAAG_04164.1	24.00/8.18	28.02/9.17	78/14	78/2	0.0276	↑1.81
6 h	8	Mn-Superoxide dismutase	PAAG_02926.1	16.00/7.45	15.97/5.92	117/8	82/2	0.0412	↑3.41
6 h	9	Cytochrome C peroxidase	PAAG_03292.1	32.00/7.95	41.74/8.84	123/21	71/3	0.0191	↑1.58
2 h	10	DNA damage checkpoint protein rad24	PAAG_00773.1	39.16/4.09	32.48/4.74	118/22	-	0.0017	↑1.94
2 h	11	Heat shock protein 70	PAAG_08003.1	29.16/4.41	70.91/5.08	95/41	135/3	0.0129	↑1.63
6 h	12	Heat shock protein 90	PAAG_05679.1	76.88/5.46	80.32/4.96	79/46	-	0.0232	↑2.13
2 h	13	Heat shock protein SSC1	PAAG_01339.1	92.50/5.30	73.82/5.92	-	82/4	0.0031	↑1.64
6 h	14	Heat shock protein SSC1	PAAG_01339.1	67.00/6.73	73.82/5.92	86/25	122/8	0.0492	↑2.94
2 h	15	Haloacid Dehalogenase (HAD) - superfamily hydrolase	PAAG_00503.1	28.83/5.71	27.32/5.67	83/16	-	0.0023	↑2.17
6 h	16	Alkyl hydroperoxide reductase subunit C/ thiol specific antioxidant (AhpC)/ TSA family protein	PAAG_05061.1	14.77/9.03	20.02/9.75	79/10	-	0.0076	↑3.35
6 h	17	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase H	PAAG_01778.1	19.66/10.02	20.02 /8.80	146/16	200/7	0.0179	↑2.97
6 h	18	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A2	PAAG_05788.1	19.66/7.76	26.49/8.46	102/12	88/3	0.0062	↑1.73
6 h	19	T-complex protein 1 subunit delta	PAAG_01727.1	54.77/9.41	54.66/ 9.04	-	68/2	0.0364	↑1.99
6 h	20	T-complex protein 1 subunit eta	PAAG_07851.1	59.11/7.31	61.64/6.02	74/22	47/2	0.00003	↑6.34
2 h	21	Betaine aldehyde dehydrogenase	PAAG_05392.1	54.50/6.58	51.70/5.84	75/27	74/2	0.0076	↑2.92
2 h	22	Aldehyde dehydrogenase	PAAG_05249.1	52.33/6.49	54.55/5.87	182/25	168/6	0.0029	↑2.75
2 h	23	Aldehyde dehydrogenase	PAAG_05249.1	51.66/6.64	54.55/5.87	85/28	-	0.0018	↑1.68
2 h	24	Aldehyde dehydrogenase	PAAG_05249.1	51.66/6.75	54.69/5.92	219/30	177/6	0.0092	↑1.34
2 h	25	Aldehyde dehydrogenase	PAAG_05249.1	53.50/6.71	54.69/5.92	89/28	100/3	0.0108	↑1.63
2 h	26	3-demethylubiquinone-9 3-methyltransferase	PAAG_06595.1	21.83/4.96	22.41/4.93	-	79/2	0.0112	↑1.68
2 h	27	Cytochrome b2	PAAG_01603.1	59.16/7.09	57.21/6.00	101/15	-	0.0362	↑1.45

6 h	28	Vacuolar ATP synthase subunit β	PAAG_06288.1	54.13/6.72	56.21/ 5.59	-	65/3	0.0458	\uparrow 2.15
2 h	29	12-oxophytodienoate reductase	PAAG_03631.1	32.66/6.66	43.24/8.69	-	128/5	0.0151	\uparrow 2.82
6 h	30	12-oxophytodienoate reductase	PAAG_03631.1	41.00/9.67	43.24/ 8.69	159/29	237/6	0.0046	\uparrow 3.02
2 h	31	Transaldolase	PAAG_04166.1	36.16/6.77	35.86/6.17	179/24	139/6	0.0003	\uparrow 2.40
2 h	32	6-phosphogluconate dehydrogenase	PAAG_01178.1	54.50/6.33	54.58/5.77	189/37	-	0.0003	\uparrow 2.77
2 h	33	Transketolase	PAAG_04444.1	68.33/7.01	74.95/5.97	126/29	-	0.0026	\uparrow 2.64
2 h	34	Transketolase	PAAG_04444.1	67.83/7.14	74.95/5.97	136/33	-	0.0002	\uparrow 1.58
2 h	35	Fructose 1.6-bisphosphatase	PAAG_02682.1	40.83/6.50	38.97/5.80	74/15	-	0.0369	\uparrow 1.99
2 h	36	Fructose 1.6-biphosphate aldolase 1	PAAG_01995.1	38.66/7.30	39.72/6.14	183/25	136/4	0.0392	\uparrow 2.16
2 h	37	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	PAAG_08203.1	61.16/7.27	63.89/6.10	82/35	-	0.0216	\uparrow 2.71
2 h	38	Phosphoglycerate kinase	PAAG_02869.1	44.83/8.00	45.22/6.48	160/30	65/3	0.0325	\uparrow 1.76
2 h	39	Pyruvate kinase	PAAG_06380.1	60.83/7.47	59.48/6.31	98/38	-	0.0092	\uparrow 1.81
2 h	40	Alcohol dehydrogenase	PAAG_00403.1	38.16/8.93	38.00/7.55	170/29	152/5	0.0097	\uparrow 2.99
2 h	41	Phosphoglucomutase	PAAG_02011.1	58.83/7.62	87.61/7.04	78/15	-	0.0006	\uparrow 2.14
6 h	42	Triosephosphate isomerase	PAAG_02585.1	26.55/5.63	27.15/ 5.39	175/20	215/5	0.0467	\uparrow 1.33
6 h	43	Phosphoglycerate kinase	PAAG_02869.1	41.33/8.08	45.31/6.48	108/32	-	0.0213	\uparrow 1.72
6 h	44	Pyruvate carboxylase	PAAG_00726.1	106.78/7.48	131.91/6.14	253/64	131/6	0.0121	\uparrow 2.78
6 h	45	Pyruvate carboxylase	PAAG_00726.1	107.44/7.33	132.01/6.14	100/61	-	0.0472	\uparrow 2.25
2 h	46	α -ketoglutarate dehydrogenase E1	PAAG_02732.1	104.00/7.1	121.63/6.68	137/48	-	0.0134	\uparrow 2.36
2 h	47	α -ketoglutarate dehydrogenase E1	PAAG_02732.1	104.00/7.0	121.63/6.68	144/73	35/2	0.0001	\uparrow 5.35
2 h	48	α -ketoglutarate dehydrogenase E1	PAAG_02732.1	117.83/6.5	121.63/6.90	78/45	49/2	0.0302	\uparrow 1.99
2 h	49	α -ketoglutarate dehydrogenase E1	PAAG_02732.1	117.50/6.7	121.70/6.90	88/48	-	0.0069	\uparrow 1.85
6 h	50	α -ketoglutarate dehydrogenase E1	PAAG_02732.1	96.44/7.62	121.63/6.68	-	128/8	0.0167	\uparrow 2.52
2 h	51	Pyruvate dehydrogenase E1- β	PAAG_01534.1	35.16/5.40	41.04/8.11	96/16	50/2	0.0004	\uparrow 2.51
2 h	52	Pyruvate dehydrogenase E3	PAAG_03330.1	51.50/7.35	55.43/6.24	105/32	33/1	0.0006	\uparrow 2.24
2 h	53	Pyruvate dehydrogenase E3	PAAG_03330.1	51.83/7.55	55.43/8.02	202/44	-	0.0076	\uparrow 2.70
2 h	54	Aconitase	PAAG_05048.1	80.3/7.64	82.47/ 7.03	265/44	317/13	0.0076	\uparrow 4.67
2 h	55	Malate dehydrogenase	PAAG_00053.1	34.66/8.73	36.02/8.99	175/24	292/7	0.0251	\uparrow 6.15
6 h	56	Malate dehydrogenase	PAAG_00053.1	33.00/8.64	36.02/8.99	251/30	160/4	0.0343	\uparrow 1.82
6 h	57	Succinyl-CoA ligase subunit beta	PAAG_01463.1	41.11/5.19	48.56/5.61	142/44	159/9	0.0425	\uparrow 1.31
2 h	58	Isocitrate lyase	PAAG_06951.1	56.66/7.70	60.14/6.79	112/36	-	0.0041	\uparrow 2.50
6 h	58	Isocitrate lyase	PAAG_06951.1	56.88/8.45	60.17/6.79	354/48	144/9	0.0164	\uparrow 5.52
2 h	60	ATP citrate lyase	PAAG_05151.1	53.16/6.26	52.95/5.99	80/24	60/3	0.0120	\uparrow 1.62
6 h	61	ATP-citrate synthase subunit 1	PAAG_05150.1	67.00/8.89	72.41/ 8.00	96/53	-	0.0037	\uparrow 1.91
6 h	62	Acyl-CoA dehydrogenase	PAAG_00435.1	46.77/10.36	48.54/9.13	131/39	115/6	0.0240	\uparrow 1.78
2 h	63	2-methylisocitrate lyase	PAAG_04549.1	38.66/5.88	67.25/8.73	-	60/3	0.0083	\uparrow 1.29
2 h	64	Glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase	PAAG_00850.1	73.83/6.95	76.77/ 6.51	-	55/4	0.0404	\uparrow 1.29

6 h	65	Glycogen phosphorylase	PAAG_00545.1	92.88/6.72	100.10/ 5.58	157/65	110/6	0.0275	↑1.48
6 h	66	Lactam utilization protein- lamB	PAAG_02162.1	24.66/8.48	28.35/6.50	86/14	-	0.0236	↑2.16
2 h	67	Adenosylhomocysteinase	PAAG_02859.1	47.00/6.78	49.02/5.83	170/33	176/5	0.0100	↑3.97
2 h	68	Adenosylhomocysteinase	PAAG_02859.1	47.00/6.89	49.51/5.93	187/33	99/7	0.0077	↑3.36
6 h	69	Adenosylhomocysteinase	PAAG_02859.1	43.66/7.32	49.51/5.93	104/37	-	0.0130	↑2.93
2 h	70	O-acetylhomoserine (thiol)-lyase	PAAG_08100.1	46.16/7.48	46.99/6.24	142/21	-	0.0247	↑2.21
2 h	71	Sulfate adenylyltransferase	PAAG_05929.1	57.00/7.20	64.11/6.26	131/30	169/6	0.0462	↑1.57
2 h	72	Sulfate adenylyltransferase	PAAG_05929.1	52.16/6.95	64.11/6.26	-	106/4	0.0421	↑1.86
2 h	73	Sulfate adenylyltransferase	PAAG_05929.1	64.33/7.34	64.11/6.26	96/29	-	0.0050	↑2.62
6 h	74	Sulfate adenylyltransferase	PAAG_05929.1	62.88/7.84	64.11/ 6.26	178/40	64/4	0.0442	↑1.72
2 h	75	2-nitropropane dioxygenase	PAAG_01321.1	39.00/6.58	37.74/6.01	102/12	119/4	0.0078	↑2.62
6 h	76	2-nitropropane dioxygenase	PAAG_04233.1	33.66/10.05	35.77/8.96	-	53/1	0.0466	↑6.80
6 h	77	2-nitropropane dioxygenase	PAAG_06693.1	38.66/5.46	38.80/5.40	109/17	-	0.0468	↑2.06
2 h	78	NAD-specific glutamate dehydrogenase	PAAG_01002.1	103.00/7.27	126.56/6.08	76/77	-	0.0001	↑1.96
2 h	79	NAD-specific glutamate dehydrogenase	PAAG_01002.1	108.00/7.20	126.56/6.08	157/31	100/5	0.0005	↑2.75
2 h	80	NAD-specific glutamate dehydrogenase	PAAG_01002.1	40.03/7.34	121.10/6.12	114/72	63/5	0.0286	↑1.75
2 h	81	Glycine dehydrogenase	PAAG_01568.1	53.00/7.54	117.40/6.89	114/39	-	0.0029	↑1.75
6 h	82	Glycine dehydrogenase	PAAG_01568.1	95.00/7.90	117.42/ 7.02	-	134/6	0.0315	↑1.91
2 h	83	Cobalamin-independent methionine synthase	PAAG_07626.1	86.50/7.58	85.40/6.33	113/20	146/5	0.0254	↑2.35
2 h	84	Chorismate mutase	PAAG_05198.1	29.66/5.92	28.57/5.80	160/32	64/2	0.0028	↑1.89
6 h	85	Acetamidase	PAAG_04596.1	54.50/6.99	59.28/5.80	122/30	109/4	0.0287	↑2.72
6 h	86	Serine hydroxymethyltransferase	PAAG_08512.1	48.13/8.48	58.92/8.56	165/28	-	0.0357	↑1.93
6 h	87	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase	PAAG_00851.1	16.88/7.94	18.59/6.30	102/16	-	0.0036	↑2.80
2 h	88	Ribose-phosphate pyrophosphokinase	PAAG_02633.1	32.50/7.71	35.40/6.56	124/20	103/3	0.0021	↑2.49
2 h	89	S-methyl-5-thioadenosine phosphorylase	PAAG_01302.1	33.50/6.82	34.29/6.04	75/15	180/5	0.0387	↑2.37
2 h	90	Bifunctional purine biosynthesis protein ADE17	PAAG_00731.1	63.83/7.61	64.93/7.18	154/44	112/5	0.0339	↑1.47
2 h	91	Elongation factor 1-alpha	PAAG_02024.1	52.33/9.71	50.55/9.24	-	88/2	0.0474	↑3.24
6 h	92	Elongation factor 1-alpha	PAAG_02024.1	49.50/10.34	50.55/9.24	142/31	73/4	0.0271	↑2.11
2 h	93	Elongation factor 2	PAAG_00594.1	34.50/6.99	94.15/6.46	-	174/6	0.0205	↑2.29
6 h	94	Elongation factor 2	PAAG_00594.1	88.63/8.46	94.15/ 6.36	176/39	230/9	0.0226	↑4.41
2 h	95	Eukaryotic translation initiation factor 1A	PAAG_06140.1	21.16/4.41	17.32/ 4.90	-	142/4	0.0095	↑1.66

2 h	96	Eukaryotic translation initiation factor 4E-1	PAAG_09045.1	31.33/7.94	27.06/6.46	86/13	-	0.0037	↑2.88
2 h	97	Seryl-tRNA synthetase	PAAG_08702.1	58.16/6.59	56.48/5.77	-	46/2	0.00002	↑2.62
6 h	98	Polyadenylate binding protein	PAAG_00244.1	90.50/7.23	86.91/6.31	198/51	-	0.0098	↑3.24
2 h	99	60S acidic ribosomal protein P0 lyase	PAAG_00801.1	36.50/5.10	33.69/5.09	136/20	114/3	0.0025	↑1.58
2 h	100	Arginyl-tRNA synthetase	PAAG_00150.1	69.66/6.84	81.89/7.89	90/57	-	0.0018	↑1.95
2 h	101	Thimet oligopeptidase	PAAG_03719.1	80.83/7.01	95.59/6.15	198/48	174/5	0.0178	↑1.42
2 h	102	Dipeptidyl peptidase III	PAAG_07467.1	72.00/7.37	86.54/7.99	98/44	-	0.0179	↑1.94
6 h	103	Dipeptidyl peptidase III	PAAG_07467.1	72.88/6.77	86.54/7.99	156/50	66/4	0.0220	↑1.48
6 h	104	Dipeptidyl peptidase III	PAAG_07467.1	93.81/7.64	86.54/ 7.99	197/48	57/4	0.0102	↑2.30
6 h	105	ran-specific GTPase-activating protein	PAAG_02466.1	39.89/4.64	18.34/5.29	-	40/1	0.0006	↑2.30
2 h	106	Vesicular-fusion protein sec17	PAAG_06233.1	32.50/5.60	32.72/5.35	78/22	-	0.0032	↑2.03
2 h	107	rab GDP-dissociation inhibitor	PAAG_06344.1	55.16/5.69	52.53/5.44	182/33	-	0.0362	↑1.52
6 h	108	NIPSNAP family protein	PAAG_05960.1	41.55/10.14	46.12/ 9.05	175/33	90/4	0.0547	↑3.40
2 h	109	Arp2/3 complex subunit Arc16	PAAG_03624.1	38.33/7.11	36.15/5.87	86/15	133/4	0.0027	↑3.28
6 h	110	Arp2/3 complex subunit Arc16	PAAG_03624.1	35.55/7.49	36.15/ 5.87	86/17	179/5	0.0099	↑1.31
2 h	111	1,4-alpha-glucan branching enzyme	PAAG_08038.1	74.50/6.71	80.33/5.79	74/36	-	0.0081	↑2.56
2 h	112	1,4-alpha-glucan branching enzyme	PAAG_08038.1	78.16/6.61	80.33/5.79	106/33	-	0.0405	↑2.53
2 h	113	Mannitol-1-phosphate dehydrogenase	PAAG_06473.1	42.00/6.86	43.10/5.73	138/22	101/3	0.0028	↑3.39
2 h	114	ssDNA binding protein	PAAG_07296.1	1492/10.06	16.50/8.58	188/17	141/5	0.0362	↑5.39
2 h	115	Conserved hypothetical protein	PAAG_00335.1	41.66/6.46	40.91/5.89	-	36/2	0.0045	↑2.04
2 h	116	Hypothetical protein	PAAG_06752.1	13.33/7.59	11.47/9.69	-	76/2	0.0003	↑2.97
2 h	117	Heat shock protein 60	PAAG_08059.1	59.66/5.17	62.48/5.51	271/49	88/3	0.0015	↓2.48
2 h	118	Heat shock protein 88	PAAG_07750.1	153.5/4.76	80.68/4.92	113/43	65/4	0.0007	↓2.52
6 h	119	Heat shock protein 70	PAAG_08003.1	70.91/ 5.0	42.44/5.76	260/33	255/9	0.0184	↓5.00
6 h	120	Heat shock protein 70	PAAG_01262.1	68.85/5.39	41.22/7.41	76/36	-	0.0216	↓2.30
6 h	121	Heat shock protein 70	PAAG_08003.1	70.91/5.08	26.11/4.44	-	48/2	0.0228	↓1.64
6 h	122	Heat shock proteinSSC1	PAAG_01339.1	73.82/5.92	65.13/5.57	118/40	203/5	0.0402	↓1.16
6 h	123	Heat shock protein SSB1	PAAG_07775.1	60.69/ 5.47	44.66/5.29	202/17	276/8	0.0196	↓1.22
6 h	124	Glutathione S-transferase	PAAG_06617.1	30.58/6.24	29.66/7.52	74/14	-	0.0138	↓2.31
2 h	125	Cytochrome-C oxidase chain VI	PAAG_07246.1	17.00/4.76	18.84/5.54	74/8	59/1	0.0237	↓1.77
6 h	126	Transketolase	PAAG_04444.1	68.13/7.38	74.94/ 5.97	162/35	162/7	0.0142	↓2.12
6 h	127	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	PAAG_08203.1	56.25/7.65	63.89/6.10	195/41	253/7	0.0416	↓1.78
6 h	128	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	PAAG_08468.1	41.33/8.90	36.61/8.26	279/27	98/3	0.0329	↓3.13
6 h	129	Enolase	PAAG_00771.1	46.11/8.54	43.85/ 8.93	-	255/5	0.0371	↓2.44
6 h	130	Pyruvate dehydrogenase complex component Pdx1	PAAG_00666.1	36.66/5.80	31.68/5.44	80/17	-	0.0473	↓1.81

2 h	131	Pyruvate dehydrogenase E3	PAAG_03330.1	39.66/10.43	56.06/8.27	-	94/2	0.0069	↓2.92
6 h	132	Pyruvate dehydrogenase E1- α	PAAG_08295.1	41.44/7.53	45.31/8.62	154/33	89/5	0.0343	↓1.80
2 h	133	Fumarate hydratase	PAAG_00588.1	49.00/8.48	60.71/9.07	-	55/2	0.0435	↓1.31
2 h	134	Fumarate reductase	PAAG_04851.1	62.16/8.21	68.04/6.90	167/50	94/4	0.0024	↓2.00
2 h	135	Isocitrate dehydrogenase subunit 2	PAAG_07729.1	42.16/8.03	41.85/8.75	80/29	-	0.0014	↓1.40
6 h	136	Isocitrate dehydrogenase subunit 2	PAAG_07729.1	38.44/8.45	37.40/9.51	105/32	97/4	0.0286	↓1.85
6 h	137	Citrate synthase	PAAG_08075.1	43.11/8.48	52.20/8.75	78/28	-	0.0395	↓1.61
6 h	138	Malate dehydrogenase	PAAG_00053.1	33.33/9.77	36.03/9.25	199/27	-	0.0347	↓5.03
2 h	139	Malate synthase	PAAG_04542.1	58.50/8.14	61.02/6.94	238/56	113/5	0.0028	↓3.76
6 h	140	Sorbitol utilization protein SOU2	PAAG_04181.1	33.11/8.17	31.48/7.05	-	89/2	0.0244	↓1.85
6 h	141	Aldose 1-epimerase	PAAG_03243.1	36.77/5.64	21.26/11.32	78/22	57/2	0.0391	↓1.69
2 h	142	Serine hydroxymethyltransferase	PAAG_08512.1	52.50/8.25	58.92/8.56	71/21	57/3	0.0166	↓1.65
2 h	143	Branched-chain-amino-acid aminotransferase	PAAG_04401.1	41.33/9.61	45.53/9.10	109/30	67/6	0.0455	↓1.68
6 h	144	Pyridoxine biosynthesis protein PDX1	PAAG_07321.1	36.66/5.94	34.40/6.04	130/38	49/2	0.0028	↓1.72
6 h	145	Ketol-acid reductoisomerase	PAAG_03404.1	38.22/8.70	44.86/9.12	116/22	-	0.0223	↓1.61
2 h	146	Enoyl-CoA hydratase	PAAG_06309.1	27.50/8.59	32.11/8.89	94/19	134/7	0.0409	↓2.78
2 h	147	Enoyl-CoA hydratase	PAAG_06309.1	64.50/4.87	31.57/8.87	121/23	439/11	0.0027	↓1.56
6 h	148	Carnitine O-acetyltransferase	PAAG_06224.1	62.77/9.19	69.88/8.21	124/27	81/4	0.0372	↓1.48
2 h	149	Bifunctional purine biosynthesis protein ADE17	PAAG_00731.1	64.50/8.12	64.93/7.18	130/34	-	0.0016	↓2.53
2 h	150	Bifunctional purine biosynthesis protein ADE17	PAAG_00731.1	64.16/8.30	67.20/6.70	108/31	274/8	0.0033	↓2.93
2 h	151	Nucleoside diphosphate kinase	PAAG_04291.1	17.16/7.91	16.90/6.84	77/4	-	0.0356	↓1.34
6 h	152	Uracil phosphoribosyltransferase	PAAG_06643.1	25.33/6.24	24.78/5.96	86/11	-	0.0205	↓1.43
2 h	153	60S ribosomal protein L9	PAAG_00347.1	25.33/10.19	21.82/9.54	92/16	-	0.0169	↓3.64
2 h	154	40S ribosomal protein S3	PAAG_01785.1	34.83/9.46	29.76/8.91	-	142/3	0.0246	↓2.21
2 h	155	Lysyl-tRNA synthetase	PAAG_08172.1	74.50/7.96	69.80/5.88	193/49	280/11	0.0069	↓1.93
6 h	156	60S acidic ribosomal protein P0 lyase	PAAG_00801.1	34.88/5.26	33.76/5.02	149/21	105/3	0.0303	↓2.81
6 h	157	40S ribosomal protein S19	PAAG_05778.1	17.33/10.99	16.22/9.81	87/17	-	0.0391	↓1.60
6 h	158	Leukotriene A-4 hydrolase	PAAG_08994.1	59.25/5.58	69.90/5.31	80/33	-	0.00006	↓1.50
6 h	159	Metallophosphoesterase domain-containing protein	PAAG_00265.1	34.88/6.73	35.23/5.85	93/31	-	0.0054	↓2.45
6 h	160	Metallophosphoesterase domain-containing protein	PAAG_00265.1	34.44/6.86	29.75/5.88	72/20	-	0.0471	↓1.72
6 h	161	Proteasome subunit alpha type	PAAG_03687.1	26.82/4.79	27.33/4.37	118/26	121/5	0.0031	↓2.86
6 h	162	Proteasome subunit beta type	PAAG_01150.1	31.44/6.39	25.11/8.59	-	49/2	0.0147	↓4.65
6 h	163	Ubiquitin C-terminal hydrolase	PAAG_02254.1	27.11/5.01	28.00/4.73	90/17	63/3	0.0226	↓5.74

2 h	164	GTP-binding nuclear protein GSP1/Ran*	PAAG_04651.1	25.83/7.81	24.05/6.90	190/6	-	0.0198	↓1.35
2 h	165	rab GDP-dissociation inhibitor	PAAG_06344.1	54.16/6.01	52.53/5.44	118/37	48/2	0.0003	↓5.15
6 h	166	G-protein complex beta subunit CpcB	PAAG_06996.1	34.77/8.28	35.48/ 6.59	229/20	266/8	0.0001	↓3.16
2 h	167	UTP-glucose-1-phosphate urydyltransferase	PAAG_06817.1	56.33/9.39	52.90/9.07	178/27	179/7	0.0413	↓1.28
6 h	168	Arp2/3 complex subunit Arc16	PAAG_03624.1	36.33/7.49	36.15/ 5.87	-	85/3	0.0167	↓1.45
6 h	169	Mannitol-1-phosphate 5-dehydrogenase	PAAG_06473.1	38.89/7.21	43.10/5.73	104/19	-	0.0147	↓1.77
2 h	170	RNA-processing protein	PAAG_03277.1	66.33/4.80	68.46/5.04	78/35	-	0.0047	↓2.09
2 h	171	ATP-dependent RNA helicase eIF4A	PAAG_00689.1	48.16/5.02	45.01/5.14	192/32	436/13	0.0391	↓1.39
6 h	172	Nucleic acid-binding protein	PAAG_04814.1	35.22/7.30	30.53/9.20	166/19	120/5	0.0175	↓2.76
2 h	173	ssDNA binding protein	PAAG_07296.1	13.16/9.28	14.97/10.06	156/14	63/3	0.0345	↓1.41
2 h	174	Nuclear segregation protein-Bfr1	PAAG_02186.1	61.33/9.68	56.59/9.01	185/93	246/7	0.0059	↓2.69
6 h	175	Cell division cycle protein	PAAG_05518.1	101.44/5.23	90.56/4.98	212/85	-	0.0299	↓3.05
2 h	176	Conserved hypothetical protein	PAAG_00340.1	21.16/9.54	19.20/8.61	75/13	84/5	0.0277	↓1.56
2 h	177	Conserved hypothetical protein	PAAG_02068.1	44.66/10.15	34.80/9.64	149/23	266/8	0.00006	↓4.00
6 h	178	Conserved hypothetical protein	PAAG_02836.1	34.77/5.38	35.25/5.29	-	111/4	0.0231	↓3.10
6 h	179	DUF 833 domain-containing protein	PAAG_06515.1	36.33/6.19	35.55/5.50	73/10	-	0.0357	↓1.58

^aTime in oxidative stress condition

^bSpots numbers refer to Figure 1

^cExperimental Molecular Weight / Isoelectric point

^dTheoretical Molecular Weight / Isoelectric point

^eNumber of mass values matched (%)

^fNumber of peptides values matched (%)

^g*p* values were accessed by Student's *t*-test

^hThe ratio of protein abundance relative to control (↑ up regulation; ↓ down regulation)

Supplementary Table 3 - *Paracoccidioides* yeast cells proteins with increased expression with predicted oxidoreductase activity as identified by in silico analysis.

Time ^a	Spot ^b	Protein Identification	Accession number	Exp. MW/pI ^c	Theo. MW/pI ^d	PMF	MS/MS	<i>p</i> -value ^g	Protein fold change ^h
						Score/Matched mass ^e	Score/Matched peptides ^f		
Cell rescue, defense and virulence									
2h	1	Peroxisomal catalase	PAAG_01454.1	57.00/7.87	57.65/6.42	217/25	48/2	0.0010	1.71
2h	2	Peroxisomal catalase	PAAG_01454.1	58.33/7.46	57.65/6.42	193/28	-	0.000008	2.17
6h	3	Peroxisomal catalase	PAAG_01454.1	65.77/8.25	57.47/ 6.50	88/29	-	0.0464	1.61
2h	7	Cu/Zn-Superoxide dismutase	PAAG_04164.1	24.00/8.18	28.02/9.17	78/14	78/2	0.0276	1.81
6h	8	Mn-Superoxide dismutase	PAAG_02926.1	16.00/7.45	15.97/5.92	117/8	82/2	0.0412	3.41
6h	9	Cytochrome C peroxidase	PAAG_03292.1	32.00/7.95	41.74/8.84	123/21	71/3	0.0191	1.58
6h	16	AhpC/TSA family protein (Alkyl hydroperoxide reductase subunit C/ thiol specific antioxidante)	PAAG_05061.1	14.77/9.03	20.02/9.75	79/10	-	0.0076	3.35
2 h	21	Betaine aldehyde dehydrogenase	PAAG_05392.1	54.50/6.58	51.70/5.84	75/27	74/2	0.0076	2.92
2 h	22	Aldehyde dehydrogenase	PAAG_05249.1	52.33/6.49	54.55/5.87	182/25	168/6	0.0029	2.75
2 h	23	Aldehyde dehydrogenase	PAAG_05249.1	51.66/6.64	54.55/5.87	85/28	-	0.0018	1.68
2 h	24	Aldehyde dehydrogenase	PAAG_05249.1	51.66/6.75	54.69/5.92	219/30	177/6	0.0092	1.34
2 h	25	Aldehyde dehydrogenase	PAAG_05249.1	53.50/6.71	54.69/5.92	89/28	100/3	0.0108	1.63
Energy									
<i>Electron transport and membrane-associated energy conservation</i>									
2 h	27	Cytochrome b2	PAAG_01603.1	59.16/7.09	57.21/6.00	101/15	-	0.0362	1.45
2 h	29	12-oxophytodienoate reductase	PAAG_03631.1	32.66/6.66	43.24/8.69	-	128/5	0.0151	2.82
6 h	30	12-oxophytodienoate reductase	PAAG_03631.1	41.00/9.67	43.24/ 8.69	159/29	237/6	0.0046	3.02
<i>Pentose-phosphate pathway</i>									
2 h	32	6-phosphogluconate dehydrogenase	PAAG_01178.1	54.50/6.33	54.58/5.77	189/37	-	0.0003	2.77
<i>Glycolysis and gluconeogenesis</i>									
2 h	40	Alcohol dehydrogenase	PAAG_00403.1	38.16/8.93	38.00/7.55	170/29	152/5	0.0097	2.99
<i>Tricarboxylic-acid pathway</i>									
2 h	46	α-ketoglutarate dehydrogenase E1	PAAG_02732.1	104.00/7.1	121.63/6.68	137/48	-	0.0134	2.36
2 h	47	α-ketoglutarate dehydrogenase E1	PAAG_02732.1	104.00/7.0	121.63/6.68	144/73	35/2	0.0001	5.35
2 h	48	α-ketoglutarate dehydrogenase E1	PAAG_02732.1	117.83/6.5	121.63/6.90	78/45	49/2	0.0302	1.99
2 h	49	α-ketoglutarate dehydrogenase E1	PAAG_02732.1	117.50/6.7	121.70/6.90	88/48	-	0.0069	1.85
6 h	50	α-ketoglutarate dehydrogenase E1	PAAG_02732.1	96.44/7.62	121.63/6.68	-	128/8	0.0167	2.52
2 h	51	Pyruvate dehydrogenase E1-β	PAAG_01534.1	35.16/5.40	41.04/8.11	96/16	50/2	0.0004	2.51

2 h	52	Pyruvate dehydrogenase E3	PAAG_03330.1	51.50/7.35	55.43/6.24	105/32	33/1	0.0006	2.24
2 h	53	Pyruvate dehydrogenase E3	PAAG_03330.1	51.83/7.55	55.43/8.02	202/44	-	0.0076	2.70
2 h	55	Malate dehydrogenase	PAAG_00053.1	34.66/8.73	36.02/8.99	175/24	292/7	0.0251	6.15
6 h	56	Malate dehydrogenase	PAAG_00053.1	33.00/8.64	36.02/8.99	251/30	160/4	0.0343	1.82
Metabolism									
<i>Lipid, fatty acid and isoprenoid metabolism</i>									
6 h	62	Acyl-CoA dehydrogenase	PAAG_00435.1	46.77/10.36	48.54/9.13	131/39	115/6	0.0240	1.78
<i>Amino acid, nitrogen, sulfur and selenium metabolism</i>									
2 h	75	2-nitropropane dioxygenase	PAAG_01321.1	39.00/6.58	37.74/6.01	102/12	119/4	0.0078	2.62
6 h	76	2-nitropropane dioxygenase	PAAG_04233.1	33.66/10.05	35.77/8.96	-	53/1	0.0466	6.80
6 h	77	2-nitropropane dioxygenase	PAAG_06693.1	38.66/5.46	38.80/5.40	109/17	-	0.0468	2.06
2 h	81	Glycine dehydrogenase	PAAG_01568.1	53.00/7.54	117.40/6.89	114/39	-	0.0029	1.75
6 h	82	Glycine dehydrogenase	PAAG_01568.1	95.00/7.90	117.42/7.02	-	134/6	0.0315	1.91
Biogenesis of cellular components									
2 h	113	Mannitol-1-phosphate dehydrogenase	PAAG_06473.1	42.00/6.86	43.10/5.73	138/22	101/3	0.0028	3.39

^a Time in oxidative stress condition

^b Spots numbers refers to figure 1

^c Experimental molecular weight / isoelectric point

^d Theoretical molecular weight / isoelectric point

^e Number of mass values matched (%)

^f Matched peptides

^g *p* values were accessed by Student's *t*-test

^h The ratio of protein abundance relative to control

^{*} Functional classification – FunCat2 (http://pe.dant.helmholtz-muenchen.de/pedant3htmlview/pedant3view?Method=analysis&Db=p3_r48325_Par_brazi_Pb01)

Supplementary Table 4 - Predicted post translational modifications of identified proteins isoforms of *Paracoccidioides*, upon 2 and 6 hours of H₂O₂ treatment

Protein Identification	Accession number	Spot ^a	Time ^b	Theo. MW/ pI ^c	Exp. MW/pI ^d	Sequence coverage	Number of mass values matched	PTM ^e	Peptide sequence ^f	Peptide position	Theo. mass ^g	Measured mass ^h					
Peroxisomal catalase	PAAG_01454.1	2	2h	57.65/6.42	58.33/7.46	49	28	-	***								
						50	35	ST	YTETPTYTTSNGCPVMDPESSQR	12-34	2637.1082	2717.0745					
								ST	DPSKFPIFIHTQK	148-160	1557.8546	1717.7600					
						49	29	Y	YTETPTYTTSNGCPVMDPESSQR	12-34	2637.1082	2717.0745					
						50	34	M / STY	YTETPTYTTSNGCPVMDPESSQR	12-34	2716.0672	2717.0745					
								STY	DPRGFSTK	119-126	986.4446	987.4519					
				STY	ACQEHEQWA GAALSK	408-422	1764.7342	1765.7415									
				3	6h	57.47/ 6.50	65.77/8.25	54	29	-	***						
		56	36					Y	GADVASSTYR	2-11	1105.5406	1106.5479					
								Y	GTPYSYR	195-201	1002.2857	1003.2930					
								Y	KATYCMFTR	468-476	1256.4087	1257.4160					
								59	57	M / STY	MGADVASSSTYR	1-11	1492.3445	1493.3518			
								STY	YTETPTYTTSNGCPVMDPESSQR	12-34	2700.1489	2701.1562					
								STY	DPRGFSTK	119-126	986.3588	987.3661					
								STY	NPQTNLK	162-168	893.4039	894.4112					
								M / STY	MAADNPDWHTEDLFK	244-258	1884.8007	1885.8080					
								STY	FRWNVFDLTK	283-292	1404.7364	1405.7437					
								STY	LFSYPDTHR	346-354	1294.5274	1295.5347					
								STY	LFSYPDTHRRR	346-356	1667.4533	1668.4606					
		STY	MVASQPQSHL					492-501	1256.4087	1257.4160							
Thioredoxin	PAAG_07772.1	4	2h	23.75/6.21	24.16/6.47	61	9	-	***								
						78	18	ST	MTLNPQFAGQKLSLSGGTETK	1-21	2367.2654	2368.2727					
								ST	QQIQPWHPSSSTLTHEA GVA VLK	69-90	2666.2795	2667.2868					
						73	16	Y	NAHYRDNLQVIFR	56-68	1724.7604	1725.7677					
								5	2h	23.61/6.21	24.50/6.94	80	15	-	***		
						80	16					HW	QQIQPWHPSSSTLTHEA GVA VLK	66-87	2458.2427	2459.2500	
				6	6h	23.61/6.21	23.88/7.34			HW	MLAVSDKPDEQGDNLGGNGVTGDLK	141-165	2545.1321	2546.1394			
								72	17	-	***						
								72	20	K	TLNPQFAGQKLSLSGGTETK	2-21	2118.0410	2119.0483			
								72	18	HW	QQIQPWHPSSSTLTHEA GVA VLK	66-87	2442.2254	2443.2327			
								74	19	ST	TISSRFTA EQWEK	191-203	1741.7457	1742.7530			
								74	19	STY	TISSRFTA EQWEK	191-203	1741.7457	1742.7530			
Heat shock protein 70	PAAG_08003.1	119	6h	42.44/5.76	70.91/ 5.0	50	33	-	***								
						53	34	K	IVITNDKGR	500-508	1056.6227	1057.6300					
						50	36	STY	IQKLVSDFFNGK	344-355	1474.6987	1475.7060					
Heat shock	PAAG_01339.1	14	6h	73.82/5.92	67.00/6.73	38	25	-	***								

protein SSCI						47	38	K	TTPSVVAFTK	82-91	1091.6648	1092.6721
						45	35	STY	HNSKMTR	337-344	1065.5574	1066.5647
								STY	TIEPVRK	358-364	921.4637	922.4710
	122	6h	65.13/5.57	73.82/5.92		55	40	-	***			
						64	55	K	RWNSTEGGEEK	36-46	1333.6729	1334.6802
								K	TTPSVVAFTK	82-91	1091.5452	1092.5525
								K	MKETA EA YLGKPVK	170-183	1689.9334	1690.9407
								K	AAIEAANRADSVLNDTEK	573-590	1928.8350	1929.8423
								M / K	VDELQNASLTLFDKMHK	637-653	2046.0109	2047.0182
						55	41	HW	VDELQNASLTLFDKMHK	637-653	2003.9295	2004.9368
					68	64	ST	MLASRFSR	1-8	1126.3898	1127.3971	
							ST	AAIEAANRADSVLNDTEK	573-590	2046.9939	2048.0012	
					66	62	STY	MLASRFSR	1-8	1126.3898	1127.3971	
							STY	LPATPFRR	29-36	1036.5026	1037.5099	
							STY	VKGQVIGIDLGTNSA VA VMEGK	47-69	2446.0205	2447.0278	
							STY	STNGDTHLGGEDFDITLVR	262-280	2205.8736	2206.8809	
							M / STY	MTRSQLEA LVDPLISR	342-357	2003.9295	2004.9368	
							M / STY	MTRSQLEA LVDPLISR	342-357	2083.8147	2084.8220	
Aldehyde dehydrogenase	PAAG_05249.1	22	2h	54.55/5.87	52.33/6.49	56	25	-	***			
						59	27	K	IGPVVATGNTVVLK	174-187	1408.8269	1409.8342
								K	QILQAAAK	247-254	883.5313	884.5386
						56	29	HW	AAFHGPW K	66-73	928.3685	929.3758
								HW	AAFHGPW K	66-73	944.4222	945.4295
								HW	IHGK VIDTDSDFNYTR	134-150	1983.0634	1984.0707
								HW	VA GAAISSHMDIDKVA FTGSTLVGR	222-246	2518.3692	2519.3765
						59	28	ST	AAFHGPW KHVTPTDR	66-80	1798.9208	1799.9281
								ST	SAEQTPLSAL YAAK	188-201	1608.5305	1609.5378
								ST	VA GAAISSHMDIDK	222-235	1573.6829	1574.6902
						56	28	Y	YYGGWADKIHGK	126-137	1553.6535	1554.6608
						57	29	STY	VA FTGSTLVGR	236-246	1266.5994	1267.6067
								STY	ELGEYALDNYTQIK	471-484	1815.8156	1816.8229
23	2h	54.55/5.87	51.66/6.64	59	28	-	***					
				59	34	MHW	MLLKLADLMEQHVDTLAAIEALDN GK	83-108	2883.3294	2884.3367		
						HW	YYGGWADKIHGK	126-137	1409.7536	1410.7609		
						HW	YYGGWADKIHGK	126-137	1425.7250	1426.7323		
						HW	VA GAAISSHMDIDKVA FTGSTLVGR	222-246	2518.3637	2519.3710		
				57	32	Y	VIDTDTDSDFNYTR	138-150	1625.7344	1626.7417		
						Y	IMGYIREGK	348-356	1145.5769	1146.5842		
						MY	IMGYIREGK	348-356	1161.6109	1162.6182		
24	2h	54.69/5.92	51.66/6.75	63	30	-	***					
				63	33	K	ILVEEGIYDTFLERFK	303-318	2013.0078	2014.0151		
				63	35	HW	AAFKGPW K	66-73	919.4842	920.4915		
						HW	GPWKHVTPTNR	70-80	1307.6674	1308.6747		
						HW	LADLMEQHVDTLAAIEALDNGK	87-100	2382.1947	2383.2020		
						HW	YYGGWADKIHGK	126-137	1409.6834	1410.6907		
						HW	YYGGWADKIHGK	126-137	1425.6704	1426.6777		

						63	31	HW	VAGAAISSHMDIDKVAFTGSTLVGR	222-246	2518.2942	2519.3015
						63	31	Y	SAEQTPLSALYAAK	188-201	1528.7208	1529.7281
						63	31	STY	SAEQTPLSALYAAK	188-201	1528.7208	1529.7281
12-oxophytodienoate reductase	PAAG_03631.1	30	6h	43.24/ 8.69	41.00/9.67	69	28	-	***			
						74	31	HW	RVTDA VHAK	96-104	1011.5463	1012.5536
						71	34	Y	YADFPPK	147-153	916.4125	917.4198
						73	42	STY	GGFLLTEATPISR	62-74	1520.7227	1521.7300
								STY	YADFPPK	147-153	916.4125	917.4198
								STY	ALTVEEIK	154-161	981.5294	982.5367
								STY	VGIRLSPYNYFQDTR	234-248	2067.9278	2068.9351
								STY	KDYSLDHFR	307-315	1339.5731	1340.5804
								STY	YDRSTFYGASPPEK	373-386	1696.8404	1697.8477
Transketolase	PAAG_04444.1	33	2h	74.95/5.97	68.33/7.01	41	29	-	***			
						43	31	K	EVKDKPTVIK	238-247	1281.7246	1282.7319
								K	QNLPLQLEASSIEKAIR	529-544	1837.8982	1838.9055
						41	32	HW	NPQWINR	55-61	942.4986	943.5059
						44	36	ST	FEFTPEGISKR	650-660	1389.5701	1390.5774
		34	2h	74.95/5.97	67.83/7.14	42	33	-	***			
						42	35	K	EVKDKPTVIK	238-247	1197.6536	1198.6609
								K	EVKDKPTVIK	238-247	1281.7052	1282.7125
						42	35	HW	ANSGHGPGAPMGLAPTAHVLFNK	26-47	2202.1189	2203.1262
								HW	NPQWINR	55-61	942.4932	943.5005
						43	35	ST	FGASGPYK	637-644	905.3289	906.3362
						43	35	STY	FGASGPYK	637-644	905.3289	906.3362
Pyruvate carboxylase	PAAG_00726.1	44	6h	131.91/6.14	106.78/7.48	51	64	-	***			
						55	75	K	DSILVDA VK	298-306	1000.5680	1001.5753
								M / K	AVAAA GGVIEATICYSGDMLNPHK	710-733	2502.2139	2503.2212
						54	76	M / ST	ASSTIMHFTK	37-46	1457.4315	1458.4388
								ST	LTPDDVVAR	941-949	1064.4955	1065.5028
								ST	VDLSDSSQVGAPMSGVVVEIR	1119-1139	2224.0926	2225.0999
								ST	KGDPLA VLSAMK	1148-1159	1308.6850	1309.6923
						54	79	STY	LTPDDVVAR	941-949	1064.4955	1065.5028
								STY	VDLSDSSQVGAPMSGVVVEIR	1119-1139	2224.0926	2225.0999
		45	6h	132.01/6.14	107.44/7.33	47	61	-	***			
						53	87	ST	VTPTSKVVGDLAQFMVSNK	922-940	2180.0674	2181.0747
						50	71	Y	YYFIEINPR	329-337	1293.6809	1294.6882
						53	92	M / STY	ASSTIMHFTK	37-46	1377.3861	1378.3934
								M / STY	LSMHRQK	80-86	994.3611	995.3684
								STY	YYFIEINPR	329-337	1293.6809	1294.6882
								STY	YYFIEINPR	329-337	1373.5260	1374.5333
								STY	QVTVDDNMAA VDDTSRVK	1101-1118	2042.9988	2044.0061
α -ketoglutarate dehydrogenase E1	PAAG_02732.1	46	2h	121.63/6.68	104.00/7.12	47	48	-	***			
						51	60	HW	VPCDWIRDR	272-280	1231.5763	1232.5836
								HW	DIVIGMPHR	347-355	1052.5635	1053.5708
								HW	QGHNETDQPAFTQPLM YK	554-571	2120.0064	2121.0137
								HW	KWVW GMLNDSFDR	603-615	1684.8273	1685.8346
						50	66	ST	KDPSSVHVSQA YFR	109-123	1885.8749	1886.8822

						ST	YHLGMNFERPTPSGK	392-406	1812.8395	1813.8468
						ST	IAEQTNQLDK	573-582	1238.6082	1239.6155
				50	58	Y	KDPSSVHVSWSQA YFR	109-123	1885.8749	1886.8822
						Y	YHLGMNFERPTPSGK	392-406	1812.8395	1813.8468
				52	71		YHLGMNFERPTPSGK	392-406	1812.8395	1813.8468
47	2h	121.63/6.68	104.00/7.07	57	73	-	***			
				60	97	K	RFLEGCE TLVPGMK	320-334	1734.8500	1735.8573
						K	KPNESIFSEFSGTIEPSDEGSGDVK	367-391	2697.4771	2698.4844
						K	KWVW GMLNDSFDR	603-615	1694.7400	1695.7473
						K	SKDYQPSS	616-624	1122.6127	1123.6200
				59	88	HW	QGHNETDQPAFTQPLM YK	554-571	2120.0387	2121.0460
						HW	KWVW GMLNDSFDR	603-615	1684.8590	1685.8663
						HW	IGDVLGNVPEFTVHRNLK	660-678	2137.2747	2138.2820
						HW	SGLVMSLPHGYD GQGPEHSSAR	815-836	2297.1270	2298.1343
				65	123	ST	TSTVKASSTAVFLR	4-18	1647.8635	1648.8708
						ST	TSTVKASSTAVFLR	4-18	1967.7411	1968.7484
						ST	LFSAIATSK	29-37	1016.4528	1017.4601
						ST	VEIQPYKYSDVEK	281-294	1773.8104	1774.8177
						ST	DYQPSSKEWLTSANGFK	618-635	2383.0926	2384.0999
						ST	SIERVILCSGQVYAALHK	939-956	2123.2339	2124.2412
						ST	NTAITRIQMHPFPWQMLK	966-984	2500.1327	2501.1400
				60	92	Y	ALIDRSVDYGVK	335-346	1414.7144	1415.7217
						Y	SIERVILCSGQVYAALHK	939-956	2123.2339	2124.2412
				65	128	STY	TSTVKASSTAVFLR	4-18	1647.8635	1648.8708
						STY	TSTVKASSTAVFLR	4-18	1967.7411	1968.7484
						STY	LFSAIATSK	29-37	1016.4528	1017.4601
						STY	YSVDEK	289-294	899.2455	900.2528
						STY	QGHNETDQPAFTQPLM YK	554-571	2184.0562	2185.0635
						STY	DYQPSSKEWLTSANGFK	618-635	2383.0926	2384.0999
						STY	ELATEVLPHPPTGVPADTLK	639-658	2324.1765	2325.1838
						STY	KPLIIFFSKLLR	891-903	1720.9914	1721.9987
						STY	SIERVILCSGQVYAALHK	939-956	2123.2339	2124.2412
						STY	NTAITRIQMHPFPWQMLK	966-984	2500.1327	2501.1400
49	2h	121.70/6.90	117.50/6.71	43	48	-	***			
				48	61	HW	FGLEGCE TLVPGMK	321-334	1552.6820	1553.6893
						HW	DIVIGMPHR	347-355	1052.5476	1053.5549
						HW	SGLVMSLPHGYD GQGPEHSSAR	815-836	2297.1060	2298.1133
				44	53	Y	KEPSSVHVSWSQTYFR	109-123	1929.9984	1931.0057
Pyruvate dehydrogenase E3	PAAG_03330.1	52	2h	55.43/6.24	51.50/7.35	57	32	-	***	
				62	47	K	VGVEVDEK	333-340	915.4134	916.4207
						M / K	SQHIRVIGDCTFGPMLAHK	353-371	2224.0749	2225.0822
				61	36	HW	QSQICSA STALSGPHVLGHSR	20-40	2224.0749	2225.0822
						HW	GIEVGDVKLNLEQMMK	117-132	1834.9195	1835.9268
						M / HW	VIGDCTFGPMLAHK	358-371	1576.7750	1577.7823
				65	55	ST	AKESSVDSLTK	140-150	1323.6519	1324.6592
						ST	FLVGTKVTS GDDSGK	286-300	1589.8630	1590.8703
						ST	EAAMATYSK	509-517	1050.4926	1051.4999

						61	34	Y	EAAMATYSK	502-510	1050.4926	1051.4999
53	2h	55.43/8.02	51.83/7.55			71	44	-	***			
						72	55	K	ESSVDSLTKGIEFLK	135-150	1848.9625	1849.9698
								K	VGVEVDEK	333-340	915.4793	916.4866
								M / K	SQHIRVIGDCTFGPMLAHK	353-371	2224.1597	2225.1670
								M / K	EAAMATYSKAIHF	502-514	1496.7941	1497.8014
						71	47	HW	TCHAHPTLSEAFKEAAMATYSK	489-510	2466.2080	2467.2153
						73	52	ST	NVVLNVESAKGGK	294-306	1393.7296	1394.7369
								ST	SQHIRVIGDCTFGPMLAHK	353-371	2326.1207	2327.1280
								STM	SQHIRVIGDCTFGPMLAHK	353-371	2342.0627	2343.0700
						73	52	STY	GKLGGTCLNVGCIPSK	82-97	1739.7267	1740.7340
								STY	NVVLNVESAKGGK	294-306	1393.7296	1394.7369
								STY	SQHIRVIGDCTFGPMLAHK	353-371	2326.1207	2327.1280
								M / STY	SQHIRVIGDCTFGPMLAHK	353-371	2342.0627	2343.0700
Malate dehydrogenase	PAAG_00053.1	55	2h	36.02/8.99	34.66/8.73	61	24	-	***			
						61	26	ST	VSEYEQK	313-319	961.4300	962.4373
						61	24	Y	VSEYEQK	313-319	961.4300	962.4373
Isocitrate dehydrogenase subunit 2	PAAG_07729.1	135	2h	41.85/8.75	42.16/8.03	46	29	-	***			
						57	41	M / K	ATIMKMSDGLFLR	221-233	1555.7037	1556.7110
						50	30	Y	MSPLNTRCYSIAAADR	24-39	1934.7316	1935.7389
		136	6h	41.85/8.75	38.44/8.45	60	32	-	***			
						60	32	HW	VVHKATIMK	188-196	1041.5847	1042.5920
Isocitrate lyase	PAAG_06951.1	58	2h	60.14/6.79	56.66/7.70	61	36	-	***			
						71	58	K	IEYPSNVQSK	48-57	1205.6425	1206.6498
								M / K	NKTASFTYGCLEPTMLTQMVK	69-89	2519.2377	2520.2450
								K	LFIERGAA GIHIEDQAPGT K	185-204	2164.1424	2165.1497
								M / K	LA YNLSPSFNW KAAMPR	420-436	2023.1444	2024.1517
								K	MVSGGISSTSAMGKGVTEQFK	516-537	2258.0205	2259.0278
						64	45	HW	EWVQDSR	20-26	1037.4362	1038.4435
								M / HW	VNQLWMAQLFHDRK	127-140	1832.8013	1833.8086
								HW	AYGELVQEPPEMENGIDVVTHQK	482-503	2501.3401	2502.3474
						65	48	ST	AAMPRGEQET YIR	432-444	1600.6635	1601.6708
								ST	MVSGGISSTSAMGK	516-529	1631.3761	1632.3834
						65	50	M / STY	LVAIRAQADIMGTDLA VAR	224-243	2192.1829	2193.1902
								STY	AAMPRGEQET YIR	432-444	1600.6635	1601.6708
								STY	MVSGGISSTSAMGK	516-529	1631.3761	1632.3834
		59	6h	60.17/6.79	56.88/8.45	71	52	-	***			
						74	63	K	KCGHMA GK	205-212	971.4950	972.5023
								M / K	KCGHMA GK	205-212	987.4550	988.4623
								M / K	AIA YAPFADLIW MESK	382-397	1883.0386	1884.0459
						78	79	ST	LA YNLSPSFNW KAAMPR	420-436	2044.9612	2045.9685
								STM	LA YNLSPSFNW KAAMPR	420-436	2060.9021	2061.9094
						74	72	STY	KITGSDIYFDWDAAR	349-363	1916.8517	1917.8590
								STY	YRGGTQCA VNR	371-381	1440.4558	1441.4631
								STY	LA YNLSPSFNW KAAMPR	420-436	2044.9612	2045.9685
								M / STY	LA YNLSPSFNW KAAMPR	420-436	2060.9021	2061.9094

Adenosylhomocysteinase	PAAG_02859.1	67	2h	49.02/5.83	47.00/6.78	54	33	-	***									
						54	37	M / K	MSAPAHKFK	1-9	1073.5209	1074.5282						
								K	SAPAHKFK	2-9	926.5129	927.5202						
								K	NNELLVPA VNVNDSVTK	173-189	1866.9425	1867.9498						
							54	34	HW	HIILLA EGR	338-346	1036.5772	1037.5845					
							55	36	ST	SAPAHKFK	2-9	964.4724	965.4797					
						68	2h	49.51/5.93	47.00/6.89	62	33	-	***					
										63	39	K	SAPAHKFK	2-9	926.4994	927.5067		
										62	35	HW	VA VVA GFGDVGKGCALHSMGAR	218-241	2373.1900	2374.1973		
												HW	GCALHSMGAR	230-241	1273.5789	1274.5862		
										62	34	ST	ATDVMIA GKVA VVA GFGDVGK	209-229	2100.0679	2101.0752		
										62	34	Y	DIGVYVLPK	398-406	1082.5477	1083.5550		
										62	34	STY	DIGVYVLPK	398-406	1082.5477	1083.5550		
						69	6h	49.51/5.93	43.66/7.32	59	37	-	***					
				65	55	K	DIGVYVLPK	398-406	1044.5452	1045.5525								
						K	LSKLTTPK	424-430	869.5364	870.5437								
						K	LTPKQAEYLGLEINGPYK	427-444	2117.2176	2118.2249								
				59	41	M / HW	DCYGVSEETTGVHHLRMLK	152-172	2543.0891	2544.0964								
						HW	VLDEQVALHLDHVNAL	407-423	1945.1179	1946.1252								
				66	51	ST	IA GCLHMTIQTA VLIELK	51-69	2351.1089	2352.1162								
				65	46	Y	DIGVYVLPK	398-406	1082.5838	1083.5911								
						Y	AEIYRY	445-450	893.4292	894.4365								
Sulfate adenylyltransferase	PAAG_05929.1	71	2h	64.11/6.26	57.00/7.20	53	30	-										
						59	34	K	YLFTKVQEFYVGGK	146-159	1719.8681	1720.8754						
								K	TGASIPWFSYPEVVK	368-383	1850.8872	1851.8945						
							58	34	HW	SHFDKLGWSK	183-192	1219.5736	1220.5809					
									HW	ARQANVLIHPVVGKTPGDIDHFTR	216-240	2785.3887	2786.3960					
									HW	TGASIPWFSYPEVVKVLR	368-386	2193.1018	2194.1091					
								54	32	Y	YLFTKVQEFYVGGK	146-159	1837.8607	1838.8680				
										Y	GFTGVDDPYETPK	528-540	1504.6668	1505.6741				
									33	STY	GSPVLSPINRAFQII	670-685	1867.8351	1868.8424				
						73	2h	64.11/6.26	64.33/7.34	55	29	-	***					
										64	40	K	YLFTKVQEFYVGGK	146-159	1719.9357	1720.9430		
												K	SADLTVDIEK	541-550	1131.6415	1132.6488		
										55	36	HW	TGASIPWFSYPEVVKVLR	368-386	2193.1018	2194.1091		
										56	32	Y	YLFTKVQEFYVGGK	146-159	1837.8607	1838.8680		
												Y	VEA VNKLNHYDY-VALR	160-175	2063.1140	2064.1213		
						74	6h	64.11/6.26	62.88/7.84	66	40	-	***					
										65	47	K	ANKPHGGVLK	2-11	1061.6034	1062.6107		
												K	NLAILTDDVYKPKDK	113-127	1744.9230	1745.9303		
										73	51	HW	EAIWHAIIR	272-280	1123.6121	1124.6194		
				75	57	ST	YLFTKVQEFYVGGK	146-159	1758.8674	1757.8601								
						ST	AHRELTVR	205-212	1061.5798	1060.5725								
						ST	NHGATHFIVGR	282-292	1288.5677	1287.5604								
				68	49	Y	VEA VNKLNHYDYVALR	160-175	1983.8795	1982.8722								
				76	59	STY	VEA VNKLNHYDYVALR	160-175	1983.8795	1982.8722								

								STY	YPNGMAALGLLPLAMR	251-266	1799.7787	1798.7714					
								STY	NHGATHFVGR	282-292	1288.5677	1287.5604					
NAD – specific glutamate dehydrogenase	PAAG_01002.1	79	2h	126.56/6.08	108.00/7.26	36	31	-	***								
						39	37	HW		LGIPHDR	746-753	879.4257	880.4330				
						36	32	Y		QYVLGIYR	763-770	1090.5695	1091.5768				
		80	2h	121.10/6.12	40.03/7.34	64	72	-	***								
	70					95	K		CYFVYK	257-262	920.3350	921.3423					
							K		NKDIPEGGAK	649-658	1111.5695	1112.5768					
									K	KMQTGGPDGDLGSNEILLGNEK	781-802	2314.1941	2315.2014				
									K	RAMIVEFDK	831-839	1149.6016	1150.6089				
						66	81	HW		LEFEAIWREHEETGMPR	999-1015	2161.0835	2162.0908				
						68	112	ST		EGSGTGTPTTGFQRPLINK	54-73	2297.0840	2298.0913				
								STM		YGMTTLSVRQYVLGIYR	754-770	2195.1948	2196.2021				
								ST		LSIAITK	1022-1028	904.4652	905.4725				
						65	84	Y		AIYQEIIINA VAR	295-307	1552.7057	1553.7130				
								YM		YGMTTLSVRQYVLGIYR	754-770	2195.1948	2196.2021				
						68	114	STY		EGSGTGTPTTGFQRPLINK	54-73	2297.0840	2298.0913				
							STY		QPSQPTHLGIPGGTHR	85-101	1938.9274	1939.9347					
							STY		AIYQEIIINA VAR	295-307	1552.7057	1553.7130					
							M / STY		YGMTTLSVRQYVLGIYR	754-770	2114.8807	2115.8880					
							STY		MQTGGPDGDLGSNEILLGNEK	782-802	2224.1573	2225.1646					
							STY		LSIAITK	1022-1028	904.4652	905.4725					
Glycine dehydrogenase	PAAG_01568.1	81	2h	117.40/6.89	53.00/7.54	38	39	-	***								
						43	51	K		LHRDPLHGGLGETDMIK	135-151	1930.0045	1931.0118				
						39	43	HW		ATSNICTAQALLANMSAFYA VYHGP K	423-448	2814.4761	2815.4834				
								HW		MSPYLMHPVFNTHHSETEMLR	571-591	2604.1933	2605.2006				
								STM		DGMSYVVSHLCHPQTIA VMR	256-275	2396.1033	2397.1106				
								STM		IMSLTSLQDKLR	457-469	1772.7005	1773.7078				
								ST		RFWPSVTR	1039-1046	1127.5067	1128.5140				
								43	46	Y		GGGRHLALQYPR	12-23	1403.6932	1404.7005		
										YM		DGMSYVVSHLCHPQTIA VMR	256-275	2396.1033	2397.1106		
										STY		GGGRHLALQYPR	12-23	1403.6932	1404.7005		
										M / STY		DGMSYVVSHLCHPQTIA VMR	256-275	2396.1033	2397.1106		
										M / STY		IMSLTSLQDKLR	457-469	1772.7005	1773.7078		
				STY		RFWPSVTR	1039-1046	1127.5067	1128.5140								
Serine hydroxymethyl transferase	PAAG_08512.1	86	6h	58.92/8.56	48.13/8.48	48	28	-	***								
						48	28	HW		IMGLDLPHGGLSHGYQTPTK	175-195	2274.2820	2275.2893				
								HW		IMGLDLPHGGLSHGYQTPTKK	175-196	2402.4209	2403.4282				
								49	30	ST		KISA VSK	196-202	891.4461	892.4534		
								49	30	STY		KISA VSK	196-202	891.4461	892.4534		
							142	2h	58.92/8.56	52.50/8.25	35	25	-	***			
						39					31	K		LDESTGLIDYDK	211-222	1409.7360	1410.7433
							K		LAELALLYRPK	223-233	1327.8307	1328.8380					
							K		SAMKPGGLR	436-444	957.5417	958.5490					

						35	27	K	SAMKPGGLRIGTPAMTSR	436-453	1871.8783	1872.8856
						39	34	HWM	IMGLDLPHGHLSHGYQTPTKK	175-196	2434.2180	2435.2253
								ST	AVTITQK	470-476	919.3466	920.3539
Bifunctional purine biosynthesis protein ADE17	PAAG_00731.1	90	2h	64.93/7.18	63.83/7.61	69	44	-	***			
						70	54	M / K	MAQKSAILS VYDK	32-44	1552.6507	1553.6580
								K	GA DRMSSFGDLIALSDIVDVPTA K	336-359	2519.2412	2520.2485
								K	VFEEGG VPA PFTTEEREK	543-560	2063.0927	2064.1000
						71	49	HW	EA GFPVED VSA ITHA PEMLGGR	73 - 94	2298.1109	2299.1182
								M / HW	EA GFPVED VSA ITHA PEMLGGR	73 - 94	2314.1227	2315.1300
						76	69	M / ST	ADDMTLA QALKK	2 - 13	1399.5084	1400.5157
								ST	HVSPA GAAIGVPLNEKEK	294-311	1895.9020	1896.9093
								ST	MSSFGDLIALSDIVDVPTAK	340-359	2398.0340	2399.0413
								M / ST	MSSFGDLIALSDIVDVPTAK	340-359	2414.1237	2415.1310
								ST	KGGNYL VLQMDET YAPPTTEETR	386-407	2671.2791	2672.2864
								ST	IITPKFTTELPASA QR	432-447	2012.0487	2013.0560
								Y	KGGNYL VLQMDET YAPPTTEETR	386-407	2671.2791	2672.2864
	149	2h	64.93/7.18	64.50/8.12	65	34	-	***				
					72	43	M / K	KVYM VDDVA GIDESGLA QA YA R	313-334	2428.2432	2429.2505	
							K	FTTELPASA QRDLT VATIALK	438-458	2287.1573	2288.1646	
							K	YIAAPTGSQNDMPVFETA EK	593-612	2210.1577	2211.1650	
					70	39	HW	EA GFPVED VSA ITHA PEMLGGR	74-95	2298.1792	2299.1865	
							HW	LA GDKADN W WMR	489-500	1477.6869	1478.6942	
					71	48	M / ST	ADDMTLA QALKK	2-13	1399.5324	1400.5397	
							ST	AFEHTADYDEA ISDFFRK	206-223	2320.9829	2321.9902	
							ST	QSKLPFK	251-257	926.5043	927.5116	
					67	39	Y	YFFEKMAQK	28-36	1270.5408	1271.5481	
					78	78	M / STY	ADDMTLA QALKK	2-13	1399.5324	1400.5397	
							STY	YFFEKMAQK	28-36	1270.5408	1271.5481	
							STY	VTILSDPK	173-180	951.4669	952.4742	
							STY	RPEKSN AIDLLCSGQVPR	516-533	2199.0869	2200.0942	
	150	2h	67.20/6.70	64.16/8.30	53	31	-	***				
					56	39	HW	HNVRLLASGGTAK	57-69	1339.6936	1338.6863	
							HW	VLCGAPGYINLLDSLNA WPLVK	257-278	2429.2382	2428.2309	
					60	43	M / Y	GGK YLVLQMDET YNPPTEETR	387-407	2536.1445	2537.1518	
							Y	TVYGIQLSQR	408-417	1243.7134	1244.7207	
					73	56	STY	LLASGGTAK	61-69	976.4147	977.4220	
Elongation factor 1-alpha	PAAG_02024.1	92	6h	50.55/9.24	49.50/10.34	56	31	-	***			
						60	43	M / K	QLIVA INKMDTTK	148-160	1573.7578	1574.7651
								K	GW SKETAQ GK	212-221	1132.5095	1133.5168
						58	34	HW	STTTGHLIYKCGGIDSR	22 - 38	1881.0159	1882.0232
								HW	SFKYAW VLDK	54 - 63	1271.6133	1272.6206
								HW	YA W VLDK	57 - 63	909.4821	910.4894
								HW	SVEMHHQQLTA GNP GDN VGFNVK	290-312	2494.1848	2495.1921
								Y	KVGYNPK	179-185	884.4570	885.4643
		STY	KVGYNPK	179-185	884.4570	885.4643						
Elongation factor2	PAAG_00594.1	94	6h	94.15/ 6.36	88.63/8.46	39	39	-	***			
						47	48	K	QFA VKYAK	225-232	995.5073	996.5146

subunit Arc16					48	21	HW	ATWFIPGHSLETFPEECAMVR	58-78	2493.2073	2494.2146				
							HW	DA GHEIGLHGYSHENPSDMTQEQQR	79-103	2851.3269	2852.3342				
							HW	AKDWMKPLVK	175-184	1230.6741	1231.6814				
					48	21	ST	ATWFIPGHSLETFPEECAMVR	58-78	2717.2381	2718.2454				
					48	21	STY	ATWFIPGHSLETFPEECAMVR	58-78	2717.2381	2718.2454				
	110	6h	36.15/ 5.87	35.55/7.49	47	17	-	***							
					49	21	STY	TGDTWTK	162-168	967.2213	968.2286				
1.4-alpha-glucan branching enzyme	PAAG_08038.1	102	2h	80.33/5.79	78.16/6.61	44	33	-	***						
						47	35	HW	IYEAHVGISSPETR	196-209	1573.8355	1574.8428			
								HW	TIA YA ESHDQALVGDK	470-485	1732.7947	1733.8020			
								HW	YGWLRSR	591-597	952.5069	953.5142			
						46	35	Y	KDEYGVWEVTVPAK	113-126	1699.7592	1700.7665			
ssDNA binding protein	PAAG_07296.1	114	2h	16.50/8.58	14.92/10.06	83	17	-	***						
						83	18	HW	QTSWWR	68-73	894.4004	895.4077			
						173	2h	14.97/10.06	13.16/9.28	71	14	-	***		
						78	17	K	ITSFAPEGPA REHLLSLPK	74-92	2104.1267	2105.1340			
						71	16	HW	QTSWWR	68-73	894.4578	895.4651			
						HW	EHLLSLPKGTLLEYVEGDASMR	85-105	2344.2415	2345.2488					

^a Numbers refers to Figure 1

^b Time in oxidative stress condition

^c Theoretical molecular weight / Isoelectric point

^d Experimental molecular weight / Isoelectric point

^e PTM – Post-translational modifications: K – lysine acetylation; HW – tryptophan oxidation; ST – serine and threonine phosphorylation; Y – tyrosine phosphorylation; STY – Sulfonylation; M – methionine oxidation.

^f Peptide localization in protein sequence

^g Theoretical peptide molecular mass without any PTM

^h Obtained experimental mass by spectral analysis

References

- [1] Halliwell B, Biochemistry of oxidative stress, *Biochem Soc Trans* 35 (2007) 1147-1150.
- [2] Halliwell B, Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life, *Plant Physiol* 141 (2006) 312-322.
- [3] Halliwell B, Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide?, *Trends Biochem Sci* 31 (2006) 509-515.
- [4] Lushchak VI, Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals, *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 153 (2011) 175-190.
- [5] Seider K, Heyken A, Luttich A, Miramon P, Hube B, Interaction of pathogenic yeasts with phagocytes: survival, persistence and escape, *Curr Opin Microbiol* 13 (2010) 392-400.
- [6] Matute DR, McEwen JG, Puccia R, Montes BA, San-Blas G, Bagagli E, Rauscher JT, Restrepo A, Morais F, Nino-Vega G, Taylor JW, Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies, *Mol Biol Evol* 23 (2006) 65-73.
- [7] Carrero LL, Nino-Vega G, Teixeira MM, Carvalho MJ, Soares CMA, Pereira M, Jesuino RS, McEwen JG, Mendoza L, Taylor JW, Felipe MS, San-Blas G, New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen, *Fungal Genet Biol* 45 (2008) 605-612.
- [8] Teixeira MM, Theodoro RC, de Carvalho MJ, Fernandes L, Paes HC, Hahn RC, Mendoza L, Bagagli E, San-Blas G, Felipe MS, Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus, *Mol Phylogenet Evol* 52 (2009) 273-283.
- [9] San-Blas G, Nino-Vega G, Iturriaga T, *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics, *Med Mycol* 40 (2002) 225-242.
- [10] Rodrigues DR, Dias-Melicio LA, Calvi SA, Peracoli MT, Soares AM, *Paracoccidioides brasiliensis* killing by IFN-gamma, TNF-alpha and GM-CSF activated human neutrophils: role for oxygen metabolites, *Med Mycol* 45 (2007) 27-33.
- [11] Pina A, Bernardino S, Calich VL, Alveolar macrophages from susceptible mice are more competent than those of resistant mice to control initial *Paracoccidioides brasiliensis* infection, *J Leukoc Biol* 83 (2008) 1088-1099.
- [12] Tavian EG, Dias-Melicio LA, Acorci MJ, Graciani AP, Peracoli MT, Soares AM, Interleukin-15 increases *Paracoccidioides brasiliensis* killing by human neutrophils, *Cytokine* 41 (2008) 48-53.
- [13] Moreira AP, Dias-Melicio LA, Peracoli MT, Calvi SA, Victoriano de Campos Soares AM, Killing of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells by IFN-gamma and TNF-alpha activated murine peritoneal macrophages: evidence of H₂O₂ and NO effector mechanisms, *Mycopathologia* 166 (2008) 17-23.
- [14] Tavares AH, Silva SS, Dantas A, Campos EG, Andrade RV, Maranhao AQ, Brigido MM, Passos-Silva DG, Fachin AL, Teixeira SM, Passos GA, Soares CMA, Bocca AL, Carvalho MJ, Silva-Pereira I, Felipe MS, Early transcriptional response of *Paracoccidioides brasiliensis* upon internalization by murine macrophages, *Microbes Infect* 9 (2007) 583-590.
- [15] Felipe MS, Andrade RV, Arraes FB, Nicola AM, Maranhao AQ, Torres FA, Silva-Pereira I, Pocas-Fonseca MJ, Campos EG, Moraes LM, Andrade PA, Tavares AH, Silva SS, Kyaw CM, Souza

DP, Pereira M, Jesuino RS, Andrade EV, Parente JA, Oliveira GS, Barbosa MS, Martins NF, Fachin AL, Cardoso RS, Passos GA, Almeida NF, Walter ME, Soares CMA, Carvalho MJ, Brigido MM, Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells, *J Biol Chem* 280 (2005) 24706-24714.

[16] Campos EG, Jesuino RS, S. DA, M. BM, Felipe MS, Oxidative stress response in *Paracoccidioides brasiliensis*, *Genet Mol Res* 4 (2005) 409-429.

[17] Moreira SF, Bailao AM, Barbosa MS, Jesuino RS, Felipe MS, Pereira M, Soares CMA, Monofunctional catalase P of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification, characterization, molecular cloning and expression analysis, *Yeast* 21 (2004) 173-182.

[18] Dantas AS, Andrade RV, de Carvalho MJ, Felipe MS, Campos EG, Oxidative stress response in *Paracoccidioides brasiliensis*: assessing catalase and cytochrome C peroxidase, *Mycol Res* 112 (2008) 747-756.

[19] Chagas RF, Bailao AM, Pereira M, Winters MS, Smullian AG, Deepe GS, Jr., Soares CMA, The catalases of *Paracoccidioides brasiliensis* are differentially regulated: protein activity and transcript analysis, *Fungal Genet Biol* 45 (2008) 1470-1478.

[20] Rezende TC, Borges CL, Magalhaes AD, de Sousa MV, Ricart CA, Bailao AM, Soares CMA, A quantitative view of the morphological phases of *Paracoccidioides brasiliensis* using proteomics, *J Proteomics* 75 (2011) 572-587.

[21] Parente AF, Borges CL, Bailao AM, Sousa MV, Ricart CA, winters MS, Soares CMA, Proteomic analysis reveals that iron availability alters the metabolic status of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*, *PLoS One* 6 (2011) e22810.

[22] Fonseca CA, Jesuino RS, Felipe MS, Cunha DA, Brito WA, Soares CMA, Two-dimensional electrophoresis and characterization of antigens from *Paracoccidioides brasiliensis*, *Microbes Infect* 3 (2001) 535-542.

[23] Aebi H, Catalase in vitro, *Methods Enzymol* 105 (1984) 121-126.

[24] Nogueira SV, Fonseca FL, Rodrigues ML, Mundodi V, Abi-Chacra EA, Winters MS, Alderete JF, Soares CMA, *Paracoccidioides brasiliensis* enolase is a surface protein that binds plasminogen and mediates interaction of yeast forms with host cells, *Infect Immun* 78 (2010) 4040-4050.

[25] Pereira LA, Bao SN, Barbosa MS, da Silva JL, Felipe MS, de Santana JM, Mendes-Giannini MJ, Soares CMA, Analysis of the *Paracoccidioides brasiliensis* triosephosphate isomerase suggests the potential for adhesin function, *FEMS Yeast Res* 7 (2007) 1381-1388.

[26] Zambuzzi-Carvalho PF, Cruz AH, Santos-Silva LK, Goes AM, Soares CMA, Pereira M, The malate synthase of *Paracoccidioides brasiliensis* Pb01 is required in the glyoxylate cycle and in the allantoin degradation pathway, *Med Mycol* 47 (2009) 734-744.

[27] Bookout AL, Cummins CL, Mangelsdorf DJ, Pesola JM, Kramer MF, High-throughput real-time quantitative reverse transcription PCR, in: F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl (Eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Hoboken NJ, 2006, pp. 1581-1628.

[28] Messner KR, Imlay JA, Mechanism of superoxide and hydrogen peroxide formation by fumarate reductase, succinate dehydrogenase, and aspartate oxidase, *J Biol Chem* 277 (2002) 42563-42571.

- [29] Kirchberg J, Buttner D, Thiemer B, Sawers RG, Aconitase B is required for optimal growth of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in pepper plants, *PLoS One* 7 (2012) e34941.
- [30] Brown AJ, Haynes K, Quinn J, Nitrosative and oxidative stress responses in fungal pathogenicity, *Curr Opin Microbiol* 12 (2009) 384-391.
- [31] Osorio H, Carvalho E, del Valle M, Gunther Sillero MA, Moradas-Ferreira P, Sillero A, H₂O₂, but not menadione, provokes a decrease in the ATP and an increase in the inosine levels in *Saccharomyces cerevisiae*. An experimental and theoretical approach, *Eur J Biochem* 270 (2003) 1578-1589.
- [32] Li Q, Abrashev R, Harvey LM, McNeil B, Oxidative stress-associated impairment of glucose and ammonia metabolism in the filamentous fungus, *Aspergillus niger* B1-D, *Mycol Res* 112 (2008) 1049-1055.
- [33] Gruning NM, Lehrach H, Ralser M, Regulatory crosstalk of the metabolic network, *Trends Biochem Sci* 35 (2010) 220-227.
- [34] Kruger A, Gruning NM, Wamelink MM, Kerick M, Kirpy A, Parkhomchuk D, Bluemlein K, Schweiger MR, Soldatov A, Lehrach H, Jakobs C, Ralser M, The pentose phosphate pathway is a metabolic redox sensor and regulates transcription during the antioxidant response, *Antioxid Redox Signal* 15 (2011) 311-324.
- [35] Ralser M, Wamelink MM, Latkolik S, Jansen EE, Lehrach H, Jakobs C, Metabolic reconfiguration precedes transcriptional regulation in the antioxidant response, *Nat Biotechnol* 27 (2009) 604-605.
- [36] Pusztahelyi T, Klement E, Szajli E, Klem J, Miskei M, Karanyi Z, Emri T, Kovacs S, Orosz G, Kovacs KL, Medzihradzky KF, Prade RA, Pocsí I, Comparison of transcriptional and translational changes caused by long-term menadione exposure in *Aspergillus nidulans*, *Fungal Genet Biol* 48 (2011) 92-103.
- [37] Tretter L, Adam-Vizi V, Alpha-ketoglutarate dehydrogenase: a target and generator of oxidative stress, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360 (2005) 2335-2345.
- [38] Andrae U, Singh J, Ziegler-Skylakakis K, Pyruvate and related alpha-ketoacids protect mammalian cells in culture against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity, *Toxicol Lett* 28 (1985) 93-98.
- [39] Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV, Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review, *Ann Bot* 91 Spec No (2003) 179-194.
- [40] Muzio G, Maggiora M, Paiuzzi E, Oraldi M, Canuto RA, Aldehyde dehydrogenases and cell proliferation, *Free Radic Biol Med* 52 (2012) 735-746.
- [41] Li Q, McNeil B, Harvey LM, Adaptive response to oxidative stress in the filamentous fungus *Aspergillus niger* B1-D, *Free Radic Biol Med* 44 (2008) 394-402.
- [42] Kim IS, Sohn HY, Jin I, Adaptive stress response to menadione-induced oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377, *J Microbiol* 49 (2011) 816-823.
- [43] Singh R, Mailloux RJ, Puiseux-Dao S, Appanna VD, Oxidative stress evokes a metabolic adaptation that favors increased NADPH synthesis and decreased NADH production in *Pseudomonas fluorescens*, *J Bacteriol* 189 (2007) 6665-6675.

5 –DISCUSSÃO

5.1. - Indução ao estresse por H₂O₂

O emprego do H₂O₂ tem sido amplamente utilizado para induzir o estresse em diferentes microorganismos, entretanto tem-se observado o uso de diferentes concentrações de H₂O₂, levando-se em conta a sensibilidade apresentada por cada espécie. Em 1984, McEwen e colaboradores estudaram a sensibilidade apresentada por leveduras de *Paracoccidioides* ao H₂O₂ e observaram que a dose letal de 50 % era atingida quando as células leveduriformes eram submetidas às concentrações de 15-25 mM de H₂O₂ (McEwen *et al.*, 1984). Em 2008, Dantas e colaboradores descreveram que a fase estacionária e exponencial de crescimento de *Paracoccidioides* apresentava níveis diferenciados de resistência ao H₂O₂, sendo evidenciada a maior resistência para as leveduras na fase estacionária (Dantas *et al.*, 2008). De forma suplementar, Chagas e colaboradores avaliaram a viabilidade das leveduras de *Paracoccidioides* frente a diferentes concentrações de H₂O₂ e a diferentes tempos de exposição. Os resultados revelaram não haver diferenças significantes na viabilidade celular durante intervalos de até 12 horas e à exposição das células a doses inferiores a 25 mM, dados concordantes com aqueles descritos por McEwen e colaboradores. Durante a caracterização das catalases de *Paracoccidioides*, os autores utilizaram a concentração de 2 mM H₂O₂ para induzir o estresse oxidativo. Nesta concentração de 2 mM foi possível detectar-se um aumento na atividade total de catalases por até 6 horas (Chagas *et al.*, 2008).

Uma de nossas estratégias, para caracterizarmos o perfil proteômico de *Paracoccidioides* em resposta ao H₂O₂, foi avaliar a resposta inicial e tardia deste fungo após a exposição ao H₂O₂. Nos tempos de 2 e 6 horas, na concentração de 2mM H₂O₂ não foram verificadas diferenças significativas na viabilidade fúngica, sendo desta maneira estes tempos selecionados para se avaliar a resposta fúngica, aqui denominadas de inicial e tardia, respectivamente.

5.2. – Identificação das proteínas responsivas ao estresse por H₂O₂

As análises proteômicas foram realizadas por meio de protocolos previamente estabelecidos (Rezende *et al.*, 2011) os quais nos permitiram obter a reprodução dos perfis protéicos dos mapas eletroforéticos bidimensionais. O perfil protéico da resposta inicial de *Paracoccidioides* ao H₂O₂ apresentou uma média de 487 *spots*, detectados nas análises de imagem dos géis bidimensionais, dos quais 102 *spots* apresentaram diferenças estatísticas (75 *spots* apresentaram-se aumentados e

27 diminuídos). Já a resposta tardia (6 horas) foi evidenciada pela detecção de 584 spots sendo que 78 apresentaram-se estatisticamente significantes (41 spots aumentados e 37 diminuídos). A identificação por meio da espectrometria de massas nos possibilitou identificar o total de 179 spots que foram posteriormente agrupados de acordo com a classificação funcional. Abaixo estão discutidas as principais classes funcionais envolvidas na resposta fúngica ao estresse causado pelo H₂O₂.

5.2.1. – Defesa e virulência

Patógenos necessitam resistir aos efeitos citotóxicos exercidos pelas EROs e para isto estes microorganismos desenvolvem diversas estratégias, como a detoxificação por meio de enzimas antioxidantes (Missall *et al.*, 2004). Nosso estudo sobre o perfil proteômico de *Paracoccidioides* revelou que este fungo estimula respostas moleculares para resistir aos danos causados por meio da produção de várias enzimas antioxidantes que atuam na detoxificação do H₂O₂.

Como esperado, as análises mostraram que *Paracoccidioides* durante o estresse oxidativo induz a expressão da catalase peroxissomal, uma clássica enzima envolvida na resposta ao estresse oxidativo e que atua diretamente na degradação do H₂O₂. As catalases compõem o arsenal antioxidante de muitos organismos como vertebrados, plantas, fungos e bactérias. Em patógenos estas enzimas são também consideradas fatores de virulência, pois lhes conferem resistência ao estresse oxidativo e deste modo, permitem que estes sobrevivam aos efeitos de EROs dentro do hospedeiro (Johnson *et al.*, 2003; Giles *et al.*, 2006; Hansberg *et al.*, 2012). A deleção dos genes codificantes para as três catalases ativas de *Aspergillus fumigatus* (Cat1p, CatAp e Cat2p) e para a catalase 1 de *Neurospora crassa* (Cat-1) elevou a sensibilidade dos mutantes ao H₂O₂ (Navarro *et al.*, 1996; Paris *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2007) e em *C. albicans* a ruptura da sequência (CCT) do gene codificante para a catalase causou a diminuição na sobrevivência destas leveduras além do aumento na susceptibilidade ao H₂O₂ (Nakagawa *et al.*, 2003). Estes resultados indicam que catalases podem ser importantes para a sobrevivência destes fungos em condições de estresse oxidativo uma vez que participam do processo de detoxificação de H₂O₂.

Embora o papel de catalases em patógenos seja descrito, como acima citado, resultados em *Cryptococcus neoformans* descrevem que a deleção dos genes Cat1, Cat2, Cat3, e Cat4 não promoveram alterações na virulência em camundongos. Os autores do estudo sugerem que os resultados sejam decorrentes de um amplo sistema de defesa antioxidante de *Cryptococcus*

neoformans (Giles *et al.*, 2006). Desta maneira os resultados observados durante a deleção dos genes codificantes de catalases indicam que estas enzimas desempenham um importante papel na resposta antioxidante, porém outras enzimas, como as peroxidases, possivelmente atuam de modo a compensar a ausência de catalases.

A enzima Cu/Zn-SOD tem sido descrita como um fator de virulência em fungos e bactérias (Zelko *et al.*, 2002). Em *C. albicans* foram identificados os genes Sod1, Sod4, Sod5 e Sod6 como codificantes para a enzima Cu/Zn-SOD e por meio de deleções gênicas suas principais características funcionais foram avaliadas. A mutação no gene Sod1 promoveu uma linhagem mais sensível ao estresse oxidativo causado pela menadiona, mais susceptível ao ataque por macrófagos e com a virulência atenuada em camundongos. A deleção dos genes Sod4, Sod5 e Sod6 também produziu uma linhagem mais sensível ao estresse oxidativo gerado pelo radical superóxido; porém a deleção do gene Sod5 promoveu também a atenuação da virulência em modelo de infecção em murinos (Hwang *et al.*, 2002; Martchenko *et al.*, 2004). Estudos sobre superóxido dismutase em outros fungos patogênicos apresentaram resultados similares, como em *C. neoformans* var. *grubii* e *gattii*; nestes organismos foi mostrado que um homólogo de SOD1 contribui para virulência do fungo em modelos animais e para a sobrevivência em macrófagos. SOD2 também apresentou-se crucial para virulência em modelos animais. Ao ser criada a linhagem com a dupla deleção para os genes Sod1 e Sod2, verificou-se que esta linhagem mutante era mais sensível ao estresse oxidativo e que não era capaz de estabelecer a doença em modelos experimentais (Cox *et al.*, 2003; Narasipura *et al.*, 2005). Em *Paracoccidioides* a ativação do gene codificante para Cu/Zn-SOD foi determinada em leveduras internalizadas por macrófagos em cultivo, onde se verificou que os níveis transcricionais foram elevados, possivelmente em resposta estresse oxidativo no interior dos macrófagos (Tavares *et al.*, 2007).

A resposta antioxidante de *Paracoccidioides* também foi evidenciada pela indução das peroxidases: citocromo C peroxidase e AhpC (componente C de alquil hidroperóxido redutase). Citocromo C peroxidase utiliza o H₂O₂ como um aceptor de elétrons para oxidar o citocromo C no espaço intermembranar da mitocôndria. Assim, apresenta uma importante função a de reduzir o H₂O₂ gerado durante o processo de respiração. Em mutantes de *S. cerevisiae* para citocromo C peroxidase foi observado uma maior sensibilidade ao H₂O₂, porém a virulência não foi atenuada (Kwon *et al.*, 2003; Giles *et al.*, 2005). Adicionalmente o nível de expressão do gene Ccp1 foi monitorado após o tratamento com peroxinitrito e nestas condições o seu nível foi aumentado,

indicando que citocromo C peroxidase pode atuar na detoxificação de peroxinitrito (Minard & McAlister-Henn, 2001). Em *Paracoccidioides* foi verificado que a citocromo C peroxidase pode auxiliar na resistência ao estresse oxidativo por meio da detoxificação dos elevados níveis de H_2O_2 (Dantas *et al.*, 2008). A AhpC apresenta uma importante função antioxidante. Em *S. cerevisiae* a proteína AHP1 foi identificada e caracterizada como uma proteína da família AhpC/TSA peroxiredoxina. Análises de superexpressão e deleção do gene Ahp1 revelaram que esta proteína apresenta propriedades antioxidantes a hidroperóxidos. Adicionalmente, foi avaliada a importância dos sistemas tioredoxina e glutatona para a função de AHP1. A enzima apresenta a função antioxidante de maneira dependente ao sistema tioredoxina (Lee *et al.*, 1999). Em *Porphyromonas gingivalis*, *Azospirillum brasilense* e *Salmonella entérica* a proteína AhpC contribui para a proteção contra o estresse oxidativo (Okano *et al.*, 2006; Hebrard *et al.*, 2009; Wasim *et al.*, 2009). Análise proteômica de *Staphylococcus aureus* revelou que AhpC tem seus níveis de expressão elevados em resposta ao estresse por H_2O_2 , indicando que a indução desta enzima pode complementar as estratégias utilizadas no combate à EROs (Wolf *et al.*, 2008). Em *Helicobacter pylori*, também foi demonstrado que a AhpC é uma importante enzima antioxidante. Durante os ensaios com mutantes nulo para AhpC foi observado que a atividade da catalase era parcialmente inativada. Após investigações, foi identificado que na linhagem mutante havia o acúmulo de hidroperóxidos orgânicos, os substratos da AhpC e que estes substratos inativavam parcialmente a catalase. Estes dados revelaram haver uma via alternativa na detoxificação de hidroperóxidos orgânicos, consequentemente inibindo a inativação da catalase (Wang *et al.*, 2004). Em *C. albicans* foi também demonstrado que AhpC, bem como as enzimas do sistema tioredoxina são induzidas durante a formação do biofilme indicando que, nestas condições, estas leveduras possam resistir ao estresse oxidativo e aos antifúngicos comumente utilizados por meio da indução de enzimas antioxidantes (Seneviratne *et al.*, 2008). Em *Paracoccidioides* ainda não há estudos sobre a função de AhpC, porém a sua sequência codificante foi descrita e relacionada ao estresse oxidativo (Felipe *et al.*, 2003; Campos *et al.*, 2005; Felipe *et al.*, 2005b).

O sistema tioredoxina é composto por diversas moléculas que interagem com resíduos de cisteína, sendo um dos principais reguladores no processo de redução de tiois na célula. EROs modulam o estado tiol-redox celular e neste contexto, o sistema tioredoxina torna-se muito importante, uma vez que pode restaurar o balanço entre redução e oxidação celular, favorecendo

assim o funcionamento normal da célula em condições de estresse (Yoshihara *et al.*, 2010). Em *S. cerevisiae* observou-se que a superexpressão do gene codificante para a tioredoxina aumenta a defesa redox (Gomez-Pastor *et al.*, 2010) e que o sistema tioredoxina pode funcionar como uma alternativa na redução da glutatona oxidada *in vivo*, o que aumentaria a resistência desta leveduras ao estresse oxidativo (Tan *et al.*, 2010). Yoshihara e colaboradores verificaram que o sistema tioredoxina não atua simplesmente como um detoxificador de EROs, mas também como um importante regulador da resposta ao estresse oxidativo por meio da interação proteína-proteína. Um exemplo é a interação entre a peroxiredoxina e o sistema tioredoxina que, quando associados, atuam degradando o H_2O_2 (Yoshihara *et al.*, 2010). Três isoformas de tioredoxina foram responsivas ao estresse oxidativo indicando que *Paracoccidioides* também tenha utilizado estas enzimas como parte do arsenal antioxidante conseguindo, possivelmente, neutralizar o H_2O_2 e os efeitos causados por este.

As enzimas antioxidantes supracitadas caracterizaram a principal resposta de *Paracoccidioides* ao estresse oxidativo. Os níveis aumentados destas enzimas sugerem que este fungo respondeu ao tratamento com H_2O_2 ativando várias vias do complexo sistema antioxidante, as quais indicam ter detoxificado o H_2O_2 .

Para resistir ao estresse oxidativo *Paracoccidioides* parece ter induzido não somente o sistema antioxidante primário, composto pelas enzimas antioxidantes, mas também o sistema antioxidante secundário, composto por moléculas que atuam no reparo dos danos causados pelas EROs. As chaperonas são exemplos de moléculas antioxidantes secundárias que possivelmente atuaram no reparo aos danos causados pelo H_2O_2 . As chaperonas são importantes para a célula tanto em condições normais quanto em condições de estresse, quando a oxidação de diversas proteínas pode ser ocasionada. Estas chaperonas atuam corrigindo o enovelamento de proteínas oxidadas e também atuam no transporte de proteínas às organelas específicas como aos lisossomos (Godon *et al.*, 1998; Riezman, 2004).

As proteínas do choque térmico são geralmente consideradas chaperonas devido a sua habilidade em enovelar e restaurar o enovelamento de proteínas, um processo crítico observado em diferentes condições de estresse (Brosnan *et al.*, 2000). Kim e colaboradores avaliaram a resposta adaptativa de *S. cerevisiae* ao estresse oxidativo e puderam observar que as proteínas do choque térmico apresentavam-se induzidas e também reprimidas. Os autores sugerem que a

repressão foi devido a possíveis carbonilações sofridas por estas proteínas, já que são proteínas-alvo de danos oxidativos (Kim *et al.*, 2011; Pusztahelyi *et al.*, 2011).

Outro aspecto relacionado à defesa e virulência apresentada por *Paracoccidioides* foi a indução da proteína dehalogenase haloácida (*Haloacid Dehalogenase* -HAD). Esta proteína ainda não foi caracterizada como responsiva ao estresse causado pelo H₂O₂, entretanto sua importância tem sido descrita e relacionada ao processo de invasão fúngica ao hospedeiro. Um estágio crucial durante o processo infeccioso é a adesão de *Paracoccidioides* às células epiteliais pulmonares, e neste contexto as proteínas da família HAD tem se apresentado como importantes adesinas. Por meio do silenciamento de genes (Interferência em RNAs- iRNA) em *Paracoccidioides* verificou-se que a *PbHAD32* (*HAD-superfamily hydrolase* - PADG_02181) favorece a adesão fúngica às células epiteliais humanas e aumenta a virulência do fungo em modelos de infecção experimental. Os autores sugerem que esta proteína se liga à matriz extracelular e modula a resposta imune inicial para a evasão das defesas sendo, portanto, um fator de virulência durante a interação inicial do fungo com o hospedeiro (Hernandez *et al.*, 2010) sugerindo que esta também auxilie *Paracoccidioides* a se estabelecer, possivelmente resistindo ao estresse encontrado no hospedeiro.

Embora as aldeído desidrogenases sejam classicamente relacionadas ao metabolismo de ácidos graxos, são também moléculas antioxidantes e responsivas a várias condições de estresse (Brocker *et al.*, 2010; Muzio *et al.*, 2012). Aldeído desidrogenases detoxificam os aldeídos gerados pelo estresse e ajudam a manter o equilíbrio redox intracelular (Blokhina *et al.*, 2003; Muzio *et al.*, 2012). De forma similar, betaína aldeído desidrogenase foi categorizada em defesa e virulência celular por ser uma oxidoreductase e por apresentar proteção frente à condição de estresse, já que produz glicina betaína e NADPH (Munoz-Clares *et al.*, 2010).

5.2.2. – Energia e metabolismo

Foram observadas mudanças na expressão de proteínas envolvidas com o metabolismo, sugerindo que *Paracoccidioides* tenha provavelmente redirecionado o fluxo metabólico em resposta ao estresse oxidativo. Em uma revisão da literatura, Gruning e colaboradores descreveram que alterações metabólicas são cruciais na resposta ao estresse oxidativo, uma vez que o redirecionado o fluxo metabólico da glicólise para a via das pentoses fosfato funciona como um estabilizador imediato do estado redox celular. Ao ser exposta ao estresse oxidativo, a

célula aumenta a produção de NADPH, um importante redutor celular, por meio da ativação da via das pentoses fosfato (Grüning *et al.*, 2010).

Sugere-se que a via das pentoses fosfato funcione como um regulador-chave da resposta ao estresse oxidativo, sendo ativada por meio do rearranjo dinâmico no fluxo metabólico (Ralser *et al.*, 2007; Grant, 2008). *Paracoccidioides* parece ter ativado a via das pentoses fosfato, pois em seu perfil proteômico foram identificadas as enzimas transcetolase, transaldolase e fosfogluconato desidrogenase com um aumento significativo na expressão, indicando que *Paracoccidioides*, a exemplo de outros microorganismos, ativou a via das pentoses fosfato em resposta ao estresse oxidativo causado pelo H₂O₂. No entanto, para controlar a homeostase celular em condições de estresse oxidativo, a célula necessita fornecer um ambiente redutor para que as enzimas antioxidantes possam ser ativadas e consequentemente consigam manter o estado redox em equilíbrio (Grüning *et al.*, 2010; Kruger *et al.*, 2011) Os níveis de NADPH apresentados por *Paracoccidioides* durante o estresse oxidativo foram aumentados, indicando que o potencial redutor foi aumentado em resposta ao estresse, fato observado também em *S. cerevisiae* e *P. fluorescens* durante o estresse oxidativo (Singh *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2011).

NADH também é muito importante no combate ao estresse oxidativo, pois semelhantemente ao NADPH esta molécula também atua como um agente redutor. Estudos em *P. fluorescens*, descrevem a importância de enzimas produtoras de NADH, especialmente a α -cetoglutarato desidrogenase. Esta enzima tem uma importante função no combate ao estresse por atuar na produção de NADH e pela detoxificação de EROs por meio da α -cetoglutarato, uma proteína antioxidante. Quando exposta ao estresse por H₂O₂, *P. fluorescens* altera seu metabolismo aumentando a produção de α -cetoglutarato (Lemire *et al.*, 2010). Adicionalmente a importância da α -cetoglutarato desidrogenase para o combate ao estresse oxidativo foi também descrita em células de mamíferos tratadas com H₂O₂ (Andrae *et al.*, 1985; Desagher *et al.*, 1997). Em *Paracoccidioides* esta enzima também se mostrou ser importante na resposta ao estresse, pois foi identificada como responsiva ao tratamento com o H₂O₂ e sua ativação pode ter detoxificado EROs ou ter favorecido a produção de NADH.

A identificação das enzimas piruvato carboxilase, malato desidrogenase e fosfoenolpiruvato carboxiquinase também apontam para o redirecionamento no fluxo metabólico em *Paracoccidioides*. A resposta protetora ao estresse ocorreria por meio da transferência de elétrons

de NADH mitocondrial para NAD citosólico empregando-se as enzimas piruvato carboxilase, malato desidrogenase e fosfoenolpiruvato carboxiquinase, restaurando assim o potencial redox por meio da produção de NADH (Lehninger *et al.*, 2005; Grüning *et al.*, 2010).

A biossíntese de alguns aminoácidos é relevante para a resposta ao estresse oxidativo. A biossíntese de cisteína tem sido reportada em *A. nidulans* demonstrando ser uma das estratégias utilizadas por este fungo para resistir ao estresse oxidativo (Pusztahelyi *et al.*, 2011). Em *Paracoccidioides* a sulfato adeniltransferase foi induzida após a exposição ao H₂O₂. Esta enzima cataliza a produção de adenosina 5'- fosfosulfato por meio dos ions sulfato e de ATP; esta reação possibilita biossíntese cisteína a partir de serina. A serina, por sua vez é a precursora da glicina, que é formada após a remoção de um átomo de carbono por meio da enzima serina hidroximetil transferase, induzida também por *Paracoccidioides* em resposta ao estresse. A glicina desidrogenase também foi responsiva ao estresse em *Paracoccidioides* e atua catalisando a conversão redutora de glioxalato à glicina, que por sua vez é um precursor para a síntese de glutaciona (Penninckx, 2000; Grüning *et al.*, 2010). A via biossintética de aminoácidos contendo enxofre foi representada pela adenosilhomocisteinase e pela metionina sintase independente de cobalamina, enquanto que a biossíntese do glutamato foi evidenciada pela indução da enzima glutamato desidrogenase. Tomando estes dados em conjunto, podemos sugerir que *Paracoccidioides* aumentou a expressão de enzimas relacionadas à síntese de cisteína, glicina e glutamato, possivelmente para ofertar quantidades suficientes destes aminoácidos aos diferentes processos celulares, como para a produção de moléculas antioxidantes, por exemplo, a glutaciona.

Em fungos, durante o estresse oxidativo, a captação de amônia e glicose são reduzidas (Osorio *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2008a). Embora a amônia seja um componente importante para a biossíntese de compostos nitrogenados, a sua presença tem sido envolvida com a indução do estresse oxidativo e nitrosativo, em células mamíferas. Estudos indicam que a amônia aumenta a produção de superóxido e diminui a atividade antioxidante das enzimas glutaciona peroxidase, SOD e catalase (Norenberg, 2003; Skowronska & Albrecht, 2012), sugerindo que em *Paracoccidioides* a indução da enzima glutamato desidrogenase esteja possivelmente relacionada à assimilação de nitrogênio e a biossíntese de glutamato. Outras enzimas relacionadas ao metabolismo de nitrogênio foram induzidas em *Paracoccidioides*, como a 2 nitropropano-dioxigenase e a O-acetylhomoserine (tiol)-liase. A captação de glicose também parece estar diminuída uma vez que as enzimas frutose 1,6 bifosfatase, fosfoenolpiruvato carboxiquinase e

piruvato carboxilase, pertencentes à gliconeogênese, foram induzidas durante a resposta de *Paracoccidioides* ao estresse. Estes resultados indicam que, semelhantemente às observações de Li e colaboradores (Li *et al.*, 2008a), *Paracoccidioides* também parece ter a captação de glicose reduzida durante o estresse oxidativo.

Adicionalmente, foi identificada a regulação negativa de algumas proteínas que poderiam ser fontes endógenas de EROs. As enzimas mitocondriais citocromo C oxidase e fumarato redutase foram reprimidas possivelmente para evitar a produção de EROs durante a fosforilação oxidativa na cadeia respiratória. A enzima carnitina O-acetiltransferase e as isoformas da enzima enoil CoA hidratase tiveram suas expressões diminuídas provavelmente para evitar a formação de H₂O₂ durante os processos de β-oxidação de ácidos graxos.

O perfil protéico de *Paracoccidioides* caracterizou-se principalmente pelo aumento na expressão de proteínas relacionadas à defesa e virulência, ao ciclo do ácido tricarboxílico e à via das pentoses fosfato.

5.2.3. – Transcrição, síntese protéica e ciclo celular/processamento de DNA

Diferentes estudos sobre a resposta ao estresse oxidativo tem demonstrado haver uma resposta comum ao estresse. Neste contexto, Gash e colaboradores identificaram aproximadamente 600 genes responsivos a estresse com regulação negativa. Estes genes foram agrupados e correlacionados principalmente com os processos envolvidos com o crescimento celular, isto é, relacionados com os vários aspectos do metabolismo de RNA, por exemplo, síntese e processamento de tRNA, iniciação e alongação da tradução e processamento e *splicing* de RNA, bem como de genes codificantes para proteínas ribossomais (Gasch *et al.*, 2000). Em nossas análises também foi possível identificar a diminuição na expressão de proteínas ribossomais (categorizadas em síntese protéica) e de proteínas relacionadas à transcrição e ao ciclo celular/processamento de DNA; entretanto a concordância não foi aplicável para as proteínas envolvidas no processo de iniciação e alongação da tradução (fator 1A e 4E-1 da iniciação da tradução eucariótica e o fator 1α e 2 da alongação) uma vez que estas apresentaram-se induzidas durante a resposta de *Paracoccidioides* ao estresse oxidativo, demonstrando que embora haja elementos comuns na resposta ao estresse, observa-se peculiaridades da resposta que possivelmente diferenciem a sensibilidade apresentada por cada espécie a uma mesma condição de estresse.

5.3. – Oxidoreductases

Outra classe de enzimas importantes para a resposta ao estresse oxidativo são as oxidoreductases. Estas enzimas contribuem para a manutenção do estado redox celular mediante a transferência de elétrons a partir de uma molécula oxidante para outra redutora. Essas enzimas compõem o sistema redox, geralmente utilizam NAD(P)H como fonte redutora para proteger macromoléculas e estruturas celulares contra os danos causados pelo estresse oxidativo (Thon *et al.*, 2007; Fomenko & Gladyshev, 2012). Identificamos a indução de 34 oxidoreductases no perfil proteômico *Paracoccidioides*, indicando-nos que estas proteínas favoreceram a adaptação deste fungo ao estresse oxidativo inicial e tardio.

6 – CONCLUSÕES

Este trabalho foi o primeiro a caracterizar o perfil proteômico de *Paracoccidioides* em resposta ao estresse oxidativo causado pelo H₂O₂. Foram identificadas 179 proteínas diferencialmente expressas, sendo 102 em resposta ao estresse inicial (2 horas) e 77 responsivas ao estresse tardio (6 horas). A análise proteômica nos possibilitou estudar os eventos moleculares associados à resposta adaptativa de *Paracoccidioides* durante o estresse oxidativo. Foi observada a proeminente ativação das enzimas antioxidantes bem como o remodelamento do metabolismo do fungo evidenciado pela indução de vias fornecedoras de NAD(P)H, um substrato redutor utilizado no combate aos efeitos oxidativos promovido pelo H₂O₂. Adicionalmente, foram observadas alterações no metabolismo por meio da ativação de enzimas da gliconeogênese e da biossíntese de aminoácidos que são normalmente utilizados na composição de moléculas antioxidantes. Em contrapartida, foi observada a repressão de enzimas que poderiam contribuir com a produção endógena de EROs, como aquelas envolvidas na cadeia respiratória e aquelas que participam dos processos de β-oxidação, demonstrando desta forma que *Paracoccidioides* utilizou diferentes estratégias para combater o estresse oxidativo.

Nosso estudo revelou que *Paracoccidioides* possui um amplo repertório antioxidante, composto por diferentes proteínas que atuam de maneira complementar e que foram capazes de detoxificar as EROs e de minimizar os efeitos causados pelo estresse oxidativo.

7 – PERSPECTIVAS

1. Realizar experimentos visando à transformação de *Paracoccidioides* mediada por *Agrobacterium tumefaciens* para análise de silenciamento de genes alvos para o estresse oxidativo, como o silenciamento do gene codificantes para citocromo C peroxidase.
2. Selecionar mutantes sensíveis ao estresse oxidativo e caracterizá-los.
3. Realizar ensaios de virulência utilizando os transformantes.
4. Analisar os níveis transcricionais de *Paracoccidioides* em resposta ao H₂O₂ por meio do seqüenciamento de alta performance.

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrae, U., Singh, J., and Ziegler-Skylakakis, K. (1985). Pyruvate and related alpha-ketoacids protect mammalian cells in culture against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity. *Toxicol Lett* 28, 93-98.
- Bagagli, E., Franco, M., Bosco Sde, M., Hebelar-Barbosa, F., Trinca, L.A., and Montenegro, M.R. (2003). High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. *Med Mycol* 41, 217-223.
- Bailao, A.M., Schrank, A., Borges, C.L., Dutra, V., Molinari-Madlum, E.E.W.I, Felipe, M.S., Mendes-Giannini, M.J.S., Martins, W.S., Pereira, M., and Soares, C.M.A. (2006). Differential gene expression by *Paracoccidioides brasiliensis* in host interaction conditions: representational difference analysis identifies candidate genes associated with fungal pathogenesis. *Microbes Infect* 8, 2686-2697.
- Bailao, A.M., Shrank, A., Borges, C.L., Parente, J.A., Dutra, V., Felipe, M.S., Fiuza, R.B., Pereira, M., and Soares, C.M.A. (2007). The transcriptional profile of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells is influenced by human plasma. *FEMS Immunol Med Microbiol* 51, 43-57.
- Barreiros, A.L.B.S., David, J.M., and David, J.P. (2006). Oxidative stress: relations between the formation of reactive species and the organism's defense. *Quím Nova* 29.
- Battistuzzi, G., Bellei, M., Bortolotti, C.A., and Sola, M. (2010). Redox properties of heme peroxidases. *Arch Biochem Biophys* 500, 21-36.
- Belozerskaia, T.A., and Gessler, N.N. (2007). Reactive oxygen species and the strategy of the antioxidant defense in fungi: a review. *Prikl Biokhim Mikrobiol* 43, 565-575.
- Bienert, G.P., Moller, A.L., Kristiansen, K.A., Schulz, A., Moller, I.M., Schjoerring, J.K., and Jahn, T.P. (2007). Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *J Biol Chem* 282, 1183-1192.
- Bindoli, A., Fukuto, J.M., and Forman, H.J. (2008). Thiol chemistry in peroxidase catalysis and redox signaling. *Antioxid Redox Signal* 10, 1549-1564.
- Blokhina, O., Virolainen, E., and Fagerstedt, K.V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot* 91 *Spec No*, 179-194.
- Blotta, M.H., Mamoni, R.L., Oliveira, S.J., Nouer, S.A., Papaiordanou, P.M., Goveia, A., and Camargo, Z.P. (1999). Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. *Am J Trop Med Hyg* 61, 390-394.
- Bogdan, C. (2007). Oxidative burst without phagocytes: the role of respiratory proteins. *Nat Immunol* 8, 1029-1031.
- Branco, M.R., Marinho, H.S., Cyrne, L., and Antunes, F. (2004). Decrease of H₂O₂ plasma membrane permeability during adaptation to H₂O₂ in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 279, 6501-6506.
- Brocker, C., Lassen, N., Estey, T., Pappa, A., Cantore, M., Orlova, V.V., Chavakis, T., Kavanagh, K.L., Oppermann, U., and Vasiliou, V. (2010). Aldehyde dehydrogenase 7A1 (ALDH7A1) is a novel enzyme involved in cellular defense against hyperosmotic stress. *J Biol Chem* 285, 18452-18463.

- Brosnan, M.P., Donnelly, D., James, T.C., and Bond, U. (2000). The stress response is repressed during fermentation in brewery strains of yeast. *J Appl Microbiol* 88, 746-755.
- Brown, A.J., Haynes, K., and Quinn, J. (2009). Nitrosative and oxidative stress responses in fungal pathogenicity. *Curr Opin Microbiol* 12, 384-391.
- Brummer, E., Castaneda, E., and Restrepo, A. (1993). Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev* 6, 89-117.
- Buitrago, M.J., Bernal-Martinez, L., Castelli, M.V., Rodriguez-Tudela, J.L., and Cuenca-Estrella, M. (2011). Histoplasmosis and paracoccidioidomycosis in a non-endemic area: a review of cases and diagnosis. *J Travel Med* 18, 26-33.
- But, P.G., Murav'ev, R.A., Fomina, V.A., and Rogovin, V.V. (2002). Antimicrobial activity of myeloperoxidase from neutrophil peroxisome. *Izv Akad Nauk Ser Biol*, 266-270.
- Campos, E.G., Jesuino, R.S., Dantas A., S., Brigido M.M., and Felipe, M.S. (2005). Oxidative stress response in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Genet Mol Res* 4, 409-429.
- Carbonell, L.M., and Rodriguez, J. (1965). Transformation of Mycelial and Yeast Forms of *Paracoccidioides brasiliensis* in Cultures and in Experimental Inoculations. *J Bacteriol* 90, 504-510.
- Carrero, L.L., Nino-Vega, G., Teixeira, M.M., Carvalho, M.J., Soares, C.M.A., Pereira, M., Jesuino, R.S., McEwen, J.G., Mendoza, L., Taylor, J.W., Felipe, M.S., and San-Blas, G. (2008). New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. *Fungal Genet Biol* 45, 605-612.
- Chagas, R.F., Bailao, A.M., Pereira, M., Winters, M.S., Smullian, A.G., Deepe, G.S.Jr., and Soares, C.M.A. (2008). The catalases of *Paracoccidioides brasiliensis* are differentially regulated: protein activity and transcript analysis. *Fungal Genet Biol*, 1470-1478.
- Chauhan, N., Latge, J.P., and Calderone, R. (2006). Signalling and oxidant adaptation in *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Nat Rev Microbiol* 4, 435-444.
- Chelikani, P., Carpena, X., Perez-Luque, R., Donald, L.J., Duckworth, H.W., Switala, J., Fita, I., and Loewen, P.C. (2005). Characterization of a large subunit catalase truncated by proteolytic cleavage. *Biochemistry* 44, 5597-5605.
- Collinson, L.P., and Dawes, I.W. (1992). Inducibility of the response of yeast cells to peroxide stress. *J Gen Microbiol* 138, 329-335.
- Costa, M., Borges, C.L., Bailao, A.M., Meirelles, G.V., Mendonca, Y.A., Dantas, S.F., de Faria, F.P., Felipe, M.S., Molinari-Madlum, E.E., Mendes-Giannini, M.J., Fiuza, R.B., Martins W.S., Pereira, M. and Soares, C.M.A. (2007). Transcriptome profiling of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast-phase cells recovered from infected mice brings new insights into fungal response upon host interaction. *Microbiology* 153, 4194-4207.
- Costa, V.M., Amorim, M.A., Quintanilha, A., and Moradas-Ferreira, P. (2002). Hydrogen peroxide-induced carbonylation of key metabolic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*: the involvement of the oxidative stress response regulators Yap1 and Skn7. *Free Radic Biol Med* 33, 1507-1515.

- Coutinho, Z.F., Silva, D., Lazera, M., Petri, V., Oliveira, R.M., Sabroza, P.C., and Wanke, B. (2002). Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad Saude Publica* 18, 1441-1454.
- Cox, G.M., Harrison, T.S., McDade, H.C., Taborda, C.P., Heinrich, G., Casadevall, A., and Perfect, J.R. (2003). Superoxide dismutase influences the virulence of *Cryptococcus neoformans* by affecting growth within macrophages. *Infect Immun* 71, 173-180.
- Cruz, W.A.S. (2010). Atividade de mieloperoxidase e produção de oxigênio singlete em neutrófilo e células monocíticas. In Faculdade de Ciências Farmacêuticas (São Paulo, Universidade de São Paulo), pp. 1-60.
- Culotta, V.C. (2000). Superoxide dismutase, oxidative stress, and cell metabolism. *Curr Top Cell Regul* 36, 117-132.
- da Fonseca, C.A., Jesuino, R.S., Felipe, M.S., Cunha, D.A., Brito, W.A., and Soares, C.M.A. (2001). Two-dimensional electrophoresis and characterization of antigens from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect* 3, 535-542.
- Dantas, A., Andrade, R.V., de Carvalho, M.J., Felipe, M.S., and Campos, E.G. (2008). Oxidative stress response in *Paracoccidioides brasiliensis*: assessing catalase and cytochrome c peroxidase. *Mycol Res* 112, 747-756.
- de Farias, M.R., Condas, L.A., Ribeiro, M.G., Bosco Sde, M., Muro, M.D., Werner, J., Theodoro, R.C., Bagagli, E., Marques, S.A., and Franco, M. (2011). Paracoccidioidomycosis in a dog: case report of generalized lymphadenomegaly. *Mycopathologia* 172, 147-152.
- Desagher, S., Glowinski, J., and Premont, J. (1997). Pyruvate protects neurons against hydrogen peroxide-induced toxicity. *J Neurosci* 17, 9060-9067.
- Dominguez, L., Sosa-Peinado, A., and Hansberg, W. (2010). Catalase evolved to concentrate H₂O₂ at its active site. *Arch Biochem Biophys* 500, 82-91.
- Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82, 47-95.
- Elsayed, N.M. (2001). Antioxidant mobilization in response to oxidative stress: a dynamic environmental-nutritional interaction. *Nutrition* 17, 828-834.
- Fang, F.C. (2004). Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat Rev Microbiol* 2, 820-832.
- Fedoroff, N. (2006). Redox regulatory mechanisms in cellular stress responses. *Ann Bot* 98, 289-300.
- Felipe, M.S., Andrade, R.V., Arraes, F.B., Nicola, A.M., Maranhao, A.Q., Torres, F.A., Silva-Pereira, I., Pocas-Fonseca, M.J., Campos, E.G., Moraes, L.M., Andrade, P.A., Tavares, A.H., Silva, S.S., Kyaw, C.M., Souza, D.P., Pereira, M., Jesuino R.S., Andrade, E.V., Parente, J.A., Oliveira, G.S., Barbosa, M.S., Martins, N.F., Fachin, A.L., Cardoso, R.S., Passos, G.A., Almeida, N.F., Walter, M.E., Soares, C.M.A., Carvalho, M.J., and Brigido, M.M. (2005a). Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. *J Biol Chem* 280, 24706-24714.

Felipe, M.S., Andrade, R.V., Petrofeza, S.S., Maranhao, A.Q., Torres, F.A., Albuquerque, P., Arraes, F.B., Arruda, M., Azevedo, M.O., Baptista, A.J., Bataus, L.A.M., Borges, C.L., Campos, E.G., Cruz, Daher, M.R.B.S., Dantas, A., Ferreira, M.A.S.V., Ghil, G.V., Jesuino, R.S.A., Kyaw, C.M., Leitao, L., Martins, C.R., Moraes, L.M.P., Neves, E.O., Nicola, A.M., Alves, E.S., Parente, J.A., Pereira, M., Pocas-Fonseca, M.J., Resende, R., Ribeiro, B.M., Saldanha, R.R., Santos, S.C., Silva-Pereira, I., Silva, M.A.S., Silveira, E., Simoes, I. C., Soares, R.B.A., Souza, D.P.M., De-Souza, T., Andrade, E.V., Xavier, M.A.S., Veiga, H.P., Venancio, E.J., Carvalho, M.J.A., Oliveira, A.G., Inoue, M.K., Almeida, N.F., Walter, M.E.M.T., Soares, C.M.A., and Brígido, M.M. (2003). Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. *Yeast* 20, 263-271.

Felipe, M.S., Torres, F.A., Maranhao, A.Q., Silva-Pereira, I., Pocas-Fonseca, M.J., Campos, E.G., Moraes, L.M., Arraes, F.B., Carvalho, M.J., Andrade, R.V., Nicola, A.M., Teixeira, M.M., Jesuino, R.S., Pereira, M., Soares, C.M.A., and Brígido, M.M. (2005b). Functional genome of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 45, 369-381.

Fomenko, D.E., and Gladyshev, V.N. (2012). Comparative genomics of thiol oxidoreductases reveals widespread and essential functions of thiol-based redox control of cellular processes. *Antioxid Redox Signal* 16, 193-201.

Forman, H.J., and Azzi, A. (1997). On the virtual existence of superoxide anions in mitochondria: thoughts regarding its role in pathophysiology. *FASEB J* 11, 374-375.

Forman, H.J., and Torres, M. (2001). Redox signaling in macrophages. *Mol Aspects Med* 22, 189-216.

Franco, L., Najvar, L., Gomez, B.L., Restrepo, S., Graybill, J.R., and Restrepo, A. (1998). Experimental pulmonary fibrosis induced by *Paracoccidioides brasiliensis* conidia: measurement of local host responses. *Am J Trop Med Hyg* 58, 424-430.

Franco, M., Montenegro, M.R., Mendes, R.P., Marques, S.A., Dillon, N.L., and Mota, N.G. (1987). Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 20, 129-132.

Garcia-Leiro, A., Cerdan, M.E., and Gonzalez-Siso, M.I. (2010). Proteomic analysis of the oxidative stress response in *Kluyveromyces lactis* and effect of glutathione reductase depletion. *J Proteome Res* 9, 2358-2376.

Gasch, A.P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmel-Harel, O., Eisen, M.B., Storz, G., Botstein, D., and Brown, P.O. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell* 11, 4241-4257.

Giles, S.S., Perfect, J.R., and Cox, G.M. (2005). Cytochrome c peroxidase contributes to the antioxidant defense of *Cryptococcus neoformans*. *Fungal Genet Biol* 42, 20-29.

Giles, S.S., Stajich, J.E., Nichols, C., Gerrald, Q.D., Alspaugh, J.A., Dietrich, F., and Perfect, J.R. (2006). The *Cryptococcus neoformans* catalase gene family and its role in antioxidant defense. *Eukaryot Cell* 5, 1447-1459.

Giorgio, M., Trinei, M., Migliaccio, E., and Pelicci, P.G. (2007). Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 722-728.

- Giraldo, R., Restrepo, A., Gutierrez, F., Robledo, M., Londono, F., Hernandez, H., Sierra, F., and Calle, G. (1976). Pathogenesis of paracoccidioidomycosis: a model based on the study of 46 patients. *Mycopathologia* 58, 63-70.
- Godon, C., Lagniel, G., Lee, J., Buhler, J.M., Kieffer, S., Perrot, M., Boucherie, H., Toledano, M.B., and Labarre, J. (1998). The H₂O₂ stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 273, 22480-22489.
- Gomez-Pastor, R., Perez-Torrado, R., Cabisco, E., Ros, J., and Matallana, E. (2010). Reduction of oxidative cellular damage by overexpression of the thioredoxin TRX2 gene improves yield and quality of wine yeast dry active biomass. *Microb Cell Fact* 9, 9.
- Gonzalez, J.F., Montiel, N.A., and Maass, R.L. (2010). First report on the diagnosis and treatment of encephalic and urinary paracoccidioidomycosis in a cat. *J Feline Med Surg* 12, 659-662.
- Grant, C.M. (2008). Metabolic reconfiguration is a regulated response to oxidative stress. *J Biol* 7, 1.
- Graves, P.R., and Haystead, T.A. (2002). Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol Mol Biol Rev* 66, 39-63; table of contents.
- Grivennikova, V.G., and Vinogradov, A.D. (2006). Generation of superoxide by the mitochondrial Complex I. *Biochim Biophys Acta* 1757, 553-561.
- Grüning, N.-M., Lehrach, H., and Ralser, M. (2010). Regulatory crosstalk of the metabolic network. *Trends in Biochemical Sciences* 35, 220-227.
- Gutteridge, J.M., and Halliwell, B. (1989). Iron toxicity and oxygen radicals. *Baillieres Clin Haematol* 2, 195-256.
- Gutteridge, J.M., and Halliwell, B. (2000). Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci* 899, 136-147.
- Gutteridge, J.M., and Halliwell, B. (2010). Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochem Biophys Res Commun* 393, 561-564.
- Halliwell, B. (2006a). Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide? *Trends Biochem Sci* 31, 509-515.
- Halliwell, B. (2006b). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 141, 312-322.
- Halliwell, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans* 35, 1147-1150.
- Halliwell, B. (2011). Free radicals and antioxidants - quo vadis? *Trends Pharmacol Sci* 32, 125-130.
- Halliwell, B., Clement, M.V., Ramalingam, J., and Long, L.H. (2000). Hydrogen peroxide. Ubiquitous in cell culture and in vivo? *IUBMB Life* 50, 251-257.
- Hansberg, W., Salas-Lizana, R., and Dominguez, L. (2012). Fungal catalases: function, phylogenetic origin and structure. *Arch Biochem Biophys* 525, 170-180.

- Hebrard, M., Viala, J.P., Meresse, S., Barras, F., and Aussel, L. (2009). Redundant hydrogen peroxide scavengers contribute to *Salmonella* virulence and oxidative stress resistance. *J Bacteriol* *191*, 4605-4614.
- Hernandez, O., Almeida, A.J., Gonzalez, A., Garcia, A.M., Tamayo, D., Cano, L.E., Restrepo, A., and McEwen, J.G. (2010). A 32-KDa hydrolase plays an important role in *Paracoccidioides brasiliensis* adherence to host cells and influences pathogenicity. *Infect Immun*.
- Herrero, E., Ros, J., Belli, G., and Cabisco, E. (2008). Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochim Biophys Acta* *1780*, 1217-1235.
- Hwang, C.S., Rhie, G.E., Oh, J.H., Huh, W.K., Yim, H.S., and Kang, S.O. (2002). Copper- and zinc-containing superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) is required for the protection of *Candida albicans* against oxidative stresses and the expression of its full virulence. *Microbiology* *148*, 3705-3713.
- Jamieson, D.J. (1998). Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* *14*, 1511-1527.
- Johnson, H., Whiteford, J.R., Eckert, S.E., and Spanu, P.D. (2003). Production and secretion of *Aspergillus nidulans* catalase B in filamentous fungi driven by the promoter and signal peptide of the *Cladosporium fulvum* hydrophobin gene hcf-1. *Curr Genet* *44*, 155-163.
- Jones, D.P. (2008). Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol* *295*, C849-868.
- Joseph, E.A., Mare, A., and Irving, W.R.Jr. (1966). Oral South American blastomycosis in the United States of America. Report of a case. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* *21*, 732-737.
- Kamei, K., Sano, A., Kikuchi, K., Makimura, K., Niimi, M., Suzuki, K., Uehara, Y., Okabe, N., Nishimura, K., and Miyaji, M. (2003). The trend of imported mycoses in Japan. *J Infect Chemother* *9*, 16-20.
- Kawasaki, L., and Aguirre, J. (2001). Multiple catalase genes are differentially regulated in *Aspergillus nidulans*. *J Bacteriol* *183*, 1434-1440.
- Kim, I.S., Sohn, H.Y., and Jin, I. (2011). Adaptive stress response to menadione-induced oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377. *J Microbiol* *49*, 816-823.
- Kirkman, H.N., and Gaetani, G.F. (2007). Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *Trends Biochem Sci* *32*, 44-50.
- Kruger, A., Gruning, N.M., Wamelink, M.M., Kerick, M., Kirpy, A., Parkhomchuk, D., Bluemlein, K., Schweiger, M.R., Soldatov, A., Lehrach, H., Jakobs, C., and Ralser, M. (2011). The pentose phosphate pathway is a metabolic redox sensor and regulates transcription during the antioxidant response. *Antioxid Redox Signal* *15*, 311-324.
- Kwon, M., Chong, S., Han, S., and Kim, K. (2003). Oxidative stresses elevate the expression of cytochrome c peroxidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* *1623*, 1-5.
- Lacaz, C.S. (1994). *Paracoccidioides brasiliensis*: morfology; Evolutionary cycle; Maintenance during Paprophytic Life; Biology; Virulence; Taxonom. In *Paracoccidioidomycosis*, L.C. Franco MF, Restrepo A, Del Negro G, ed. (Boca Raton, USA, CRC Press), pp. PP. 13-25.

Lacaz, C.S., Porto, E., Martins, J.E.C., Heins-Vaccari, E.M., and Takahashi, M.N. (2002). Tratado de Micologia Médica (São Paulo, Savier).

Lackner, D.H., Schmidt, M.W., Wu, S., Wolf, D.A., and Bahler, J. (2012). Regulation of transcriptome, translation, and proteome in response to environmental stress in fission yeast. *Genome Biol* 13, R25.

Landis, G.N., and Tower, J. (2005). Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mech Ageing Dev* 126, 365-379.

Le Moan, N., Clement, G., Le Maout, S., Tacnet, F., and Toledano, M.B. (2006). The *Saccharomyces cerevisiae* proteome of oxidized protein thiols: contrasted functions for the thioredoxin and glutathione pathways. *J Biol Chem* 281, 10420-10430.

Lee, J., Spector, D., Godon, C., Labarre, J., and Toledano, M.B. (1999). A new antioxidant with alkyl hydroperoxide defense properties in yeast. *J Biol Chem* 274, 4537-4544.

Lehninger, A.L., Nelson, D.L., and Cox, M.M. (2005). Lehninger principles of biochemistry, 4th edn (New York, W.H. Freeman).

Leitch, J.M., Yick, P.J., and Culotta, V.C. (2009). The right to choose: multiple pathways for activating copper,zinc superoxide dismutase. *J Biol Chem* 284, 24679-24683.

Lemire, J., Milandu, Y., Auger, C., Bignucolo, A., Appanna, V.P., and Appanna, V.D. (2010). Histidine is a source of the antioxidant, alpha-ketoglutarate, in *Pseudomonas fluorescens* challenged by oxidative stress. *FEMS Microbiol Lett* 309, 170-177.

Lessing, F., Kniemeyer, O., Wozniok, I., Loeffler, J., Kurzai, O., Haertl, A., and Brakhage, A.A. (2007). The *Aspergillus fumigatus* transcriptional regulator AfYap1 represents the major regulator for defense against reactive oxygen intermediates but is dispensable for pathogenicity in an intranasal mouse infection model. *Eukaryot Cell* 6, 2290-2302.

Li, Q., Abrashev, R., Harvey, L.M., and McNeil, B. (2008a). Oxidative stress-associated impairment of glucose and ammonia metabolism in the filamentous fungus, *Aspergillus niger* B1-D. *Mycol Res* 112, 1049-1055.

Li, Q., McNeil, B., and Harvey, L.M. (2008b). Adaptive response to oxidative stress in the filamentous fungus *Aspergillus niger* B1-D. *Free Radic Biol Med* 44, 394-402.

Lillig, C.H., and Holmgren, A. (2007). Thioredoxin and related molecules - from biology to health and disease. *Antioxid Redox Signal* 9, 25-47.

Lushchak, V.I. (2010). Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*.

Mangiaterra, M.L., Giusiano, G.E., Alonso, J.M., and Gorodner, J.O. (1999). *Paracoccidioides brasiliensis* infection in a subtropical region with important environmental changes. *Bull Soc Pathol Exot* 92, 173-176.

- Marques, S.A., Franco, M.F., Mendes, R.P., Silva, N.C., Baccili, C., Curcelli, E.D., Feracin, A.C., Oliveira, C.S., Tagliarini, J.V., and Dillon, N.L. (1983). Epidemiologic aspects of paracoccidioidomycosis in the endemic area of Botucatu (Sao Paulo - Brazil). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 25, 87-92.
- Martchenko, M., Alarco, A.M., Harcus, D., and Whiteway, M. (2004). Superoxide dismutases in *Candida albicans*: transcriptional regulation and functional characterization of the hyphal-induced SOD5 gene. *Mol Biol Cell* 15, 456-467.
- Martinez, R. (2004). Paracoccidioidomicose. In *Micologia Médica à luz de autores contemporâneos*, J.J.C. Sidrim, and M.F.G. Rocha, eds. (Rio de Janeiro - RJ Brasil), pp. 202-221.
- Mates, J.M., Segura, J.A., Alonso, F.J., and Marquez, J. (2008). Intracellular redox status and oxidative stress: implications for cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis. *Arch Toxicol* 82, 273-299.
- Matute, D.R., McEwen, J.G., Puccia, R., Montes, B.A., San-Blas, G., Bagagli, E., Rauscher, J.T., Restrepo, A., Morais, F., Nino-Vega, G., and Taylor, J.W. (2006). Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol Biol Evol* 23, 65-73.
- McEwen, J.G., Bedoya, V., Patino, M.M., Salazar, M.E., and Restrepo, A. (1987). Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. *J Med Vet Mycol* 25, 165-175.
- McEwen, J.G., Sugar, A.M., Brummer, E., Restrepo, A., and Stevens, D.A. (1984). Toxic effect of products of oxidative metabolism on the yeast form of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Microbiol* 18, 423-428.
- Minard, K.I., and McAlister-Henn, L. (2001). Antioxidant function of cytosolic sources of NADPH in yeast. *Free Radic Biol Med* 31, 832-843.
- Mishina, N.M., Tyurin-Kuzmin, P.A., Markvicheva, K.N., Vorotnikov, A.V., Tkachuk, V.A., Laketa, V., Schultz, C., Lukyanov, S., and Belousov, V.V. (2011). Does cellular hydrogen peroxide diffuse or act locally? *Antioxid Redox Signal* 14, 1-7.
- Missall, T.A., Lodge, J.K., and McEwen, J.E. (2004). Mechanisms of resistance to oxidative and nitrosative stress: implications for fungal survival in mammalian hosts. *Eukaryot Cell* 3, 835-846.
- Moreira, S.F., Bailao, A.M., Barbosa, M.S., Jesuino, R.S., Felipe, M.S., Pereira, M., and Soares, C.M. A. (2004). Monofunctional catalase P of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification, characterization, molecular cloning and expression analysis. *Yeast* 21, 173-182.
- Munoz-Clares, R.A., Diaz-Sanchez, A.G., Gonzalez-Segura, L., and Montiel, C. (2010). Kinetic and structural features of betaine aldehyde dehydrogenases: mechanistic and regulatory implications. *Arch Biochem Biophys* 493, 71-81.
- Muzio, G., Maggiora, M., Paiuzzi, E., Oraldi, M., and Canuto, R.A. (2012). Aldehyde dehydrogenases and cell proliferation. *Free Radic Biol Med* 52, 735-746.
- Nakagawa, Y., Kanbe, T., and Mizuguchi, I. (2003). Disruption of the human pathogenic yeast *Candida albicans* catalase gene decreases survival in mouse-model infection and elevates susceptibility to higher temperature and to detergents. *Microbiol Immunol* 47, 395-403.

- Narasipura, S.D., Chaturvedi, V., and Chaturvedi, S. (2005). Characterization of *Cryptococcus neoformans* variety *gattii* SOD2 reveals distinct roles of the two superoxide dismutases in fungal biology and virulence. *Mol Microbiol* 55, 1782-1800.
- Navarro, R.E., Stringer, M.A., Hansberg, W., Timberlake, W.E., and Aguirre, J. (1996). *catA*, a new *Aspergillus nidulans* gene encoding a developmentally regulated catalase. *Curr Genet* 29, 352-359.
- Nemecek, J.C., Wuthrich, M., and Klein, B.S. (2006). Global control of dimorphism and virulence in fungi. *Science (New York, NY)* 312, 583-588.
- Norenberg, M.D. (2003). Oxidative and nitrosative stress in ammonia neurotoxicity. *Hepatology* 37, 245-248.
- Okano, S., Shibata, Y., Shiroza, T., and Abiko, Y. (2006). Proteomics-based analysis of a counter-oxidative stress system in *Porphyromonas gingivalis*. *Proteomics* 6, 251-258.
- Oliveira, G.G., Navarro, I.T., Freire, R.L., Belitardo, D.R., Silveira, L.H., Camargo, Z.P., Itano, E.N., and Ono, M.A. (2012). Serological survey of Paracoccidioidomycosis in sheep. *Mycopathologia* 173, 63-68.
- Osorio, H., Carvalho, E., del Valle, M., Gunther Sillero, M.A., Moradas-Ferreira, P., and Sillero, A. (2003). H₂O₂, but not menadione, provokes a decrease in the ATP and an increase in the inosine levels in *Saccharomyces cerevisiae*. An experimental and theoretical approach. *Eur J Biochem* 270, 1578-1589.
- Palmeiro, M., Cherubini, K., and Yurgel, L.S. (2005). Paracoccidioidomycosis – Literature Review. *Scientia Medica* 15, 274-278.
- Paris, S., Wysong, D., Debeaupuis, J.P., Shibuya, K., Philippe, B., Diamond, R.D., and Latge, J.P. (2003). Catalases of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* 71, 3551-3562.
- Pedroso, N., Matias, A.C., Cyrne, L., Antunes, F., Borges, C., Malho, R., de Almeida, R.F., Herrero, E., and Marinho, H.S. (2009). Modulation of plasma membrane lipid profile and microdomains by H₂O₂ in *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radic Biol Med* 46, 289-298.
- Penninckx, M. (2000). A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stresses. *Enzyme Microb Technol* 26, 737-742.
- Pereira, M., Bailao, A.M., Parente, J.A., Borges, C.L., Salem-Izacc, S.M., and Soares, C.M.A. (2009). Preferential transcription of *Paracoccidioides brasiliensis* genes: host niche and time-dependent expression. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104, 486-491.
- Pinzan, C.F., Ruas, L.P., Casabona-Fortunato, A.S., Carvalho, F.C., and Roque-Barreira, M.C. (2010). Immunological basis for the gender differences in murine *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *PLoS one* 5, e10757.
- Pitarch, A., Sanchez, M., Nombela, C., and Gil, C. (2003). Analysis of the *Candida albicans* proteome. I. Strategies and applications. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 787, 101-128.
- Posadas, A. (1892). Un Nuevo caso de micosis fungoidea con psorospermias. *Ann Cir Med Argent* 15, 585-597.

- Puig, S., Lee, J., Lau, M., and Thiele, D.J. (2002). Biochemical and genetic analyses of yeast and human high affinity copper transporters suggest a conserved mechanism for copper uptake. *J Biol Chem* 277, 26021-26030.
- Pusztahelyi, T., Klement, É., Szajli, E., Klem, J., Miskei, M., Karányi, Z., Emri, T., Kovács, S., Orosz, G., Kovács, K.L., Medzihradzky, K.F., Prade, R.A., and Pocsi, I. (2011). Comparison of transcriptional and translational changes caused by long-term menadione exposure in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology* 48, 92-103.
- Ralser, M., Wamelink, M.M., Kowald, A., Gerisch, B., Heeren, G., Struys, E.A., Klipp, E., Jakobs, C., Breitenbach, M., Lehrach, H., and Krobitsch, S. (2007). Dynamic rerouting of the carbohydrate flux is key to counteracting oxidative stress. *J Biol* 6, 10.
- Rappleye, C.A., and Goldman, W.E. (2006). Defining virulence genes in the dimorphic fungi. *Annu Rev Microbiol* 60, 281-303.
- Restrepo, A. (1985). The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *Sabouraudia* 23, 323-334.
- Restrepo, A. (1988). Immune responses to *Paracoccidioides brasiliensis* in human and animal hosts. In *Current Tropics in Medical Mycology*, M.G. M, ed. (New York, Springer-Verlag), pp. 239-277.
- Rezende, T.C., Borges, C.L., Magalhaes, A.D., de Sousa, M.V., Ricart, C.A., Bailao, A.M., and Soares, C.M.A. (2011). A quantitative view of the morphological phases of *Paracoccidioides brasiliensis* using proteomics. *J Proteomics* 75, 572-587.
- Richini-Pereira, V.B., Bosco Sde, M., Griese, J., Theodoro, R.C., Macoris, S.A., da Silva, R.J., Barrozo, L., Tavares, P.M., Zancope-Oliveira, R.M., and Bagagli, E. (2008). Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed wild animals. *Med Mycol* 46, 35-40.
- Riezman, H. (2004). Why do cells require heat shock proteins to survive heat stress? *Cell Cycle* 3, 61-63.
- Rigoulet, M., Yoboue, E.D., and Devin, A. (2010). Mitochondrial ROS generation and its regulation Mechanisms involved in H₂O₂ signaling. *Antioxid Redox Signal*.
- San-Blas, G., and Nino-Vega, G. (2004). Morphogenesis in other agents of systemic mycoses. In *Pathogenic Fungi: Structural Biology and Taxonomy*, C.R. San-Blas G, ed. (Wymondham, Norfolk, Caister Academic Press), pp. 167-220.
- San-Blas, G., Nino-Vega, G., and Iturriaga, T. (2002). *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med Mycol* 40, 225-242.
- Sano, A., Nishimura, K., and Miyaji, M. (1999). The Research Encouragement Award. Effects of sex hormones on sexual difference of experimental paracoccidioidomycosis. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* 40, 1-8.
- Scandalios, J.G. (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res* 38, 995-1014.

- Seider, K., Heyken, A., Luttich, A., Miramon, P., and Hube, B. (2010). Interaction of pathogenic yeasts with phagocytes: survival, persistence and escape. *Curr Opin Microbiol* 13, 392-400.
- Seneviratne, C.J., Wang, Y., Jin, L., Abiko, Y., and Samaranayake, L.P. (2008). *Candida albicans* biofilm formation is associated with increased anti-oxidative capacities. *Proteomics* 8, 2936-2947.
- Shankar, J., Restrepo, A., Clemons, K.V., and Stevens, D.A. (2011). Hormones and the resistance of women to paracoccidioidomycosis. *Clin Microbiol Rev* 24, 296-313.
- Shibuya, K., Paris, S., Ando, T., Nakayama, H., Hatori, T., and Latge, J.P. (2006). Catalases of *Aspergillus fumigatus* and inflammation in aspergillosis. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi* 47, 249-255.
- Shikanai-Yasuda, M.A., Telles Filho Fde, Q., Mendes, R.P., Colombo, A.L., and Moretti, M.L. (2006). Guidelines in paracoccidioidomycosis. *Rev Soc Bras Med Trop* 39, 297-310.
- Sigler, K., Chaloupka, J., Brozmanova, J., Stadler, N., and Hofer, M. (1999). Oxidative stress in microorganisms-I. Microbial vs. higher cells-damage and defenses in relation to cell aging and death. *Folia Microbiol (Praha)* 44, 587-624.
- Singh, R., Mailloux, R.J., Puiseux-Dao, S., and Appanna, V.D. (2007). Oxidative stress evokes a metabolic adaptation that favors increased NADPH synthesis and decreased NADH production in *Pseudomonas fluorescens*. *J Bacteriol* 189, 6665-6675.
- Skowronska, M., and Albrecht, J. (2012). Oxidative and nitrosative stress in ammonia neurotoxicity. *Neurochemistry international*.
- Stowe, D.F., and Camara, A.K. (2009). Mitochondrial reactive oxygen species production in excitable cells: modulators of mitochondrial and cell function. *Antioxid Redox Signal* 11, 1373-1414.
- Tan, S.X., Greetham, D., Raeth, S., Grant, C.M., Dawes, I.W., and Perrone, G.G. (2010). The thioredoxin-thioredoxin reductase system can function in vivo as an alternative system to reduce oxidized glutathione in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 285, 6118-6126.
- Tavares, A.H., Silva, S.S., Dantas, A., Campos, E.G., Andrade, R.V., Maranhao, A.Q., Brigido, M.M., Passos-Silva, D.G., Fachin, A.L., Teixeira, S.M., Passos, G.A.S., Soares, C.M.A., Bocca, A., Carvalho, M.J.A., Silva-Pereira, I., and Felipe, M.S. (2007). Early transcriptional response of *Paracoccidioides brasiliensis* upon internalization by murine macrophages. *Microbes Infect* 9, 583-590.
- Teixeira, M.M., Theodoro, R.C., de Carvalho, M.J., Fernandes, L., Paes, H.C., Hahn, R.C., Mendoza, L., Bagagli, E., San-Blas, G., and Felipe, M.S. (2009). Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol Phylogenet Evol* 52, 273-283.
- Temple, M.D., Perrone, G.G., and Dawes, I.W. (2005). Complex cellular responses to reactive oxygen species. *Trends Cell Biol* 15, 319-326.
- Terlecky, S.R., and Koepke, J.I. (2007). Drug delivery to peroxisomes: employing unique trafficking mechanisms to target protein therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* 59, 739-747.
- Theodoro, R.C., Candeias, J.M., Araujo, J.P., Jr., Bosco Sde, M., Macoris, S.A., Padula, L.O., Franco, M., and Bagagli, E. (2005). Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. *Med Mycol* 43, 725-729.

- Thon, M., Al-Abdallah, Q., Hortschansky, P., and Brakhage, A.A. (2007). The thioredoxin system of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*: impact on development and oxidative stress response. *J Biol Chem* 282, 27259-27269.
- Trotter, E.W., and Grant, C.M. (2005). Overlapping roles of the cytoplasmic and mitochondrial redox regulatory systems in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 4, 392-400.
- Vallejo, M.C., Nakayasu, E.S., Matsuo, A.L., Sobreira, T.J., Longo, L.V., Ganiko, L., Almeida, I.C., and Puccia, R. (2012). Vesicle and vesicle-free extracellular proteome of *Paracoccidioides brasiliensis*: comparative analysis with other pathogenic fungi. *J Proteome Res* 11, 1676-1685.
- Vandenbroucke, K., Robbens, S., Vandepoele, K., Inze, D., Van de Peer, Y., and Van Breusegem, F. (2008). Hydrogen peroxide-induced gene expression across kingdoms: a comparative analysis. *Mol Biol Evol* 25, 507-516.
- Vasconcelos, S.M.L., Goulart, M.O.F., Moura, J.B.F., Manfredini, V., Benfato, M.S., and Kubota, L.K. (2007). Reactive oxygen and nitrogen species, antioxidants and markers of oxidative damage in human blood: main analytical methods for their determination. *Quím Nova* 30.
- Vlasits, J., Jakopitsch, C., Bernroither, M., Zamocky, M., Furtmuller, P.G., and Obinger, C. (2010). Mechanisms of catalase activity of heme peroxidases. *Arch Biochem Biophys* 500, 74-81.
- Wang, G., Conover, R.C., Benoit, S., Olczak, A.A., Olson, J.W., Johnson, M.K., and Maier, R.J. (2004). Role of a bacterial organic hydroperoxide detoxification system in preventing catalase inactivation. *J Biol Chem* 279, 51908-51914.
- Wang, N., Yoshida, Y., and Hasunuma, K. (2007). Catalase-1 (CAT-1) and nucleoside diphosphate kinase-1 (NDK-1) play an important role in protecting conidial viability under light stress in *Neurospora crassa*. *Mol Genet Genomics* 278, 235-242.
- Wasim, M., Bible, A.N., Xie, Z., and Alexandre, G. (2009). Alkyl hydroperoxide reductase has a role in oxidative stress resistance and in modulating changes in cell-surface properties in *Azospirillum brasilense* Sp245. *Microbiology* 155, 1192-1202.
- Weber, S.S., Parente A.F.A., Parente J.A., Borges C.L., Bailao A.M., and Soares C.M.A., Proteomic analysis of released proteins by *Paracoccidioides* yeast cells and mycelia. *PlosOne*. No Prelo.
- Wilkins, M.R., Sanchez, J.C., Gooley, A.A., Appel, R.D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D.F., and Williams, K.L. (1996). Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev* 13, 19-50.
- Winyard, P.G., Moody, C.J., and Jacob, C. (2005). Oxidative activation of antioxidant defence. *Trends Biochem Sci* 30, 453-461.
- Wolf, C., Hochgrafe, F., Kusch, H., Albrecht, D., Hecker, M., and Engelmann, S. (2008). Proteomic analysis of antioxidant strategies of *Staphylococcus aureus*: diverse responses to different oxidants. *Proteomics* 8, 3139-3153.

Yin, Z., Stead, D., Walker, J., Selway, L., Smith, D.A., Brown, A.J., and Quinn, J. (2009). A proteomic analysis of the salt, cadmium and peroxide stress responses in *Candida albicans* and the role of the Hog1 stress-activated MAPK in regulating the stress-induced proteome. *Proteomics* 9, 4686-4703.

Yoshihara, E., Chen, Z., Matsuo, Y., Masutani, H., and Yodoi, J. (2010). Thiol redox transitions by thioredoxin and thioredoxin-binding protein-2 in cell signaling. *Methods Enzymol* 474, 67-82.

Zelko, I.N., Mariani, T.J., and Folz, R.J. (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med* 33, 337-349.