



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

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DE *P. brasiliensis* DURANTE
PROCESSO DE INFECÇÃO E CONDIÇÕES DE ESTRESSE
OXIDATIVO

Candidato: Ronney Fernandes Chagas

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- Brasil

-2011-

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

APOIO FINANCEIRO: CAPES/ CNPq/ SECTEC-GO

BANCA EXAMINADORA

TITULARES

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

Prof. Dr. Bergmann Morais Ribeiro
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília

Prof. Dr. Jaime Martins de Santana
Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília

Prof. Dr. Carlos Roberto Felix
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília

Profa. Dra. Silvia Maria Salem-Izacc
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.

SUPLENTE

Profa. Dra. Juliana Alves Parente
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.

*“A árvore nascente aguarda-te a bondade e a
tolerância para que te possa ofertar os próprios
frutos em tempo certo.”*

Francisco Cândido Xavier

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida...

...aos meus pais Antônio e Margareth pelo amor e incentivo em todos os momentos dessa minha caminhada. Pelos gestos carinhosos e todos "Eu te amo". Amo muito vocês. Se hoje cheguei até aqui é porque vocês me deram este privilégio. Admiro-os muito!

...à minha querida avó Dalci, que sempre vibra e torce por minhas conquistas.

...à minha amada irmã Savanna, pelas inúmeras vezes de conforto e carinho, sempre ao meu lado, me apoiando e incentivando.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela benção diária, pelo privilégio concedido e por me proporcionar momentos difíceis que foram fundamentais para meu amadurecimento.

À minha orientadora Célia, os maiores e mais sinceros agradecimentos. Sua confiança e orientação foram capazes de me fazer trilhar por um crescimento educacional e profissional da qual serei sempre grato. Sou honrado por ter sido seu aluno de iniciação científica, mestrado e doutorado e levarei sempre, ao longo da minha jornada profissional teus ensinamentos. Muito obrigado!

Aos professores do Laboratório de Biologia Molecular, Maristela, Sílvia, Alexandre, Clayton e Juliana pela colaboração e auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

À amiga Kelly, pelo imenso apoio e ajuda. Admiro muito sua maneira de trabalhar e seu profissionalismo. Aprendi muito com você. Muito obrigado por ter me acompanhado neste trabalho.

À amiga Daciene, pela ajuda e paciência. Muito obrigado pelos momentos engraçados que tivemos. Pelas mesas arrumadas nos nossos jantares na Colina. Pelas grandes risadas quando víamos as apresentações animadas que criávamos.

À amiga Patrícia Zambuzzi, muito obrigado pela disposição a ajudar sempre. Muito obrigado pelo carinho e pelas contribuições.

Ao Leandro e a Dayane obrigado pela companhia! Admiro muito o esforço, a competência e a simplicidade dos dois.

À amiga Cristina pela feliz convivência, ajuda e pelos momentos especiais em que conversávamos sobre como Deus guia nossos caminhos.

À Patrícia Lima por todos os anos de convivência.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular, Simone Weber, Sheila, Elisa, Mirelle, Ana Flávia, Edilania, Laura, Priscila, Laurine, Luciana, Luciane, Marielle, Amanda, Karine, Renata, Symone, Benedito. Obrigado pela convivência.

Aos amigos Rodrigo, Nathalie e Mariana pela amizade, carinho e pelos inúmeros momentos de alegria que nosso "Quarteto Fantástico" protagonizou em todos estes anos. Gosto muito de vocês e os levarei sempre no coração por toda minha vida.

À Mônica Santiago pela amizade e alegria da convivência. Moc, você é uma pessoa iluminada, agradeço a Deus por ter colocado você em minha vida. Muito obrigado pela força que você deu e sempre me dá. Muito obrigado por ser essa pessoa realmente amiga em que posso confiar, confidenciar e contar com ajuda sempre. Estou aqui com você para o que der e vier. Tenho enorme orgulho de ser seu amigo. Sou eternamente grato!

*Aos grandes amigos Pedro Tiago e Thiago Oliveira (Cajú) pela amizade e companheirismo. A nossa amizade foi essencial para meu crescimento e amadurecimento, Obrigado por me escutar e aconselhar nos momentos difíceis. Obrigado pela força nos momentos de fraqueza. Obrigado por me ouvirem falar em *Paracoccidoides brasiliensis*, sem nem ao menos saberem ao certo do que se tratava #muitoobrigado. Valeu!*

A banca examinadora pela disponibilidade e contribuição.

Ao professor Bergmann e funcionários da Pós-Graduação pela boa vontade em ajudar os alunos de Goiânia.

A todos que de alguma maneira contribuíram para realização deste trabalho!

Muito obrigado!

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

Resumo	X
Abstract	XI

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	12
1.2 - Paracoccidioidomicose (PCM).....	14
1.3 - Expressão de genes e proteínas potencialmente relacionados com a infecção em <i>P. brasiliensis</i>	16
1.4 – Perfis metabólicos de patógenos em nichos do hospedeiro.....	26
2 – JUSTIFICATIVA	32
3 – OBJETIVOS	32
4 – MANUSCRITO	35
5 – DISCUSSÃO	73
6 - PERSPECTIVAS/ TRABALHOS EM DESENVOLVIMENTO	78
7– REFERERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

SUMÁRIO

CAPÍTULO II

Resumo	XCI
Abstract	XCII

1 - INTRODUÇÃO

1.1 – Estresse oxidativo e moléculas antioxidantes.....	93
1.2 – Catalases.....	95
1.3 – Estresse oxidativo e expressão de catalases em <i>P. brasiliensis</i>	101
2 – JUSTIFICATIVAS	104
3- OBJETIVOS	105
4 – MANUSCRITOS	106
5 – DISCUSSÃO	122
6 - PERSPECTIVAS/ TRABALHOS EM DESENVOLVIMENTO	126
7 - REFERERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127

Capítulo I

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES EM SISTEMAS DE INFECÇÃO

RESUMO

Paracoccidioides brasiliensis provoca infecção através da inalação de propágulos do micélio. Este microorganismo alcança os pulmões, diferencia-se na forma leveduriforme e depois pode disseminar-se para outras partes do corpo. Como é um patógeno que coloniza inúmeros locais no interior do hospedeiro humano, *P. brasiliensis* deve expressar genes que auxiliam na colonização e/ou virulência. Durante a infecção, patógenos regulam o metabolismo em resposta a diferentes tipos de estresse e quantidades variadas de nutrientes disponíveis no nicho de colonização, presumivelmente permitindo a sua adaptação às características deste nicho. As respostas adaptativas de *P. brasiliensis* recuperado do fígado de camundongos infectados e durante os eventos hematogênicos de disseminação do fungo foram previamente investigadas, identificando novos genes regulados que podem ser importantes para a sobrevivência e crescimento do fungo em seres humanos. Aqui, descrevemos a identificação de genes diferencialmente expressos durante os processos infecciosos no baço de modelo de infecção em camundongos. Para identificar genes que possivelmente contribuem para a adaptação e sobrevivência de *P. brasiliensis* no baço, foram realizadas análises de diferença representacional de cDNA (RDA-cDNA). Genes relacionados ao metabolismo de aminoácidos e ácidos graxos, aquisição de nutrientes e defesa celular foram especialmente super regulados após 7 e 15 dias de infecção, sugerindo que no baço, *P. brasiliensis* pode ser submetido a um ambiente hostil, com disponibilidade restrita de nutrientes. Estes mecanismos de controle e otimização de expressão gênica em diversos nichos pode permitir que o fungo seja um grande colonizador e patógeno do hospedeiro humano.

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*; infecção no baço; análise de diferença representacional de cDNA; estresse nutricional; interação patógeno-hospedeiro

ABSTRACT

Paracoccidioides brasiliensis causes infection through inhalation by the host of airborne propagules from the mycelium phase of the fungus. This microorganism reaches the lungs, differentiates into the yeast form and is then disseminated to virtually all parts of the body. As a pathogen that colonizes numerous sites within the human host, *P. brasiliensis* must express genes that promote colonization or virulence in multiple environments. During infection, pathogens regulate the metabolism in response to different types of stress and varying amounts of nutrients available in the niche of colonization, presumably allowing its adaptation to the environmental features of a particular niche. The adaptive responses of *P. brasiliensis* recovered of the liver of infected mice and during the hematogenic events of the fungal dissemination were previously investigated, identifying novel regulated genes that may be important for the survival and growth strategies of *P. brasiliensis* in humans. Here we describe the identification of differentially expressed genes during the infectious processes in spleen in a mouse model of infection. The approach was the use of cDNA representational difference analysis (cDNA-RDA) to identify possible candidate genes that contribute to *P. brasiliensis* adaptation to survival in the spleen. Genes related to amino acids and fatty acids metabolism, nutrients acquisition and cell defense were specially upregulated after 7 and 15 days of infection, suggesting that in spleen, *P. brasiliensis* could be subjected to a hostile environment with restricted availability of nutrients. These mechanisms for controlling and optimizing gene expression in diverse niches can allow *P. brasiliensis* to be a highly successful colonizer and pathogen of the human host.

Keywords: *Paracoccidioides brasiliensis*; spleen infection; cDNA representational difference analysis; nutritional stress; host-pathogen interaction

INTRODUÇÃO

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – *Paracoccidioides brasiliensis*

O fungo termodimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* é um ascomiceto patógeno humano, agente etiológico da Paracoccidioidomicose (PCM), uma micose sistêmica restrita à América Latina (Restrepo & Tobon, 2005). Por apresentar termodimorfismo, *P. brasiliensis* se desenvolve como levedura nos tecidos infectados ou quando cultivado *in vitro* a 36°C. A forma infectiva, miceliana, é encontrada em condição saprobiótica no ambiente, ou quando cultivada em temperaturas inferiores a 28°C (San-Blas *et al.*, 2002). A conversão morfogénica em *P. brasiliensis* está relacionada à mudança de temperatura (San-Blas, 1993), mas outros fatores foram identificados como influenciadores do dimorfismo, como o hormônio feminino 17- β -estradiol capaz de inibir a transição de micélio para levedura (Restrepo, 1985; Sano *et al.* 1999). Acredita-se que a interação do hormônio com uma EBP (Estradiol Binding Protein), identificada em *P. brasiliensis*, iniba a transição morfológica do fungo, explicando a baixa incidência da PCM em mulheres (Felipe *et al.*, 2005; Shankar *et al.*, 2011).

Alguns fungos termodimórficos como *P. brasiliensis* tendem a ser restritos a regiões geográficas específicas, com determinadas características climáticas ou tipos específicos de solos que provavelmente auxiliam na adaptação do fungo ao habitat natural (Rappleye & Goldman, 2006). As diferentes condições de solos alteram a capacidade de crescimento da forma miceliana e a produção de conídios por *P. brasiliensis*. Sendo assim, Terçarioli *et al.* (2007) verificaram que solos arenosos e argilosos, com alta umidade devem ser mais favoráveis para a produção de conídios, um fator importante por aumentar a eficiência de sobrevivência do fungo no meio ambiente e a capacidade de infectar animais e humanos. O nicho ecológico alternativo de *P.*

brasiliensis são animais com temperatura corporal de 36 °C a 37 °C, onde a transição para a forma leveduriforme promove o estabelecimento da doença. O fungo tem sido freqüentemente isolado de tatus (*Dasypus novem cinctus* no Brasil e *Cabassous centralis* na Colômbia) em áreas endêmicas e esses animais são reconhecidos como reservatórios naturais do fungo (Corredor *et al.*, 2005; Bagagli *et al.*, 2008). O patógeno também tem sido relatado em cachorros (Farias *et al.*, 2011), pingüins (Garcia *et al.*, 1993) e morcegos frugívoros (Grose & Tamsitt, 1965). Testes sorológicos e intradérmicos também sugeriram a presença do fungo em animais domésticos e primatas (Corte *et al.*, 2007).

Comparações filogenéticas de dermatófitos e fungos dimórficos baseadas na subunidade ribossomal 28S classificou *P. brasiliensis* como pertencente ao Filo Ascomycota, Subfilo Pezizomycotina, Classe Eurotiomycetes, Ordem Onygenales, família Onygenaceae, juntamente com *Blastomyces dermatitidis* e *Histoplasma capsulatum* (San-Blas & Niño-Vega *et al.*, 2008). *P. brasiliensis* era considerado uma espécie única 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).

Teixeira e colaboradores (2009) utilizando a técnica de concordância genealógica para reconhecimento de espécies filogenéticas investigaram a possível existência de novas espécies incluindo *Pb01* e outros isolados Latino Americanos. Foram identificados 17 isolados similares genotipicamente, incluindo *Pb01*, que se distanciavam do clado das três espécies filogenéticas S1/PS2/PS3, quando analisado o

grau de divergência entre eles. Isso indica que os dois grupos são altamente divergentes um do outro. Análises morfológicas de um membro escolhido de cada grupo filogenético do gênero *Paracoccidioides* revelaram características que são exclusivas de cada grupo corroborando com os dados filogenéticos. Entretanto, mais isolados do grupo semelhante ao *Pb01* devem ser analisados para avaliar se essas diferenças são conservadas (Teixeira *et al.*, 2009). Assim, *P. brasiliensis* atualmente consiste em um complexo de espécies (Richini-Pereira *et al.*, 2009).

Adicionalmente, a organização genômica de *P. brasiliensis* foi também investigada. O seqüenciamento dos genomas estruturais de *Pb01*, *Pb03* e *Pb18* foram realizados e os resultados confirmaram a presença de 5 cromossomos em cada isolado. O genoma de *Pb01* é composto de 32,94 Mb, com um total de 9.132 genes. *Pb03* e *Pb18* apresentaram genomas do tamanho de 29,06 e 29,95 Mb, com número de genes de 7.875 e 8.741, respectivamente.

1.2 – Paracoccidioidomicose (PCM)

A Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose humana sistêmica granulomatosa que é fatal se não tratada e freqüentemente leva a permanentes restrições no estilo de vida dos pacientes, uma vez que provoca extensivos danos fibróticos no pulmão. O fungo *P. brasiliensis* infecta hospedeiros humanos usualmente através das vias respiratórias, por inalação de propágulos do micélio e artroconídeos (Bagagli *et al.*, 2006). No epitélio dos alvéolos pulmonares, conídios se diferenciam para a forma leveduriforme, caracterizando a fase parasítica do fungo. *P. brasiliensis* é notavelmente um patógeno versátil, capaz de infectar numerosos nichos no hospedeiro, como a pele, as mucosas oral, nasal e gastrointestinal, baço, ossos, próstata, fígado, pâncreas e sistema nervoso central (Silva & Saraiva, 2008; Lopes *et al.*, 2009; Fortes *et al.*, 2009;

Goldani *et al.*, 2011). A infecção ocorre inicialmente nos pulmões; de onde o fungo pode através da via hematogênica e /ou sistema linfático alcançar outros órgãos do hospedeiro, desenvolvendo uma forma disseminada da PCM (Franco, 1987).

A PCM apresenta duas formas clínicas principais: forma aguda ou subaguda (juvenil) e forma crônica (adulta). A forma juvenil atinge crianças de ambos os sexos, envolvendo o sistema fagocítico mononuclear, tem evolução mais rápida e é mais severa levando a taxas de mortalidade significantes. A forma crônica, por sua vez, é altamente prevalente entre adultos, tem progressão lenta e compromete primeiramente os pulmões, podendo disseminar-se para outros órgãos e tecidos formando lesões secundárias (Franco, 1987). Esta fase representa mais de 90% dos casos (Brummer *et al.*, 1993) e afeta a pele, linfonodos e vários órgãos internos, incluindo os pulmões e os sistema nervoso central (Restrepo, 1985). O progresso da patologia e a diversidade das formas clínicas dependem dos fatores imunológicos do hospedeiro (Franco, 1987) e dos diferentes níveis de virulência dos diversos tipos de isolados do fungo (San-Blas & Niño-Vega, 2001; Panunto-Castelo *et al.*, 2003).

A doença acomete principalmente indivíduos do sexo masculino entre 30 e 60 anos, sendo rara a incidência abaixo de 14 anos de idade. Durante a infância a doença acomete ambos os sexos com igual intensidade, fortalecendo a hipótese de que os fatores hormonais desempenham importante papel na diferenciação celular e conseqüentemente na patogênese da doença (Restrepo *et al.*, 2008; Prado *et al.*, 2009). A maioria dos casos da PCM é registrada no Brasil, Colômbia, Venezuela, Equador e Argentina (Silva & Saraiva, 2008). No Brasil a doença ocorre mais freqüentemente nos estados de São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro e Goiás (Paniago *et al.*, 2003; Prado *et al.*, 2009). Devido à abertura de novas fronteiras agrícolas nas últimas décadas, diversos casos de PCM vêm sendo relatados em cidades da região Norte

e Centro-Oeste do país (Silva & Saraiva, 2008; Buitrago *et al.*, 2011). Dados epidemiológicos indicam que a distribuição geográfica de *P. brasiliensis* está diretamente relacionada com o clima. A maioria dos casos de PCM ocorre principalmente em áreas tropicais e subtropicais, de solo ácido e úmido, temperatura variando entre 17° a 24°C e com média pluviométrica entre 500 a 2500 mm/por ano (Barrozo *et al.*, 2009).

1.3 - Expressão de genes e proteínas potencialmente relacionados com a infecção em *P. brasiliensis*

Estudos dos perfis de expressão gênica de patógenos têm sido utilizados para o conhecimento de estratégias de adaptação, sobrevivência e virulência que estes microrganismos utilizam durante a infecção. Com o objetivo de estudar a biologia de *P. brasiliensis* e suas estratégias de infecção, diferentes abordagens têm sido aplicadas.

Através da construção de um banco de ESTs de *P. brasiliensis*, Pb18, recuperado do baço de camundongos, identificou-se vários fatores prováveis de virulência através de comparações com homólogos de *Candida albicans* (Goldman *et al.*, 2003). Genes de vias de transdução de sinais têm sido implicados na transição morfológica e conseqüentemente na patogenicidade de fungos dimórficos. A identificação de alguns genes de *P. brasiliensis* homólogos a aqueles codificantes para proteínas de vias de transdução de sinal em *C. albicans*, como CST20 (quinase relacionada com formação de hifa), CPP1 (fosfatase relacionada com formação de hifa) e CEK1 (proteína quinase ativada por mitógenos) descritos por Goldman *et al.* (2003), sugere que estas vias possam estar atuando em *P. brasiliensis*, provavelmente controlando a mudança morfológica. O perfil transcricional de alguns destes genes identificados durante a transição foi avaliado e os dados demonstraram que transcritos

de três proteínas de choque térmico (HSP-70, HSP-82 e HSP-104), de um homólogo a delta-9-desaturase (OLE1) e da oxidase alternativa, possuem picos de expressão durante a transição de micélio para levedura, sugerindo que a estabilização de proteínas e mudanças na organização da membrana são fatores também importantes para a transição morfológica do fungo (Goldman *et al.*, 2003).

Um Projeto Genoma Funcional de *P. brasiliensis*, desenvolvido por um consórcio de laboratórios da região Centro-Oeste do Brasil (Projeto Genoma Funcional e Diferencial de *Paracoccidioides brasiliensis*, isolado Pb01), resultou no sequenciamento de 25.511 ESTs obtidas de bibliotecas de cDNA de levedura e micélio, abrangendo aproximadamente 6.022 genes (Felipe *et al.*, 2003; Felipe *et al.*, 2005). Tal estratégia possibilitou a detecção de genes diferencialmente expressos nas duas fases de *P. brasiliensis* delineando as principais vias metabólicas relacionadas ao controle do dimorfismo, crescimento em alta temperatura, estresse térmico e oxidativo e patogenicidade do fungo. Análises comparativas realizadas com outros fungos patogênicos humanos tais como *C. albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus* identificaram ainda possíveis fatores de virulência e prováveis alvos para drogas. Nestas análises pode-se também observar um perfil metabólico diferencial entre micélio e levedura. A forma miceliana foi caracterizada por apresentar um metabolismo aeróbio uma vez que durante a fase saprobiótica genes que codificam enzimas envolvidas na fosforilação oxidativa e no ciclo do ácido cítrico estão altamente expressos. Já a fase leveduriforme apresentou um aumento na expressão de genes codificantes para proteínas relacionadas com a fermentação alcoólica, como a álcool desidrogenase I (Felipe *et al.*, 2003; Felipe *et al.*, 2005). A sugestão de um metabolismo diferencial em *P. brasiliensis* foi corroborada em análises transcricionais realizadas por Nunes *et al.* (2005) na qual também observou-se aumento na expressão dos genes

codificantes para álcool desidrogenase I e piruvato decarboxilase durante o processo de diferenciação, onde 90% das células já estavam na forma de levedura.

Marques *et al.* (2004) e Andrade *et al.* (2005) utilizando as tecnologias de microarranjos e bibliotecas subtraídas identificaram genes diferencialmente expressos nas fases de *P. brasiliensis*, proporcionando maiores informações acerca da patobiologia deste microrganismo. Nestas análises, os genes de expressão modulada no micélio ou na levedura foram agrupados em duas classes. O primeiro grupo incluía genes relacionados à organização celular, manutenção da parede fúngica, membrana e citoesqueleto. O gene codificante para a proteína peroxissomal HEX, relacionada à integridade celular e o gene codificante para a proteína de parede celular 1,3- β -glicosidase envolvida no dimorfismo foram induzidos em micélio, enquanto que na fase leveduriforme observou-se uma indução dos genes codificantes para verprolina, quitina deacetilase e α -1,3-glucana sintase. A α -1,3-glucana sintase é o principal componente da parede celular da levedura, sendo descrita como um importante fator de virulência por driblar o mecanismo de reconhecimento do hospedeiro e promover o escape das células de defesa, contribuindo assim para a patogênese (San-Blas *et al.*, 1994). Também foi observado níveis aumentados de expressão do gene codificante para ERG25 na fase de levedura de *P. brasiliensis*. O gene *erg25* codifica uma C-4-esterol metil oxidase que participa do primeiro passo enzimático da síntese de ergosterol em fungos (Georgopapadakou, 1998). É provável que a indução na expressão da proteína ERG25 esteja correlacionada ao aumento da reutilização de lipídeos da membrana celular na levedura. Assim, sugere-se que mudanças na membrana são importantes fatores na transição morfológica a 36°C e a alta reutilização de lipídios da membrana também pode contribuir para o processo (Marques *et al.*, 2004; Andrade *et al.*, 2005).

O segundo grupo de genes classificados por Marques *et al.* (2004) e Andrade *et al.* (2005) consistem naqueles envolvidos no metabolismo celular e transporte de íons. Genes relacionados ao transporte de potássio e ferro-enxofre foram regulados positivamente no micélio. A captação destes íons seria importante para a manutenção do fungo no solo durante a fase saprobiótica. Já o gene codificante para um transportador tipo P de cátions, foi induzido na levedura. Adicionalmente, as observações de Paris *et al.* (1985) de que as células leveduriformes são incapazes de crescer na presença de enxofre inorgânico foram corroboradas nesses experimentos, na qual genes codificando enzimas do metabolismo de enxofre apresentaram uma indução nas células de levedura, indicando um estado auxotrófico para cisteína na fase patogênica de *P. brasiliensis*. Através destas análises, Marques *et al.* (2004) e Andrade *et al.* (2005) sugeriram que além da temperatura, o enxofre orgânico é um importante estímulo para manutenção da fase leveduriforme patogênica de *P. brasiliensis*.

O perfil transcricional de *P. brasiliensis* durante a transição dimórfica tem sido alvo de diversos estudos, uma vez que a alteração morfológica de micélio para levedura está intimamente relacionada com a patogênese do fungo. Microarranjos de DNA foram utilizados para análise de expressão genes diferencialmente expressos durante a transição morfológica (Nunes *et al.*, 2005). Através das análises pode-se identificar uma indução na expressão de genes codificantes para enzimas que participam do metabolismo de aminoácidos, vias de transdução de sinais, síntese protéica, metabolismo da parede celular, estrutura do genoma, resposta ao estresse oxidativo e controle de crescimento e desenvolvimento celulares. O gene codificante para a enzima 4-hidroxil-fenil-piruvato dioxigenase (4-HPPD), envolvida na degradação de aminoácidos aromáticos, foi induzido durante a diferenciação de micélio para levedura,

e o uso de um inibidor específico da atividade de 4-HPPD, foi capaz de bloquear o crescimento e a diferenciação deste organismo *in vitro* (Nunes *et al.*, 2005).

Análises transcricionais também foram realizadas para avaliar a resposta de *P. brasiliensis* nos estágios iniciais da transição micélio-levedura (Bastos *et al.*, 2007). Muitos genes envolvidos na síntese da membrana e parede celulares após 22 horas do início da diferenciação foram induzidos, sugerindo um remodelamento destas estruturas no estágio inicial da mudança morfológica. Neste estudo ainda, genes envolvidos na via de assimilação do enxofre como a sulfito redutase, mostraram-se induzidos durante a transição, reforçando o envolvimento do metabolismo do enxofre durante o processo de diferenciação, como descrito anteriormente. Durante a transição também foi verificada a presença de genes codificantes para as enzimas que participam do ciclo do glioxalato, como a isocitrato liase, malato desidrogenase, citrato sintase e aconitase. A presença destes transcritos durante a diferenciação indica que esta via metabólica é funcional durante o processo. Foram ainda identificados genes codificantes para proteínas das vias de transdução de sinais como MAPK, serina/treonina quinase e histidina quinase, sugerindo o papel de tais vias no controle e manutenção da transição morfológica de *P. brasiliensis* (Bastos *et al.*, 2007).

Visando identificar genes envolvidos na adaptação e sobrevivência do fungo no hospedeiro durante a infecção, análises de diferença representacional de cDNA (cDNA-RDA) foram empregadas. Por estas análises, identificaram-se genes de *P. brasiliensis* induzidos em células leveduriformes recuperadas de fígado de camundongos infectados e também genes de *P. brasiliensis* super regulados durante incubação do fungo com sangue humano para mimetizar a via de disseminação hematogênica. Transcritos codificantes para fatores de virulência, transportadores de nutrientes, proteínas de choque-térmico e síntese de melanina são induzidos em células leveduriformes de *P.*

brasiliensis recuperadas de fígado de animais infectados experimentalmente (Bailão *et al.*, 2006). Já no tratamento de *P. brasiliensis* com sangue humano, observou-se uma maior abundância de transcritos codificantes para proteínas do metabolismo de aminoácidos, remodelagem da parede celular, regulação da osmolaridade e moléculas relacionadas à defesa celular (Bailão *et al.*, 2006). Ainda utilizando da técnica de cDNA-RDA, Bailão *et al.*, (2007), analisaram genes preferencialmente expressos em células leveduriformes de *P. brasiliensis* tratadas com plasma humano, mimetizando sítios de infecção superficial. Foi possível detectar a indução de genes relacionados à síntese de proteínas, mudança de osmolaridade do meio, remodelamento de parede celular, defesa celular e transcritos codificantes para as enzimas da β -oxidação, sugerindo que *P. brasiliensis* priorize a degradação de lipídios, nesta condição (Bailão *et al.*, 2007).

Em outro estudo, em análises transcricionais de células leveduriformes de *P. brasiliensis* recuperadas do fígado de camundongos infectados, foi possível a identificação de diversos genes potencialmente relacionados à interação do fungo ao hospedeiro (Costa *et al.*, 2007). Através destas análises, novos genes induzidos foram identificados por comparação ao transcriptoma do fungo cultivado *in vitro* (Felipe *et al.*, 2005), fornecendo uma visão abrangente das adaptações metabólicas realizadas por *P. brasiliensis* durante a infecção. Genes codificantes para proteínas envolvidas na glicólise, na produção de etanol, na síntese de ácidos graxos, no ciclo do glioxalato e metabolismo de nitrogênio foram identificados como induzidos, sugerindo que estas respostas sejam fundamentais para sobrevivência do fungo no fígado do hospedeiro. A interpretação geral dos processos que ocorrem durante a infecção sugere que o fungo utiliza múltiplas fontes de carbono durante a colonização do fígado, incluindo glicose e substratos do ciclo do glioxalato. O metabolismo de nitrogênio pode ser muito ativo

durante o processo infeccioso, mostrando que alguns compostos nitrogenados podem ser preferencialmente adquiridos dos tecidos do hospedeiro, enquanto outros devem ser suplementados pelo patógeno. Adicionalmente, o favorecimento da biossíntese de lipídios sugere uma grande disponibilidade de carboidratos e energia. (Costa *et al.*, 2007).

Para avaliar a resposta de *P. brasiliensis* durante a fagocitose, Tavares *et al.* (2007) avaliaram o perfil de transcritos de *Pb01*, internalizado por macrófagos murinos. Nesta condição, genes envolvidos na biossíntese de metionina apresentaram um aumento na expressão, como o gene *metG* codificante para a proteína cistationa β -liase. Estudos de ruptura gênica de genes de *Salmonella enterica* envolvidos na produção de metionina mostraram que a síntese deste aminoácido é essencial durante o processo infeccioso (Ejim *et al.*, 2004). Assim, através desta análise Tavares *et al.*, (2007) sugeriram que a regulação dos genes envolvidos nesta via metabólica poderia conferir uma importante resposta adaptativa de *P. brasiliensis* para sobrevivência no interior dos macrófagos onde a concentração de aminoácidos disponíveis é baixa. Neste estudo, pôde-se também observar a indução de genes relacionados com estresse oxidativo e choque térmico, além de uma inibição na expressão de genes relacionados com a glicólise (Tavares *et al.*, 2007). Em resposta ao estresse oxidativo gerado por macrófagos, *P. brasiliensis* induz a expressão de genes codificantes para enzimas antioxidantes como superóxido dismutase, eficientes na detoxificação de espécies reativas de oxigênio (EROs). A HSP60 é uma chaperona mitocondrial, homóloga a chaperona GroEL de *Escherichia coli* (Bukau & Horwich, 1998), que está envolvida na resposta celular ao estresse oxidativo (Cabiscolet *et al.*, 2002). Tem sido observado que células que apresentam altos níveis de HSP60 são mais resistentes a agentes oxidativos como H_2O_2 e menadiona. A indução do gene codificante da HSP60 em *P. brasiliensis*

exposto a radicais oxidativos produzidos por macrófagos, pode ter função protetora similar (Tavares *et al.*, 2007).

Ainda com o intuito de avaliar a resposta de *P. brasiliensis* à EROs produzidas pelo próprio metabolismo fúngico ou pelas células fagocitárias do hospedeiro, foram realizados ensaios de atividade em gel para catalases. Através destas análises podem-se identificar três catalases em *P. brasiliensis*: *PbCATA*, *PbCATP* e *PbCATC*. A expressão da catalase de subunidade grande *PbCATA* está relacionada à condições de estresse oxidativo endógeno, enquanto que a catalase peroxissomal *PbCATP* é induzida em condições de estresse oxidativo exógeno. Já *PbCATC* responde a condições de estresse osmótico e térmico. Durante a fagocitose de *P. brasiliensis* por macrófagos observou-se um aumento de expressão dos transcritos para a catalase A e catalase P, sugerindo que estas enzimas possam estar envolvidas na resposta e proteção do fungo contra EROs produzidas nesta condição (Chagas *et al.*, 2008).

Recentemente, Peres da Silva *et al.* (2011) avaliaram o perfil de expressão diferencial em *P. brasiliensis* durante infecção em queratinócitos orais (NOKs). O perfil de expressão gênica do fungo foi determinado após contato com as células, no intuito de caracterizar os genes e as proteínas diferencialmente expressos durante infecção por *P. brasiliensis*. Após o contato com as células NOKs, o fungo pareceu induzir alterações nestas células, na qual apresentaram extensões celulares e cavitações, provavelmente resultante de alterações no citoesqueleto de actina em 5, 8 e 14 horas após a infecção. Nas análises transcricionais de *P. brasiliensis* durante a infecção em queratinócitos pode-se ainda identificar genes induzidos envolvidos em diferentes processos biológicos, como metabolismo de proteínas, metabolismo alternativo de obtenção carbono, resposta ao estresse e transporte de zinco. A indução do transcrito para o transportador de zinco indica que ocorra nesta condição uma ativação de vias

metabólicas relacionadas a detoxificação celular, além de sugerir que este transportador seja um potencial alvo para o desenvolvimento de futuros medicamentos de controle do fungo (Peres da Silva *et al.*, 2011).

Diversos estudos têm buscado também identificar proteínas que devem contribuir para o desenvolvimento de processos infecciosos por *P. brasiliensis* no hospedeiro. Utilizando a tecnologia de indução de antígenos *in vivo* (IVIAT), Dantas *et al.*, (2009) identificaram proteínas imunogênicas expressas em altos níveis durante a infecção por *P. brasiliensis*. Antígenos relacionados à via de melanização (*Pbdde*), síntese de riboflavina (*Pbls*) e um transportador de cobre de alta afinidade (*Pbctr3*) foram identificados. Análises de expressão por RT-PCR quantitativa (qRT-PCR) mostraram um aumento de expressão dos transcritos codificantes para estes antígenos, 15 dias após infecção em fígado e baço e durante infecção em macrófagos, sugerindo um papel importante destas proteínas como antígenos nos processos de interação de *P. brasiliensis* com o hospedeiro.

Como descrito anteriormente, a transição morfológica de *P. brasiliensis* é um fator crucial para o estabelecimento da infecção. Portanto, a identificação de proteínas envolvidas nesse processo provém uma importante visão da reorganização metabólica do fungo durante a morfogênese. Assim, Rezende *et al.* (2011) realizaram uma comparação proteômica entre micélio, transição de micélio para levedura e levedura de *P. brasiliensis*. Através das análises proteômicas comparativas pode-se identificar no micélio um aumento na expressão de proteínas relacionadas à proteção contra as EROs. Como a fase micelial apresenta um metabolismo mais aeróbio comparado a levedura (Felipe *et al.*, 2005), a super regulação de proteínas antioxidantes, como Mn superóxido dismutase e peroxiredoxina, seria uma estratégia para proteção de *P. brasiliensis* contra as EROs derivadas da respiração (Rezende *et al.*, 2011). Como esperado, diversas

proteínas de choque térmico foram induzidas durante transição de micélio para levedura, incluindo HSP-88, HSP-90 e HSP-70. As análises proteômicas ainda indicaram uma reorganização do metabolismo de carboidratos em *P. brasiliensis* durante a transição. Enzimas envolvidas nas reações não oxidativas da via das pentoses fosfato, como transcetolase e transaldolase, foram super reguladas durante transição de micélio para levedura, uma vez que a indução da via durante a transição poderia fornecer substratos para as enzimas da glicólise, que se mostrou induzida na levedura (Rezende *et al.*, 2011). Outra mudança detectada através deste estudo foi o aumento de expressão da enzima álcool desidrogenase, após 22 horas de transição, sugerindo um direcionamento para o metabolismo mais anaeróbio na fase de levedura, aspecto consistente com estudos transcricionais previamente descritos (Felipe *et al.*, 2005; Nunes *et al.*, 2005; Rezende *et al.*, 2011).

A habilidade de capturar nutrientes do meio é fundamental para o crescimento de fungos patogênicos, assim a redução da disponibilidade de ferro e outros micronutrientes consiste em um mecanismo de defesa do hospedeiro para eliminar patógenos e combater a doença (Doherty, 2007). Neste sentido, a ausência de ferro livre nos tecidos infectados demanda que os patógenos desenvolvam um eficiente sistema de captura do ferro para competir com mecanismos de restrição do hospedeiro (Johnson, 2008). No intuito de avaliar a adaptação de *P. brasiliensis* a condições de restrição de ferro no hospedeiro, Parente *et al.* (2011) avaliaram o perfil protéico do fungo em condições de depleção de ferro em comparação com condições de ferro em abundância. As proteínas identificadas que apresentaram um aumento de expressão em condições de depleção de ferro estavam relacionadas com a via glicolítica e aquisição de ferro. Enzimas do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), ciclo do glioxalato, ciclo do metilcitrato e cadeia transportadora de elétrons foram reprimidas em decorrência da

limitação do micronutriente. Uma correlação entre proteína e nível de transcritos foi também observado através de análises por qRT-PCR a partir do RNA de *P. brasiliensis* submetido a condições de restrição de ferro e também de células do fungo isoladas do baço de camundongos infectados. Em ambas as condições o transcrito para a enzima da via glicolítica, triose fosfato isomerase, apresentou um aumento de expressão enquanto que os transcritos para as enzimas do ciclo do glioxalato, isocitrato liase e metilcitrato sintase, tiveram uma expressão reduzida. Estas análises sugerem que em condições de baixa concentração de ferro, *P. brasiliensis* aumentaria a expressão de proteínas relacionadas ao sistema de captura do metal e direcionaria seu metabolismo energético para vias que independessem de ferro (Parente *et al.*, 2011).

1.4 - Perfis metabólicos de patógenos em nichos do hospedeiro

A capacidade infectiva de microrganismos patogênicos está relacionada com a complexa interação entre o patógeno e o hospedeiro. A interação é um processo dinâmico, envolvendo a capacidade do organismo patogênico em atravessar o epitélio, em disseminar para diversos tecidos e resistir à defesa imune. Portanto, o sucesso da infecção requer uma rápida adaptação do patógeno através de mudanças na expressão de determinados repertórios gênicos requeridos frente às diferenças de micro-ambientes, caracterizando um processo de expressão nicho específicos (Kumamoto, 2008).

O fungo patogênico *C. albicans* comumente causa infecções superficiais em mucosas, porém em pacientes imuno comprometidos este fungo pode penetrar em tecidos, entrar na corrente sanguínea e se disseminar para outros sítios causando infecções sistêmicas. Como este processo de disseminação é um passo essencial na candidíase sistêmica, o entendimento de como o fungo pode sobreviver nos diferentes nichos pode não só elucidar a complexa interação hospedeiro-fungo, mas também

identificar novos potenciais alvos para drogas, prevenindo esta forma da doença. É provável que este fungo expresse um grupo diferente de genes que habilitaria a adaptação das células a este novo ambiente hostil e permitiria a adesão e penetração das células através da camada endotelial para invadir novos tecidos (Walker *et al.*, 2009). O padrão de expressão gênica de *C. albicans* foi avaliado para conhecimento da natureza da interação parasito-hospedeiro em diferentes estágios de infecção. Para elucidar a resposta de *C. albicans* durante disseminação na corrente sanguínea, o perfil transcricional do fungo exposto ao sangue humano foi analisado por meio de microarranjos e ensaios de subtração de cDNA. A combinação dos dados obtidos por ambos os métodos permitiram a identificação de diferentes grupos de genes especificamente expressos, relacionados a diferentes condições de estresse, resposta antioxidante, virulência e genes envolvidos na obtenção de energia através da via glicolítica e ciclo do glioxalato. As análises fornecem informações a respeito dos mecanismos pelos quais *C. albicans* pode sobreviver e adaptar ao ambiente hostil do sangue como um passo essencial da candidíase disseminada (Fradin *et al.*, 2003; Fradin *et al.*, 2005).

Após romper a barreira hematogênica, *C. albicans* pode provocar processos infecciosos em diversos órgãos como rins, fígado e baço. Em modelos de infecção por *C. albicans* em rins de camundongos pode-se observar uma resposta transcricional adaptativa, relacionada com a indução de genes envolvidos na formação de hifas invasivas, um aspecto fundamental para o desenvolvimento de candidíase sistêmica. Além disso, através destes ensaios de microarranjos pode-se ainda observar que nos rins, o fungo possivelmente assimila compostos de seis carbonos através da via glicolítica, uma vez que genes relacionados com ciclo do glioxalato e da gliconeogênese são reprimidos neste nicho (Fradin *et al.*, 2003; Andes *et al.*, 2005).

O perfil transcricional de *C. albicans* durante invasão no fígado também foi avaliado, através de análises de microarranjo a partir de RNA do fungo isolado de modelos de infecção *in vivo* e *ex vivo*. Nestas análises foram identificados genes relacionados a processos metabólicos para obtenção de fontes alternativas de carbono e nitrogênio, resposta ao estresse, captura de nutrientes, genes de regulação morfológica e também relacionados à formação da hifa. Pode-se ainda observar uma indução de genes relacionados tanto com a assimilação de fontes de seis e dois carbonos, já aqueles relacionados com metabolismo de aminoácidos não apresentaram alteração significativa na expressão, sugerindo que no fígado o patógeno possui uma maior plasticidade metabólica podendo utilizar variadas fontes de energia (Thewes *et al.*, 2007).

Utilizando ensaios de microarranjo em modelos de infecção *in vitro* e de amostras fúngicas de pacientes com candidíase na mucosa oral, tem sido observada a indução de genes associados à formação de hifas, bem como genes envolvidos na resposta a diferentes condições de estresse, tais como estresse oxidativo, limitação de fontes de carbono e nitrogênio e estresse nitrosativo. Adicionalmente, diversas adesinas e proteases foram também induzidas no fungo colonizando este nicho. O estudo de genes induzidos durante infecção por *C. albicans* na cavidade oral é importante para compreender quais são as estratégias adaptativas do fungo, que fazem com que este deixe de ser um organismo comensal deste ambiente e passe a parasitar o hospedeiro (Kniemeyer *et al.*, 2011; Martin *et al.*, 2011).

Durante todas as etapas de progressão da doença por *C. albicans* o fungo é desafiado pelas células efectoras do hospedeiro que buscam eliminar o patógeno e controlar a doença. A patogenicidade de *C. albicans* depende de sua habilidade em responder efetivamente aos mecanismos de defesa do hospedeiro, especialmente as EROs das células fagocitárias. Diversas análises têm sido realizadas no intuito de

verificar a respostas adaptativas de *C. albicans* durante os processos de fagocitose. Lorenz *et al.* (2004) verificaram que durante a fagocitose por macrófagos e neutrófilos o fungo é submetido a um ambiente pobre em fontes de nitrogênio e glicose. Assim, no interior de fagossomos, *C. albicans* apresenta um aumento na expressão de genes codificantes para proteínas envolvidas na captura e biossíntese de aminoácidos, enquanto que genes relacionados à via glicolítica não são induzidos neste ambiente. Estas análises de microarranjo revelaram ainda que durante a fagocitose, transcritos para enzimas do metabolismo de lipídios são super regulados em *C. albicans*, uma vez que os lipídios seriam a principal fonte de carbono para o fungo neste nicho. A clara repressão de genes relacionados com o metabolismo de compostos de seis carbonos, somado com a indução de genes envolvidos com metabolismo de lipídios, ácidos graxos, ciclos do glioxalato e do ácido tricarbóxico sugere que este organismo está utilizando vias metabólicas alternativas para obtenção de energia, devido a pouca disponibilidade de glicose (Lorenz *et al.*, 2004; Fernandez-Arenas *et al.*, 2007).

Ainda analisando a resposta de *C. albicans* ao sistema mononuclear fagocítico observou-se que as células do fungo ativam uma resposta ao estresse oxidativo em consequência da fagocitose por neutrófilos, embora a fagocitose por macrófagos não ative esta resposta. Significativamente, somente uma pequena porção de células do patógeno (4%) responde ao estresse oxidativo durante infecção em rins de camundongos. Assim, sugere-se que a resposta ao estresse oxidativo durante o estabelecimento e progressão da infecção sistêmica de *C. albicans* seja um fenômeno nicho-específico (Enjalbert *et al.*, 2007).

Esta plasticidade metabólica adaptativa a diferentes nichos pode também ser observada em outros modelos de infecção fúngica. O fungo patogênico *C. neoformans* possui a habilidade de disseminar-se na corrente sanguínea e então cruzar a barreira

sangue-cérebro causando a meningoencefalite. Utilizando-se a estratégia de análise serial de expressão gênica (SAGE) em células de *C. neoformans* isoladas de fluido cerebrospinal (CSF) de coelhos, o perfil de abundância de transcritos foi caracterizado, visando o entendimento das estratégias de sobrevivência/virulência do fungo na infecção *in vivo*. Os dados revelaram que os transcritos mais expressos foram aqueles relacionados com resposta a estresse, sinalização celular, transporte celular, metabolismo de lipídios e carboidratos. O alto nível de expressão de genes destas categorias sugere que estas funções são requeridas para sobrevivência e proliferação do *C. neoformans* na meningoencefalite (Steen *et al.*, 2003). Em modelos de criptococose pulmonar, foram induzidos transcritos relacionados com a assimilação de ácido-úrico e prolina, produção de basidiósporos, formação de melanina, desenvolvimento da cápsula e crescimento em altas temperaturas. As adaptações transcricionais realizadas por *C. neoformans* durante infecção no pulmão são amplamente descritas como importantes para desenvolvimento de um processo infeccioso severo e eficiente (Lee *et al.*, 2011).

Da mesma forma que em *C. albicans*, a capacidade de resistir às células fagocíticas caracteriza uma importante adaptação para sobrevivência de *C. neoformans* no hospedeiro. Os mecanismos utilizados pelo fungo para evadir os processos de fagocitose, envolve a indução da via metabólica de síntese da melanina para proteção contra as EROs, alterações morfológicas que dificultam internalização do patógeno, além de um direcionamento do metabolismo para uma maior eficiência na assimilação de fontes de carbono e nitrogênio. Assim, observa-se uma inibição da via glicolítica, indução das vias de assimilação de aminoácidos e utilização de lipídeos como fonte de energia, uma vez que a disponibilidade de glicose e aminoácidos é limitada nos fagossomos (Okagaki *et al.*, 2010; McQuiston *et al.*, 2011). Neste sentido, pode-se também observar em *C. neoformans* uma resposta metabólica nicho específica, onde

diferentes repertórios gênicos são induzidos em decorrência da resistência encontrada pelo fungo nos diferentes tecidos do hospedeiro (Ravi *et al.*, 2009).

Em outro modelo de infecção fúngica pelo fungo filamentosos *Aspergillus fumigatus*, genes codificantes para proteínas reguladoras do desenvolvimento, biossíntese de micotoxinas e resposta a estresse térmico foram induzidos (Gravelat *et al.*, 2008). Nesse patógeno, a avaliação da resposta gênica diferencial em conídios e hifas em resposta a interação com neutrófilos, envolveu a ativação de processos metabólicos relacionados com a degradação de ácidos graxos, ploriferação peroxissomal, ciclo do glioxalato e assimilação de ferro/cobre. Os dados revelam a complexa resposta de *A. fumigatus* a leucócitos, além de identificar genes que podem estar envolvidos no estabelecimento e desenvolvimento de infecções em humanos (Sugui *et al.*, 2008). O perfil transcricional, acompanhado pela análise de mutantes tem mostrado que a privação nutricional, estresse oxidativo, hipóxia, estresse térmico e perturbações na membrana plasmática representam os maiores desafios enfrentados por *A. fumigatus* durante a infecção. O conhecimento sobre as vias celulares e perfis adaptativos do patógeno na tentativa de neutralizar as defesas do hospedeiro são cruciais para identificação de novos alvos de drogas nicho específicos (Hartmann *et al.*, 2011).

Portanto, os patógenos regulam seu metabolismo em resposta aos diferentes tipos de estresse e as variadas quantidades de nutrientes disponíveis no nicho em que se encontram, durante o desenvolvimento do processo infeccioso (Kumamoto, 2008).

JUSTIFICATIVAS

OBJETIVOS

2 – JUSTIFICATIVAS

Em função do exposto observa-se a relevância do conhecimento espacial e temporal de aspectos metabólicos de patógenos durante a infecção. Acredita-se que em microrganismos patogênicos a utilização preferencial de vias metabólicas em decorrência de sítios do hospedeiro possa ser, além de relevante para o conhecimento da biologia e patogenia dos organismos, úteis como alvos para intervenção terapêutica.

Poucas informações existem sobre mudanças na expressão de genes de *P. brasiliensis* durante o processo de infecção. Estudos anteriores, revelaram algumas estratégias do fungo para adaptação a condições do hospedeiro durante o processo infeccioso no fígado (Costa *et al.*, 2007) e durante disseminação no sangue (Bailão *et al.*, 2006). Neste contexto, a identificação de ESTs de *P. brasiliensis*, recuperado de granulomas de animais experimentais é um requisito essencial para fornecer dados necessários na elucidação dos mecanismos de virulência e patogênese. Por ser um órgão do sistema linfático, o baço é caracterizado como um ambiente hostil com aglomerações de células efectoras. O estudo da resposta de *P. brasiliensis* a esse nicho permitiria ampliar o conhecimento das diferentes estratégias adaptativas utilizadas pelo fungo para escapar e sobreviver às defesas do hospedeiro.

3 – OBJETIVOS

Visando o estudo da interação de *P. brasiliensis* com o hospedeiro o presente trabalho objetivou avaliar o perfil de expressão gênica deste fungo recuperado do baço de modelos experimentais, o que potencialmente mimetiza o ambiente encontrado pelo microrganismo no hospedeiro humano. Assim, o trabalho apresentou os seguintes objetivos específicos:

- 1 - Obtenção de bibliotecas subtraídas de ESTs de *P. brasiliensis*, através da técnica de cDNA-RDA (Fig. 1), nas seguintes condições experimentais:
 - *P. brasiliensis* recuperado do baço de camundongos infectados após 7 dias de infecção;
 - *P. brasiliensis* recuperado do baço de camundongos infectados após 15 dias de infecção;
- 2- Caracterização e categorização das sequências obtidas através de anotação utilizando o programa BLAST2GO.
- 3- Confirmação, por qRT-PCR, da expressão diferencial de genes identificados.
- 4- Avaliação da atividade enzimática de proteínas que tiveram seus transcritos identificados nas análises de RDA
- 5- Análise e compreensão das possíveis estratégias moleculares utilizadas por *P. brasiliensis* durante infecção no baço.

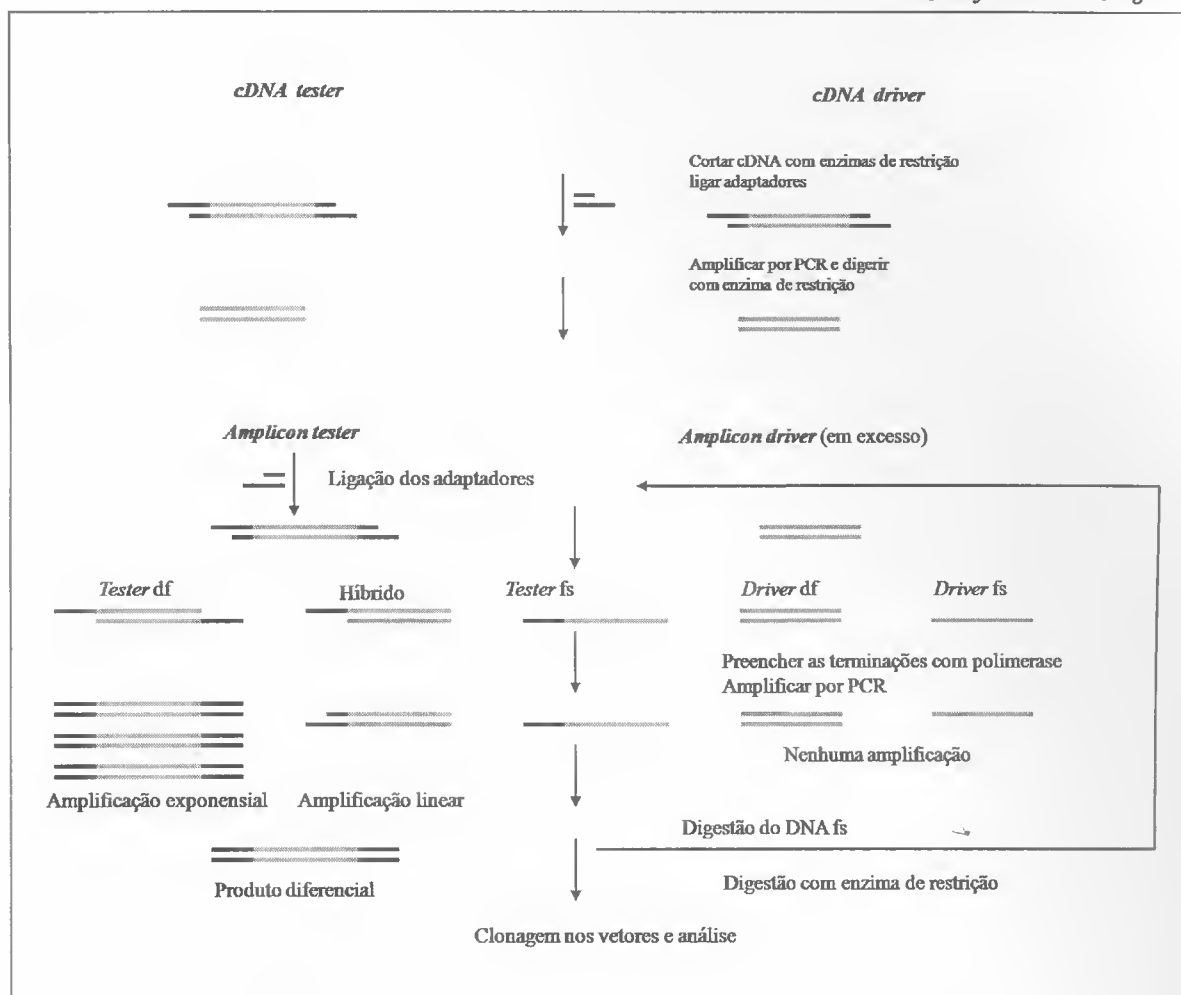


Fig.1 – Diagrama esquemático da metodologia do RDA. Os cDNAs são digeridos com enzima de restrição *Sau3AI* para gerar fragmentos menores para serem mais eficientemente amplificáveis por PCR e com sítios de restrição para ligar os adaptadores. Os produtos da digestão são purificados em sistema comercial GFX (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK), ligados aos adaptadores (16 h a 16 °C) e amplificados por PCR (25 ciclos de 45 s a 95 °C e 4 min a 72°C, cada). Os produtos finais da reação de PCR são purificados com o sistema comercial GFX. Ambos, *tester* e *driver* são digeridos com *Sau3AI* para remoção dos adaptadores e purificados antes da ligação de um novo par de adaptadores somente no *tester*. Para a geração do primeiro produto diferencial, *driver* e *tester* são hibridizados, numa relação de 10:1, por 16 h a 67 °C e amplificados por PCR (7 ciclos de 45 s a 95 °C e 3 min a 72 °C, cada). Os produtos são submetidos a uma nova etapa de amplificação (20 ciclos) para remoção dos cDNAs fita simples não desejados. Para geração de um segundo produto diferencial, novos adaptadores são ligados ao primeiro produto diferencial, que é hibridizado ao *driver* numa relação de 100:1.

MANUSCRITO

Transcriptional profile of *Paracoccidioides brasiliensis* derived from spleen of infected mice

Ronney F. Chagas^{1,2}; Kelly P. Castro^{1,2}; Maristela Pereira¹; Leandro Nascimento da Silva Rodrigues¹; Wellington S. Martins³; Clayton L. Borges¹; Alexandre M. Bailão¹; Célia Maria de A. Soares^{1*}

¹Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil; ²Faculdade de Medicina - Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil; ³Instituto de Informática, Universidade Federal de Goiás, 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 62 35211110; e-mail: cmasoares@gmail.com

Abstract

Paracoccidioidomycosis (PCM), caused by the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*, is a disseminated, systemic disorder that involves the lungs and other organs. In order to survive in such diverse environments within the host, *P. brasiliensis* cells probably express genes needed to overcome the challenges unique to certain sites. Here, we employed representational difference analysis (RDA) to identify genes differentially expressed in the fungus derived from infected mouse spleens. The upregulated transcripts of *P. brasiliensis* during spleen infection were mainly related to enzymes of the beta-oxidation, fatty acids and triacylglycerol synthesis and response to oxidative and reductive stress. To validate the significance of our RDA results were determined the transcript levels of selected genes in yeast cells recovered directly of spleen, without growth in culture medium. In addition, enzyme activity assays and triacylglycerol levels measurement validated the differential regulation of transcripts identified. The analyses of the functional categories to which these upregulated genes belong provide an important view of the metabolic adaptation of *P. brasiliensis* for the survival and growth in the host.

Keywords: *Paracoccidioides brasiliensis*; Representational difference analysis; Spleen infection

1. Introduction

Paracoccidioides brasiliensis is a thermally dimorphic pathogen, the causative agent of paracoccidioidomycosis (PCM), a human systemic mycosis that constitutes a major health problem in South America (Restrepo *et al.*, 2001). In the soil, the fungus grows as saprobic mycelium and after penetrating the host, *P. brasiliensis* differentiates into the yeast form, a fundamental step for the successful establishment of the disease (San-Blas *et al.*, 2002). The infection occurs primarily in the lungs by inhalation of infectious propagules -conidia or mycelial fragments - from where the fungus can establish chronic granulomatous reactions in mucocutaneous areas as well as in major organs such as the spleen, liver and brain (Franco, 1987).

In order to establish a successful infection, *P. brasiliensis* that colonize within the dynamic substrate of a human host must have the ability to adapt to and modify gene expression in response to changes in the host niches (Pereira *et al.*, 2009). Several approaches have been developed to identify genes putatively related to the host-fungus interaction. *P. brasiliensis* response during phagocytosis by macrophages evolves expression of genes implicated in glucose and amino acid depletion, cell wall metabolism, and oxidative stress, demonstrating a considerable degree of transcriptional plasticity of the fungus in response to the hostile environment of macrophages (Tavares *et al.*, 2007). Genes related to the beta-oxidation, methylcitrate cycle, melanin synthesis, gluconeogenesis, iron uptake and response to osmotic stress were the most upregulated upon *P. brasiliensis* blood contact (Bailão *et al.*, 2006). Costa *et al.*, (2007) analyzed expressed sequences tags (ESTs) from a non-normalized cDNA library derived from RNAs of *P. brasiliensis* recovered from liver of infected mice. During colonization in this tissue, lipid biosynthesis, glyoxylate cycle, glycolysis, ethanol production, melanin synthesis and iron/copper uptake seems to be induced as demonstrated by transcriptional

analysis (Costa *et al.*, 2007). Taken together, the approaches suggest specific metabolic adaptations of *P. brasiliensis* during disease progression.

In this context, we used the representational difference analysis (RDA) to identify *P. brasiliensis* genes induced during the infective processes on spleen in a PCM experimental model. We discovered differentially regulated genes related to degradation of fatty acids, lipids biosynthesis, nutrients acquisition and oxidative/reductive stress, evidencing the most upregulated metabolic and cellular processes in response to host-pathogen interaction. Furthermore, *in vivo* gene expression analysis in *P. brasiliensis* recovered directly from infected spleen confirmed the expression pattern of selected genes. The data obtained here must assess knowledge of the mechanisms used by *P. brasiliensis* to recognize and adapt to diverse microenvironments it encounters in the host.

2. Materials and Methods

2.1. Microorganism and growth conditions

Yeast cells were obtained by growing *P. brasiliensis*, Pb01 (ATCC MYA-826) in Fava-Netto's medium [1% (w/v) peptone; 0.5% (w/v) yeast extract; 0.3% (w/v) proteose peptone; 0.5% (w/v) beef extract; 0.5% (w/v) NaCl; 4% (w/v) glucose; 1% (w/v) agar; pH 7.2] for 7 days at 36°C as previously described (Barbosa *et al.*, 2006).

2.2. Preparation of inocula and infection of mice with *P. brasiliensis*

Mice were infected as previously described (Nogueira *et al.*, 2010). Female BALB/c mice were infected intraperitoneally with 1×10^8 yeast cells and killed on the 7th and 15th day after infection; spleens were removed and homogenized. Aliquots (100 mL) of this suspension were plated onto brain heart infusion (BHI) agar (Becton-Dickinson,

Franklin Lakes, NJ, USA) supplemented with 5% FBS and 1% (w/v) glucose. After 7 days, total RNA and protein were obtained from yeast cells (1×10^{10}). Control cDNA was prepared by growing *P. brasiliensis* yeast cells in the medium above. All animal experiments were performed in accordance with the international rules for animal experimentation. The animal protocol was approved by the Universidade Federal de Goiás committee of ethical treatment of animals (Number:131/2008).

2.3. Subtractive hybridization and generation of subtracted libraries

Total RNA from *P. brasiliensis* was extracted with the Trizol method, according to manufacturer's instructions (GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). cDNA was synthesized and amplified using SMART PCR cDNA synthesis kit (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, USA). In this study, 1.0 µg of total RNAs was used to generate each cDNA population for use in the subtraction procedure. Subtractive hybridization was performed according to the procedures previously described (Bailão *et al.*, 2006). Subtracted cDNA libraries were constructed using as driver the cDNA derived from RNAs obtained from control and as testers the cDNAs from RNAs extracted from *P. brasiliensis* derived from spleen after 7 and 15 days of infection and cultured for 7 days in BHI medium. In brief, the synthesized double-stranded cDNAs were subjected to *Sau3AI* digestion, adaptor ligation (a 24-mer annealed to a 12-mer), two rounds of subtractive hybridization using tester-driver ratios 1:10 and 1:100, respectively, and subsequent PCR amplifications. After two repetitions of the subtractive steps, the finally subtracted cDNAs were cloned and sequenced using a MegaBACE 1000 DNA sequencer (GE Healthcare).

2.4. EST processing pipeline, annotation and sequence analysis

Initially, the EST sequences were processed using Phred (Ewing and Green, 1998) and Crossmatch programs (<http://www.genome.washington.edu/UWGC/analysistools/Swat.cfm>) and were then assembled into contigs by using CAP3 (Huang and Madan, 1999). All these tools integrated in a specific pipeline (<http://www.lbm.icb.ufg.br:82/sistema-4.0>). All the clustered sequences were queried for similarity using Blast X (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) sequence comparison software against the nucleotide database generated from *P. brasiliensis* structural genome (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html). Aiming to name and identify a functional category, the hypothetical sequences were queried for similarity using Blast X against the GenBank non-redundant (nr) database from National Center for Biotechnology Information (NCBI). The database sequence matches were considered significant at e-values $\leq 10^{-10}$. The search for functional categories was performed by using the bioinformatic tool Blast2GO (Conesa *et al.*, 2005). The Blast2GO annotation algorithm already took multiple parameters into account such as sequence similarity, BLAST HSP (highest scoring pair) length and e-values, the GO hierarchical structure and GO term evidence codes (Conesa *et al.*, 2005; Götz *et al.*, 2008). The sequences identified were sorted into functional categories based on the MIPS functional categories database (Munich Center for Protein Sequences; <http://mips.gst.de/>).

2.5. Recovery of *P. brasiliensis* from a systemic infection site

This experimental step was performed as previously described (Parente *et al.*, 2011). Briefly, the spleens obtained from intraperitoneally infected mice were placed in 1 mL of water and homogenized with a mechanical grinder. Homogenates were filtrated to

remove large tissue debris and rapidly frozen with liquid nitrogen to stop transcription. The flow through was treated with Triton X-100 (final concentration, 1%) for 20 min at 37 °C and the tissue suspensions were centrifuged at 500 x g for 5 min to further remove animal tissue. The collected supernatants were centrifuged at 7000 x g for 15 min and the pellet was processed for total RNA isolation.

2.6. Quantitative analysis of RNA transcripts by reverse transcription real-time (qRT-PCR)

The qRT-PCR assay was performed to confirm the RDA results and the reliability of our approaches. Total RNA from *P. brasiliensis* control yeast cells and from yeast cells recovered from the spleen of infected mice were obtained as previously described above. The RNA was reversibly transcribed using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) and oligo(dT)15 primer. Quantitative RT-PCR analysis was performed on a StepOnePlus realtime PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The reaction mixtures contained 40 ng of cDNA and 10 picomoles of each primer in a total volume of 25 μ L SYBR green mixture (Applied Biosystems). PCR thermal cycling was performed at 40 cycles of 95°C for 15 s followed by 60°C for 1 min. Following, the PCR melting-curve analysis was performed, which confirmed that the signal corresponded to a single PCR product. The data were normalized with transcript encoding α -tubulin amplified in each set of qRT-PCR experiments. A nontemplate control was also included to eliminate contamination or nonspecific 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 (Bookout *et al.*, 2006). The oligonucleotides used in the qRT-PCR analyses are showed in supplementary Table 1.

2.7. Preparation of *P. brasiliensis* protein extract

The *P. brasiliensis* crude protein extract was obtained by disruption of frozen yeast cells in the presence of the protease inhibitors: 50 µg/mL *N*- α -*p*-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK), 1 mM 4-chloromercuribenzoic acid (PCMB), 20 mM leupeptin, 20 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), and 5 mM iodoacetamide in homogenization buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.8, 2 mM CaCl₂). The mixture was centrifuged at 12000 X *g* at 4°C for 10 min, and the supernatant was used for further analysis.

2.8. Determination of enzymatic activities

The enzymatic assays were performing using *P. brasiliensis* protein extracts obtained from yeast cells derived from infected spleen and cultivated for 7 days in BHI medium and yeast cells grown only in BHI medium, as control. Assay for thioredoxin reductase activity were carried out by the DTNB [5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)] reduction at 30 °C (Arner *et al.*, 1999). The protein extract was added to the reaction mixture containing 400 µM DTNB (Sigma Aldrich, Co., St. Louis, Missouri, USA) and 0.2 mM NADPH in assay buffer (100 mM potassium phosphate pH 7.0 and 2 mM EDTA). The activity was calculated by the increase in absorbance at 412 nm using a molar extinction coefficient of 27.2 mM⁻¹ cm⁻¹, since reduction of DTNB by 1 mol of NADPH yields 2 mol of 2-nitro-5-thiobenzoate. Each measurement was conducted in triplicate. Thiolase activity was assayed by measuring the decrease in absorbance at 303 nm at 25°C as reported by Miyazawa *et al.* (1980). The reaction mixture contained the following in a total volume of 1 mL: 100 pmol Tris-Cl pH 8.3, 25 pmol MgCl₂, 50 pmol KCl, 20 nmol acetoacetyl-CoA (Sigma Aldrich, Co.). The molar absorption coefficient under the assay conditions was 21400 M⁻¹ cm⁻¹. Units of enzyme activities (U) are

expressed as pmol of substrate utilized per min. Each measurement was conducted in triplicate.

2.9. Lipids analysis

Lipids were extracted from yeast cells derived from infected spleen and cultivated for 7 days in BHI medium and yeast cells grown only in BHI medium, by the modified method of Hara and Radin (1978). Briefly, 9 mL of extraction solution [3:2 (v/v) hexane: isopropanol] was added to 0.5 g of *P. brasiliensis* yeast cells and homogenized using glass beads for 8 h at room temperature. After homogenization, the organic phase was separated by centrifugation at $2000 \times g$ for 10 min, dehydrated by 3 M sodium sulphate at pH 7.0 and finally used for the triglycerides assay. The triglycerides assays were processed according to the method of Neri and Frings (1973). In brief, in tubes appropriately labeled containing 98 μM of aluminum oxide previously washed 8 to 10 times with water were added 9.7 mL isopropanol followed by 0.3 mL of water to blank, 0.3 mL of 2 mM triolein (Sigma Aldrich, Co.) to standard samples or 0.3 mL of lipids suspension. The tubes were centrifuged for 15 min and 2.0 mL of the supernatant were homogenized with 0.60 mL of the saponification reagent [1.8 M KOH; 25% (v/v) isopropanol]. The obtained solution was vortexed and maintained at room temperature for 5 min. After this time, were added 1.5 mL of periodate reagent [1.4 μM anhydrous ammonium acetate; 3 mM sodium metaperiodate (Sigma Aldrich, Co.) and 6% (v/v) glacial acetic acid] and 1.5 mL of acetylaceton reagent [0.4% (v/v) 2,4-pentandione (Sigma Aldrich, Co.) and 96% (v/v) isopropanol]; the tubes were covered with parafilm and placed in a water bath (65-70 °C) for 15 min. The samples were removed, cooled to room temperature and the absorbances were measured at 405 nm, within 1 h.

2.10. Reductive stress conditions *in vitro*

To induce a state of accumulation of reducing equivalents, yeast cells of *P. brasiliensis* were treated with 2.5 mM of DTT and samples were removed at 2, 4, 6 and 8 h. The reductive stress induced by treatment with DTT was evaluated by measuring the mitochondrial-dependent reduction of colorless 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) to a colored blue formazan, as previously described (Kim *et al.*, 2009). In brief, the cells treated with reductive stressor for the indicated times were then incubated for 30 min in MTT at a final concentration of 500 µg/mL. After incubation, the medium containing MTT was removed, and dimethyl sulfoxide (100 µL) was added to solubilize the MTT formazan product. MTT formazan formation was spectrophotometrically measured at 595 nm with a Bio-Rad 680 microplate reader (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Control wells contained medium plus MTT to determine background formazan values. All assays were done in triplicate. The resultant cells of the DTT treatment were then stained with trypan blue at a final concentration of 0.2 %, after which the trypan blue-excluded viable cells were counted using a hemacytometer under a microscope.

2.11. Statistical analysis

Experiments were performed in triplicate with samples in triplicates. Results are presented as means \pm standard deviations. Statistical comparisons were performed using Student's *t* test. Statistical significance was accepted for *p*-value ≤ 0.05 .

3. Results

3.1. Identification of *P. brasiliensis* genes with differential expression during spleen infection

To identify the genes that are differentially expressed in *P. brasiliensis* during infectious processes in spleen, the RDA subtractive strategies was performed for *P. brasiliensis* yeast cells derived from the spleen of BALB/c mice after 7 and 15 days of infection and cultured for 7 days in BHI medium (tester population) and yeast cells grown in BHI medium (driver population). Different patterns of DNA amplification were observed after two rounds of subtractive hybridization and cDNA libraries were constructed.

In total, 675 clones were determined to be over expressed in yeast cells recovered from mice spleens. Of these, 302 were obtained after 7 days of infection, and 373 after 15 days of infection. The nature of adaptations made by *P. brasiliensis* during spleen infection can be inferred by classifying the ESTs into 11 groups of functionally related genes according to the Munich Information Center for Protein Sequences (MIPS), as shown in Table 1. Pie charts representing the distribution of the 61 clusters according to their biological function are shown in Fig. 1. As observed, *P. brasiliensis* differentially expressed genes after 7 days of infection were involved in several cellular processes including cellular communication (32.7% of the total ESTs), cell general metabolism (15.7% of the total ESTs), transcription (16.4% of the total ESTs) and cellular transport (10.6% of the total ESTs). Also relevant is the abundance of transcripts related to cell defense (9.2% of the total ESTs) and energy (4.3% of the total ESTs), as shown in Fig. 1A. In the cell defense category, 25% of the ESTs were related to oxidative/reductive stress and 71.4% corresponded to nutritional starvation. In the energy category, 76.9% were related to the fatty acid beta-oxidation while in the metabolism category 74.0% corresponded to lipid synthesis and 18.6% to amino acids metabolism (Fig. 1B). Regarding to yeast cells derived from mice spleen after 15 days of infection, it was observed that most of the upregulated transcripts are related to cellular communication

(24.4% of the total), cellular transport (17.5% of the total ESTs) and metabolism (15.1% of the total ESTs), followed by the ESTs in the transcription (11.6% of total ESTs), cell defense (9.9% of the total ESTs) and energy (7.1% of the total ESTs) categories (Fig. 1C). The genes related to oxidative/reductive stress represented 11.1% of the total cell defense ESTs and 72.2% corresponded to nutritional starvation. In the energy category, 54.0% were related to the fatty acid beta-oxidation while in the metabolism category 60% corresponded to lipid synthesis and 27.2% to amino acids metabolism (Fig. 1D).

3.2. An overview of metabolic adaptations of *P. brasiliensis* in experimental models of infection

The most prominent adaptations undergone by *P. brasiliensis* during spleen infection are summarized in Fig. 2. The transcriptional analysis revealed that during spleen infection the majority of *P. brasiliensis* regulated transcripts were associated to energy and metabolic functions. The transcripts related to fatty acids beta-oxidation enzymes, such as acyl-CoA dehydrogenase, carnitine/acyl carnitine carrier and the C6 transcription factor were up expressed in our infection assay. The increased regulation of transcripts encoding to proteins of lipid catabolism was observed at 7 and 15 days of infection.

In yeast cells derived from mice spleen, we also detected an increased expression of *P. brasiliensis* ESTs related to fatty acid synthesis including the fatty acid synthase subunit alpha, diacylglycerol acyltransferase and sterol-O-acyltransferase. The beta-oxidation of host fatty acids leads to the generation and accumulation of NADH, NADPH and FADH₂, which could be used in the lipid anabolism. The regulation of the fatty acid synthesis during infection on spleen could promote control of the excess reductants produced by lipid oxidation; what means to maintain the redox balance. Fig. 2 presents

the predominant metabolic aspects determined by our transcriptional analysis in *P. brasiliensis* isolated from mouse spleens.

Another *P. brasiliensis* processes putatively affected during infection was cell defense and virulence. The ESTs related to oxidative/reductive stress responsive proteins including two-component system protein, glutathione S-transferase and thioredoxin reductase were induced in yeast cells derived from spleen. In addition, we also observed a high induction in the expression of the transcripts encoding to betaine aldehyde dehydrogenase (Table 1). This protein is putatively involved in the use of choline or choline derivatives as alternative carbon and nitrogen sources in nutritional starvation conditions (Coleman *et al.*, 1997). Moreover, in *P. brasiliensis* yeast cells recovered from spleen, we also observed an induced expression of ESTs related to iron uptake, such as the high-affinity zinc/iron permease and siderophore transporter 1 (Table 1).

3.3. Gene expression in *P. brasiliensis* recovered directly recovered from a systemic infection Site

In order to validate the significance of our RDA data we next sought to analyze changes of the *in vivo* gene expression in *P. brasiliensis* recovered directly from host tissues after 15 days of infection. We determined that the increase of expression observed in subtractive libraries are in agreement with transcriptional findings, using qRT-PCR assays to measure C6 transcription factor (*Pbctf1*), sexual development transcription factor (*Pbnsdd*), fatty acid synthase subunit alpha (*Pbfas2*), diacylglycerol acyltransferase (*Pbdgat*), serine protease (*Pbsp*) and siderophore transporter (*Pbsit1*) transcripts. In general, the transcripts levels for all analyzed genes were higher during infection conditions than in culture medium, as depicted in Fig. 3. Furthermore, no expression of *P. brasiliensis* genes was observed in the spleens of non-infected mice (data not shown).

3.4. Expression of transcripts encoding to beta-oxidation enzymes and enzymatic assays for 3-ketoacyl-CoA thiolase in *P. brasiliensis* during spleen infection

Additionally, to evaluate a putative induction of the beta-oxidation in yeast cells derived from infected spleen, the transcriptional level of beta-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (*Pbhadh*), enoyl-CoA hydratase (*Pbechd*) and 3-ketoacyl-CoA thiolase (*Pbkat*) were measured by qRT-PCR. The transcript levels of these genes increased in *P. brasiliensis* derived from infected spleen (Fig. 4). We performed enzymatic assays for 3-ketoacyl-CoA thiolase (*PbKAT*) using protein extract from yeast cells derived from infected spleen. As showed in Fig. 5, a significant increase in the activity of *PbKAT* was also observed. These data associated with RDA analysis suggest a putative upregulation of the lipid beta-oxidation in *P. brasiliensis* derived from infected mice.

3.5. Thioredoxin reductase enzymatic activity and triacylglycerol levels during infection

Enzymatic assay for thioredoxin reductase (*PbTRXR*) was performed using protein extracts of *P. brasiliensis* obtained from yeast cells derived from mice spleen in order further validate our RDA findings. As shown in Fig. 5, we observed a statistically significant increase in the specific activity of *PbTRXR* in yeast cells derived from infected spleen, confirming the RDA data.

Since the transcripts encoding to diacylglycerol acyltransferase, sterol-o-acyltransferase and phospholipase D related to triacylglycerol synthesis were upregulated in our RDA analysis, assays to quantification of the triacylglycerol levels in yeast cells derived from infected spleen were performed. We observed a significant increase in the accumulation of triacylglycerol in *P. brasiliensis* cells recovered from infected mice in

comparison to control (Table 2). All data again are in agreement with transcriptional analysis evidencing an induction of the lipid anabolism during infection.

3.6. *P. brasiliensis* response to reductive stress conditions

Having suggested that *in vivo* carbon substrate utilization (most likely lipids) during infection, may result in increase of reductive equivalents (e.g. NADH, NADPH, GSH, etc.), we sought to examine the putative role of fatty acids anabolism and of the oxidoreductases activity in maintaining the *P. brasiliensis* intracellular redox environment. In order to correlate the induction of triacylglycerol synthesis and the increase in the thioredoxin reductase activity (*Pb*TRXR) with a reductive status during infection, we utilized the strong reducing agent DTT as a tool to promote *in vitro* reductive stress conditions. Initially the cellular reduction changes during treatment with the agent were verified by MTT reduction assays. As observed in Fig. 6A, the absorbance value for MTT reduction was strongly increased in cells treated with 2.5 mM of DTT at 6 hs treatment. The accumulation of triacylglycerol and the enzymatic activity of the thioredoxin reductase were analyzed in yeast cells treated with DTT (Table 2 and Fig. 6B). Comprehensive analysis showed that the DTT treatment increased the *Pb*TRXR activity and induced the triacylglycerol accumulation, as showed in Fig. 6B and Table 2. The increase observed in the triacylglycerol levels and of the thioredoxin activity in yeast cells under *in vitro* reductive stress conditions and also in yeast cells derived from infected spleen suggest that the lipid anabolism and oxidoreductases activity could protect *P. brasiliensis* against the reductive stress putatively induced during infection.

4. Discussion

In this study, we attempted to identify genes differentially regulated expressed in yeast cells derived from the spleen of infected animals. We found that *P. brasiliensis* regulated the expression of 61 genes in yeast cells derived from spleens of infected mice. The identified genes were grouped together based on their functionality categories. The categories that showed the most number of occurrences included fatty acid beta-oxidation, fatty acid synthesis and oxidative/reductive stress.

Since in host tissues, nutrients such as glucose and amino acids are not easily available, pathogenic fungi must display sufficient metabolic flexibility which enable them to survive and adapt to the host environment (Fleck *et al.*, 2011). It is known that fatty acids are potential *in vivo* carbon sources to pathogenic fungi and the disruption of the genes involved in the oxidation of fatty acids such as palmitate causes a marked attenuation of the virulence (Ramírez & Lorenz, 2007). In *P. brasiliensis* yeast cells derived from mouse spleen it was observed expression of genes encoding proteins involved in the beta-oxidation, such as carnitine/acyl carnitine carrier, acyl-CoA dehydrogenase, 3-ketoacyl-CoA thiolase, enoyl-CoA hydratase, beta-hidroxyacyl-CoA dehydrogenase and the C6 transcription factor. The evidence of lipid oxidation induction during spleen infection is further emphasized by an increase in the transcript expression and enzymatic activity of the *P. brasiliensis* 3-ketoacyl-CoA thiolase, which is a beta-oxidation enzyme regulated by metabolites that signal energy sufficiency. The rate of transfer of fatty acyl-CoA into mitochondria is an important point of regulation of the fatty acid beta-oxidation because once fatty acyl-CoA groups have entered the mitochondria they are committed to oxidation to acetyl-CoA (Numa, 1984). Thus, the increase on expression of the transcript encoding to carnitine/acyl carnitine carrier in our analysis could correlate with the putative induction of the beta-oxidation observed in *P.*

brasiliensis yeast cells derived from the infected spleen. These data taken together suggest a nutritional starvation condition during spleen infection. In this sense, the host fatty acids could be used as carbon and energy source by beta-oxidation. This speculation is proven stronger because of the induction of *Pbctf1*. This transcription factor is required for growth on lipids as carbon source and for expression of genes necessary of beta-oxidation (Ramírez & Lorenz, 2009). The increased expression of beta-oxidation proteins during infection has also been reported in other pathogenic bacteria and fungi (Strijbis & Distel, 2010; Farhana *et al.*, 2010; Shin *et al.*, 2011).

In addition to ESTs related to beta-oxidation enzymes, an increase in the expression of *P. brasiliensis* transcripts encoding to enzymes of fatty acid and triacylglycerol synthesis were also observed in yeast cells derived of infected mice. The upregulation of the transcripts encoding to fatty acid synthase, sterol-O-acyltransferase, diacylglycerol acyltransferase and the significant increase of the levels of triacylglycerol observed in *P. brasiliensis* derived from the infected spleen correlate with the positive regulation of these pathways in the infection. As discussed, lipids could be an *in vivo* carbon source available to *P. brasiliensis* during spleen colonization. In this sense, the induction of beta-oxidation of fatty acids leads to increase levels of reductive compounds, such as NADH, NADPH and FADH₂. We could speculate that during infection, *P. brasiliensis* induce the fatty acids anabolism pathway to promote the oxidation of NAD(P)H, FADH₂ and maintain the redox balance. The increase in the triacylglycerol levels in the *in vitro* reductive stress assay by DTT treatment support the speculation above. The correlation between beta-oxidation and lipid biosynthesis was also reported in infection assays by *Mycobacterium tuberculosis*. The authors of the studies observed an increase in the production of the reductive metabolics during spleen infection and suggested that the

fatty acid anabolism pathway is an efficient reductant removal mechanism (Singh *et al.*, 2009; Farhana *et al.*, 2010; Shin *et al.*, 2011).

Additionally, transcripts encoding to proteins involved in the signaling and maintenance of the potential redox were also induced in yeast cells derived from the infected spleen. In our RDA analysis, the gene product encoding to a protein with PAS domain showed the highest number of occurrences. PAS domains are important signaling modules that monitor changes redox potential, oxygen and overall energy level of a cell. The signal-transducing proteins with PAS domain can sense redox changes in the electron transport system or overall cellular redox status (Taylor & Zhulin *et al.*, 1999). The upregulation of PAS domain protein suggest that *P. brasiliensis* supposedly utilize this signaling system to respond to stress conditions during the development of the disease in the host.

The increase of expression in the transcripts encoding to oxidoreductases enzymes, such as glutathione S-transferase and thioredoxin reductase were also observed in this study. These enzymes are part of thiol redox system wich utilizes NADPH as source of reducing equivalents protecting cellular macromolecules from damage due to oxidative and reductive stress (Thön *et al.*, 2007). It is important to note that the increase of the enzymatic activity to thioredoxin reductase observed in yeast cells derived from the infected spleen was also detected in the *in vitro* reductive stress assays. These data suggest that this oxidoreductase could protect *P. brasiliensis* against reductants, such as NADH, NADPH, produced by metabolic processes induced during infection. Another oxidant defense mechanisms putatively employed by *P. brasiliensis* during spleen infection involves the utilization of aldehyde by betaine aldehyde dehydrogenase. Aldehyde is the major end-product of lipid oxidation, a pathway potentially increased in our analysis. The oxidation of aldehyde by betaine aldehyde dehydrogenase produces

NADH and consequently could promote the maintenance of redox status. This adaptive strategy is inherent in many infectious processes including spleen infection by *M. tuberculosis* (Shin *et al.*, 2011). The findings suggest that the *P. brasiliensis* cellular redox machinery requires a precise regulation to protect against oxidative and reductive stress, and that oxidoreductases could maintain the redox homeostasis in response to both oxidative and reductive stress.

Because iron is not abundantly available in host tissues, pathogenic microorganisms have developed mechanisms which enable them to survive in low iron environments (Kosman, 2003). In *P. brasiliensis*, these mechanisms include iron uptake from host sources, and metabolic switching to iron independent pathways (Parente *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2011). Pathogens can import iron through a high-and low-affinity system mediated reductive and the siderophore-mediated non-reductive pathways. In *P. brasiliensis* yeast cells derived from infected spleen, the transcripts to Atf1, siderophore transporter 1 and high-affinity zinc/iron permease were upregulated. These data suggest that the activation of iron uptake systems may be an indispensable survival mechanism the fungus requires when in a nutrient deficient environment.

Generating precursor metabolites and energy, transporting chemicals and responding to environmental stresses are all common responses to host-like conditions. However, certain metabolic processes are presumably more evident in certain fungal treatments, suggesting that the fungal response is more prominent in a defined condition (Fleck *et al.*, 2011). By analyzing the most redundant ESTs obtained from cDNAs of *P. brasiliensis* yeast cells derived from spleen (present work) and liver of infected mice (Bailão *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2007), it is possible to obtain insight into the different features of fungal metabolism during the infective process in tissues. Table 3 summarizes

the most relevant identified processes, as determined by transcriptional analysis, in the two host-like conditions.

Fatty acid beta-oxidation could be inferred as important adaptation to energy acquiring in yeast cells derived from infected spleen. By contrast, in yeast cells derived from infected liver, it was observed induced genes associated with assimilation of carbon via glycolysis and alcohol fermentation (Table 3). The over expression of ESTs encoding to carbohydrate metabolism enzymes and over production of ethanol suggest that this metabolic pathway could be particularly relevant during liver infection because of the putative abundant glucose in this host milieu, as described by Costa *et al.* (2007). Also, beta-oxidation and lipid biosynthesis seems to be common to the two host niches.

6. Acknowledgments

This work at Universidade Federal de Goiás was supported by grants from CNPq and FAPEG.

7. Figures

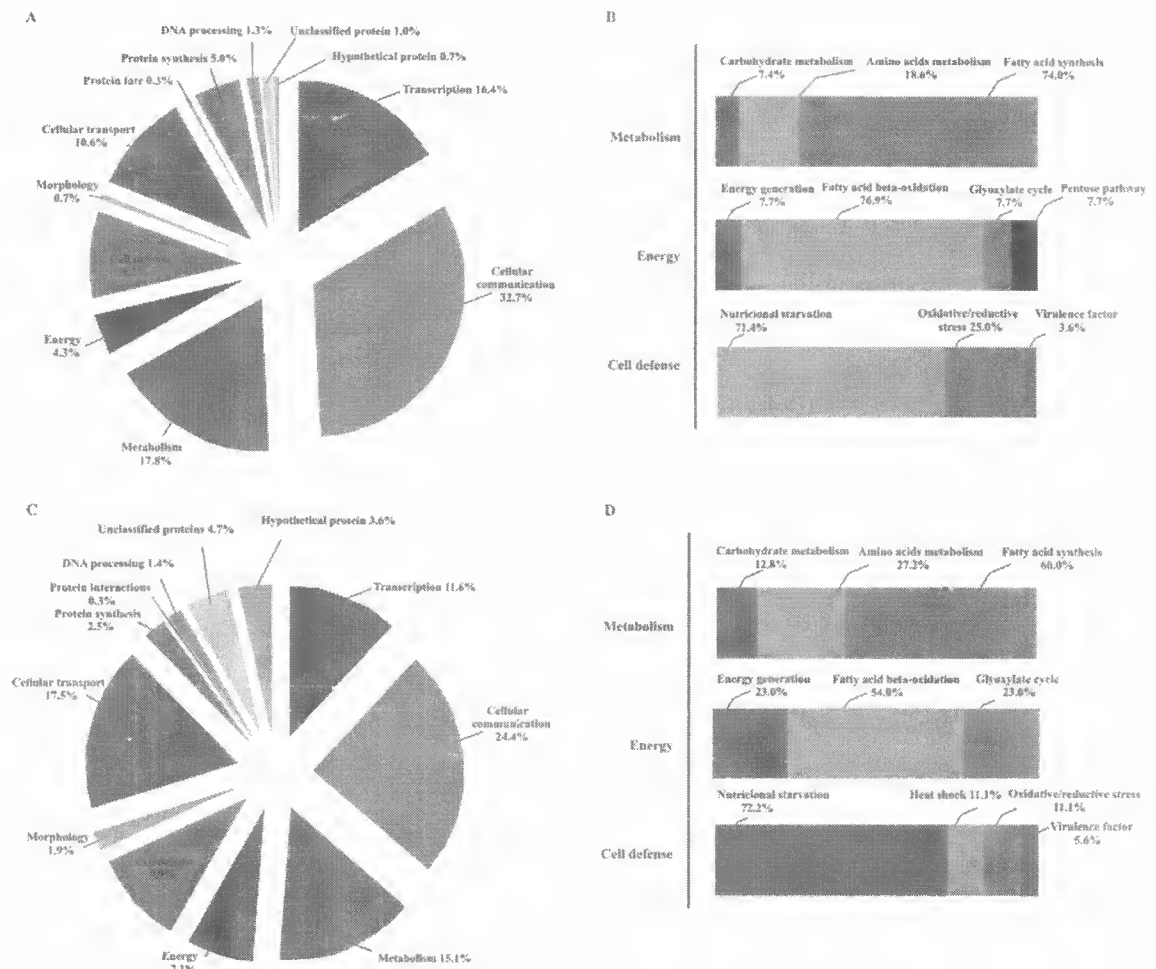


Figure 1 – Functional classification of ESTs from *P. brasiliensis* derived from RDA experiments. (A and B) cDNAs synthesized from the RNAs of yeast cells recovered from spleen mice after 7 days of infection. A – Functional categories of all differentially expressed genes. B – Functional subcategories with the highest number of differentially expressed genes. (C and D) cDNAs obtained from RNA of *P. brasiliensis* yeast cells after 15 days of infection. C - Functional categories of all differentially expressed genes. D - Functional subcategories with the highest number of differentially expressed genes. The percentage of each functional category is shown (refer to Table 1). The classification was performed according to the functional categories of the MIPS (<http://mips.gsf.de/>) functional annotation scheme. Each functional class is represented as a segment and expressed as a percentage of the total number of ESTs in each library.

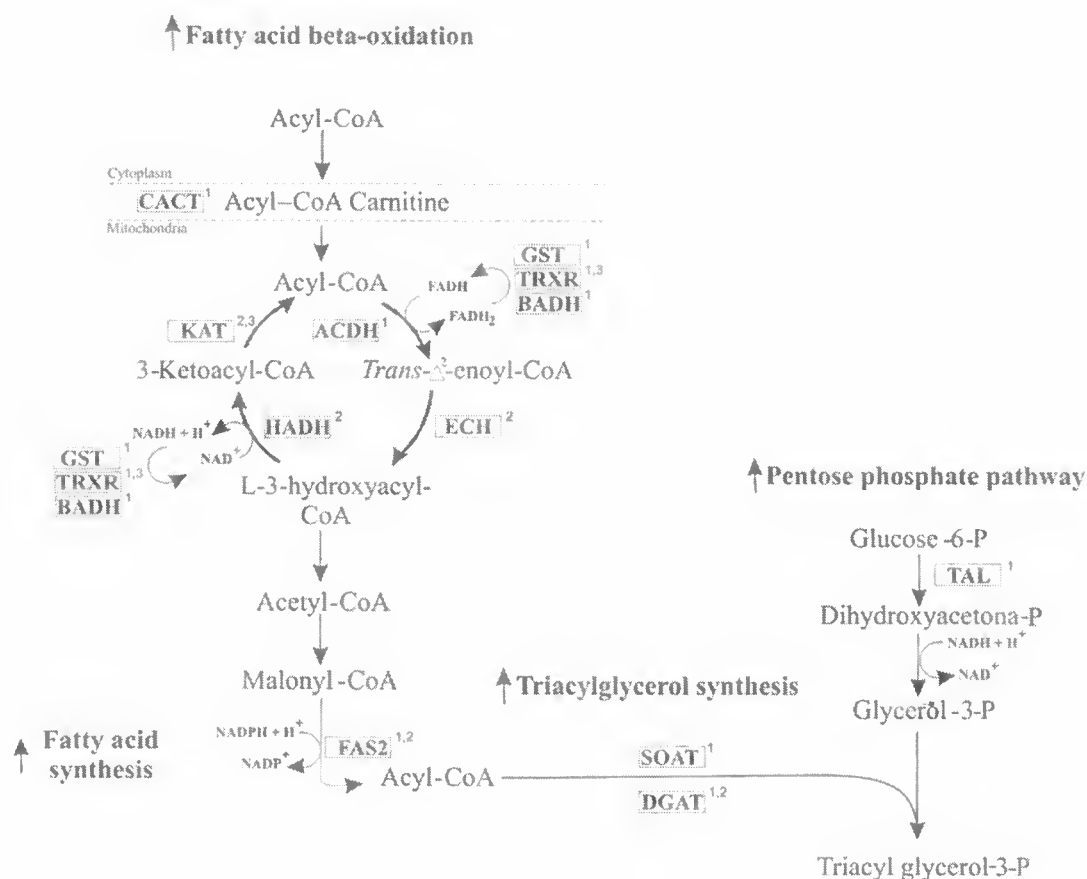


Figure 2 - Model of the adaptive changes of *P. brasiliensis* during spleen infection in experimental models. Schematic representation of the metabolic processes putatively upregulated in *P. brasiliensis* during infection. The upregulated proteins are listed as follows: ACDH - Acyl-CoA dehydrogenase; BADH - Betaine aldehyde dehydrogenase; CACT - Carnitine/acyl carnitine translocase; DGAT - Diacylglycerol acyltransferase; ECH - enoyl-CoA hydratase; FAS2 - Fatty acid synthase subunit alpha; GST - Glutathione S-transferase; HADH - beta-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase; KAT - 3-ketoacyl-CoA thiolase; SOAT - Sterol-O-acyltransferase; TAL - transaldolase; TRXR - Thioredoxin reductase. Arrows indicate upregulation of metabolic pathways. ¹upregulated in RDA analysis, ²upregulated in RT-PCR analysis and ³increased enzymatic activity.

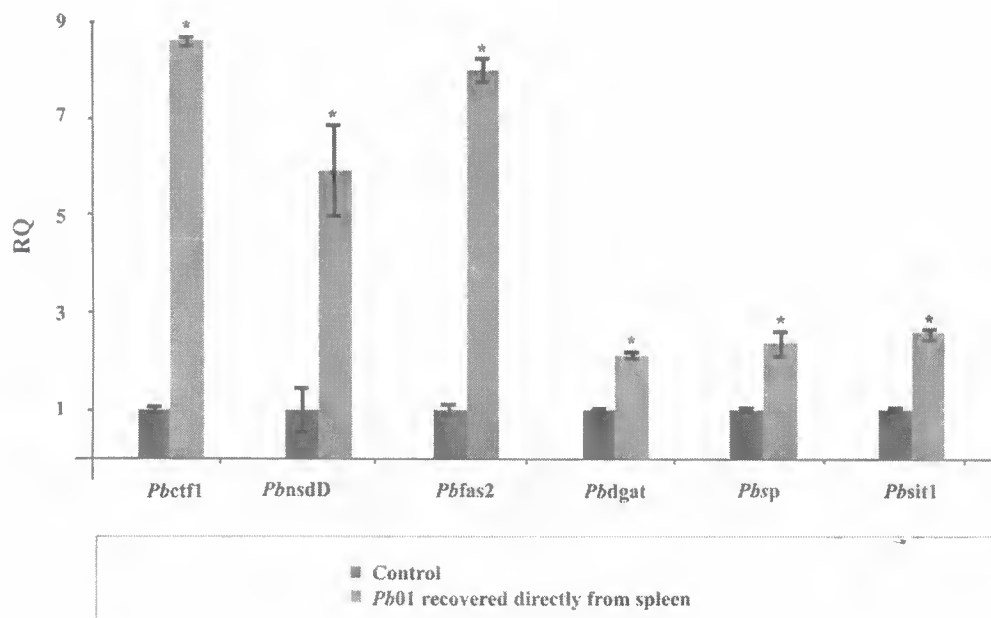


Figure 3 – *In vivo* gene expression profile of *P. brasiliensis* recovered directly from a systemic infection site. The relative levels of gene expression of *P. brasiliensis* yeast cells recovered directly of mice spleen were examined in comparison with the fungus cultivated in BHI medium. The transcripts evaluated were as follow: C6 transcription factor (*Pbctf1*), sexual development transcription factor_(*PbnsdD*), fatty acid synthase subunit alpha (*Pbfas2*), diacylglycerol acyltransferase (*Pbdgat*), serine protease (*Pbsp*) and siderophore transporter 1 (*Pbsit1*). The expression values were standardized using the expression values for the constitutive gene encoding the protein α -tubulin. The relative quantification (RQ) of the experiment was performed in triplicate. The error bars indicate the standard deviations from three independent experiments performed in triplicate. *, significantly different from the control, at a $p \leq 0.05$.

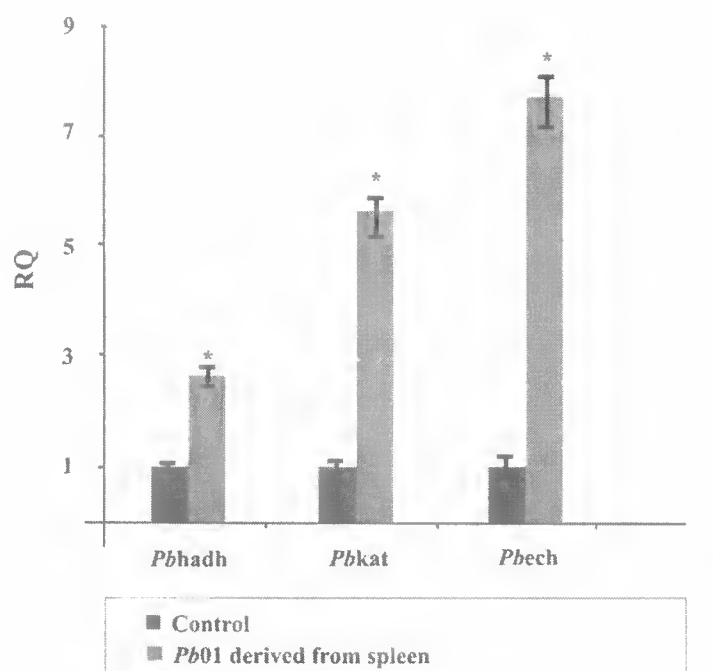


Figure 4 – Quantification of the *P. brasiliensis* transcripts encoding to beta-oxidation enzymes by RT-PCR. The expression levels of transcripts encoding to acyl-CoA dehydrogenase (*Pbacdh*), enoyl-CoA hydratase (*Pbech*) and 3-ketoacyl-CoA thiolase (*Pbkat*) were evaluated by RT-PCR. Error bars indicate the standard deviations from three independent experiments performed in triplicate. *, significantly different from the control, at a $p \leq 0.05$.

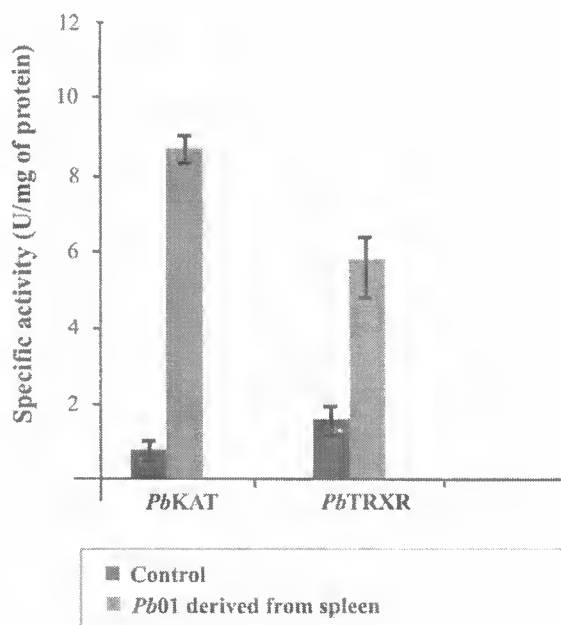


Figure 5 – Enzymatic activity of *PbKAT* and *PbTRXR* in yeast cells derived from infected spleen. The enzymatic activities to 3-ketoacyl-CoA thiolase (*PbKAT*) and thioredoxin reductase (*PbTRXR*) were examined with protein extracts of *P. brasiliensis* derived from infected spleen and cultivated in BHI medium in comparison with the obtained extracts of the fungus only cultivated in BHI medium (control). Units of enzyme activities (U) are expressed as μmol of substrate utilized per min. Each measurement was conducted in triplicate.

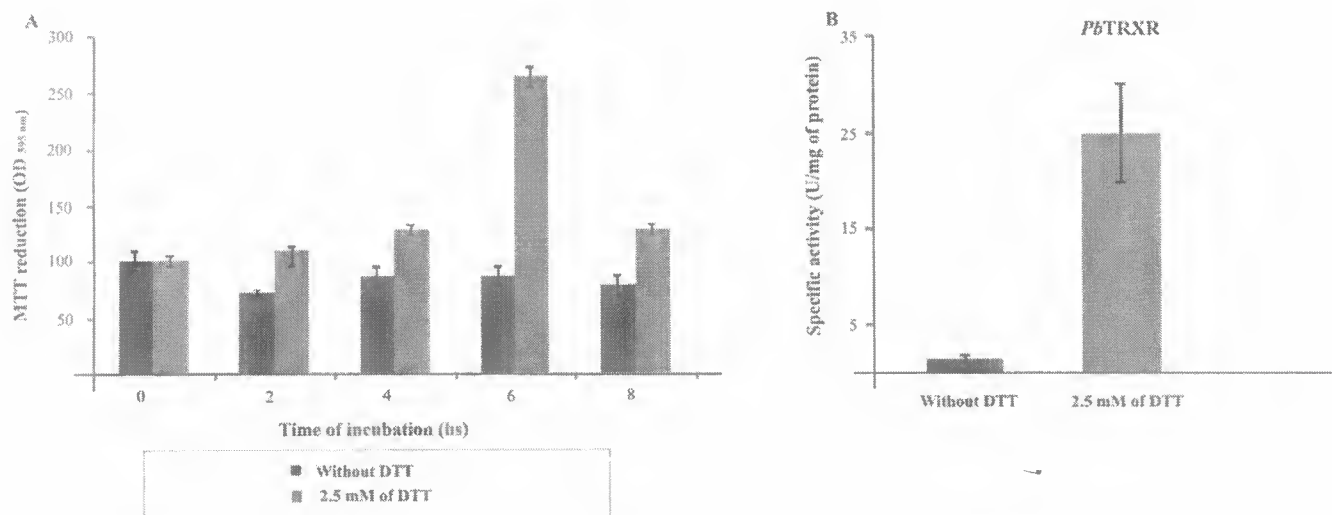


Figure 6 – Effect of the *in vitro* reductive stress in *P. brasiliensis*. (A) Evaluation of a reductive state by measuring the reduction of MTT and formation of the formazan after 2, 4, 6 and 8 hs of treatment with the reductive agent DTT. (B) Enzymatic activity of *PbTRXR* after 6 hs of treatment with 2.5 mM DTT. Units of enzyme activities (U) are expressed as μmol of substrate utilized per min. Each measurement was conducted in triplicate.

Table 1 - Annotated ESTs with high abundance obtained from RNAs of yeast cells during 7 and 15 days of infection versus control yeast cells

Functional category	Gene product	Best hit/ <i>P. brasiliensis</i> 01 genome locus	e-value	Number of occurrences		
				7 days	15 days	
Transcription	C6 transcription factor (ctf1)	PAAG_01359.1	4e-65	14	4	
	Histone deacetylase (rpd3)	PAAG_06742.1	2e-48	5	12	
	Sexual development transcription factor (nsdd)	PAAG_05818.1	8e-52	29	23	
	Transcription factor IIA	PAAG_05439.1	4e-22	1	2	
	Transcription factor stea	PAAG_00406.1	4e-28	1	2	
Cellular communication/Signal Transduction/	Guanine nucleotide-binding protein alpha-1 subunit	PAAG_08675.1	2e-30	-	5	
	Protein with PAS domain	PAAG_06301.1	4e-92	94	83	
	Protein phosphatase regulatory subunit gac1	PAAG_00128.1	1e-52	2	-	
	Serine/threonine protein kinase	PAAG_08991.1	6e-24	3	1	
Metabolism	Aminoacids metabolism	Adenylyl-sulfate kinase	PAAG_03043.1	4e-57	-	1
		Arginine N-methyltransferase	PAAG_01039.1	5e-78	1	1
		D-amino acid oxidase	PAAG_02361.1	2e-44	1	-
		Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	PAAG_05253.1	7e-62	-	1
		Glutamine synthetase	PAAG_07003.1	2e-60	-	1
		S-adenosylmethionine synthetase	PAAG_02901.1	5e-61	8	11
	Carbohydrate metabolism	Trehalose-phosphatase	PAAG_06703.1	2e-67	4	7
	Fatty acid synthesis	Diacylglycerol acyltransferase	PAAG_07904.1	3e-92	21	20
		Sterol-O-acyltransferase	PAAG_07527.1	2e-54	3	3
		Fatty acid elongation	PAAG_08553.1	6e-33	1	3

Energy		Phospholipase D	PAAG_02042.1	5e-69	15	7
	Energy generation	ATP synthase subunit beta	PAAG_08037.1	9e-73	1	6
	Fatty acid beta-oxidation	Acyl-CoA dehydrogenase	PAAG_05211.1	7e-54	10	12
		Carnitine/acyl carnitine carrier	PAAG_03452.1	8e-31	-	2
	Glyoxylate cycle	Isocitrate lyase	PAAG_06951.1	4e-71	1	6
Pentose phosphate pathway	Transaldolase	PAAG_04444.1	4e-52	1	-	
Cell defense and virulence						
Nutritional starvation	Stress responsive factor Atf1	PAAG_01945.1	6e-42	4	3	
	Betaine aldehyde dehydrogenase	PAAG_05398.1	2e-69	16	13	
	Serine protease	PAAG_07237.1	2e-45	-	1	
	Stress-responsive nuclear envelope protein 1 (ish1)	PAAG_01860.1	9e-107	-	9	
Heat shock response	HSP-60	PAAG_08059.1	4e-52	-	4	
Oxidative/reductive stress	Glutathione S-transferase	PAAG_02030.1	1e-25	2	1	
	Thioredoxin reductase	PAAG_07020.1	7e-92	5	3	
Virulence factor	Pathogenesis associated proteins (cap20)	PAAG_06538.1	3e-49	-	2	
	Zinc metalloprotease	PAAG_00743.1	3e-76	1	-	
Morphology	Actin cytoskeleton protein (vip1)	PAAG_01347.1	5e-46	-	3	
	Chitin synthase regulator II	PAAG_04860.1	7e-32	-	1	
	Gelsolin	PAAG_05475.1	2e-64	2	-	
	Pleckstrin homology protein	PAAG_03092.1	3e-47	-	3	
Cellular transport/transport	ABC transporter member 5	PAAG_07938.1	6e-70	-	1	

Table 2 - Level of triglycerides (mean \pm SD) obtained in different treatments

Conditions	Triglycerides level (mg/g)
<i>P. brasiliensis</i> cultivated in BHI	2.67 \pm 0.21
<i>P. brasiliensis</i> derived from infected spleen and cultivated in BHI medium	9.90 \pm 0.10
<i>P. brasiliensis</i> treated with 2.5 mM of DTT	23.01 \pm 5.57

Table 3 - Niche-specific responses of *P. brasiliensis* to the host

Metabolic processes	Spleen	Liver ^{1,2}
Alcohol fermentation	-	+
Fatty acid beta-oxidation	+	+
Glycolysis	-	+
Gluconeogenesis	-	+
Glyoxylate cycle	+	+
Lipid biosynthesis	+	+
Iron uptake	+	+
Melanin synthesis	-	+

⁺ Upregulate pathway.

⁻ Non upregulated pathway.

^{1,2} Descriptions are summarized from the detailed data presented in Bailão *et al.* (2006) and Costa *et al.* (2007).

Supplementary Table 1 - Oligonucleotide primers used in RDA analysis, DNA sequencing and qRT-PCR analysis

Oligonucleotides	Sequence	Purpose
cDNA	5' AGCAGTGGTATCAACGACAGAGTACGCGGG 3'	cDNA first strand synthesis
CDS	5' AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT(30)NIN 3'	cDNA first strand synthesis
PCRII	5' AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT 3'	cDNA first strand synthesis
JBam12	5' GATCCGTTTCATG 3'	Adapter1 (RDA)
JBam24	5' ACCGACGTCGACTATCCATGAACG 3'	Adapter1 (RDA)
NBam12	5' GATCCTCCCTCG 3'	Adapter 2 (RDA)
NBam24	5' AGGCAACTGTGCTATCCGAGGGAG 3'	Adapter 2 (RDA)
RBam12	5' GATCCTCGGTGA 3'	Adapter 3 (RDA)
RBam24	5' AGCACTCTCCAGCCTCTCACCGAG 3'	Adapter 3 (RDA)
T7	5' GTAATACGACTCACTATAGGGC 3'	DNA sequencing
Tubulin Sense	5'-ACAGTGCTTGGGAACTATAACC-3'	qRT-PCR
Tubulin Antisense	5'-GGGACATATTTGCCACTGCC-3'	qRT-PCR
<i>Pbctf1</i> Sense	5'-CAAACCACTCGTCAACACAATC-3'	qRT-PCR
<i>Pbctf1</i> Antisense	5'-GATTGCCTTGAGTCTGATAGAG-3'	qRT-PCR
<i>PbnsdD</i> Sense	5'-CGTCTTCCGCAGGTCCAATG-3'	qRT-PCR
<i>PbnsdD</i> Antisense	5'-GAGTGCTTTGCACATCCTCCA-3'	qRT-PCR
<i>Pbfas2</i> Sense	5'-ACGCCCTTGAGAATGCCGG-3'	qRT-PCR
<i>Pbfas2</i> Antisense	5'-GCCAGTCGATTTGTGCTTCAT-3'	qRT-PCR
<i>Pbdgat</i> Sense	5'- TATTAGATATAACCAAGTGGCCG- 3'	qRT-PCR
<i>Pbdgat</i> Antisense	5'- TACCCTGGGTTTGTATTCAATG- 3'	qRT-PCR
<i>Pbsp</i> Sense	5'-GGCCTCTCCAACACGTTGCTG-3'	qRT-PCR
<i>Pbsp</i> Antisense	5'-GTTCCAGATAAGAACGTTAGC-3'	qRT-PCR
<i>Pbsit1</i> Sense	5'-GGCAATCATTTTCCCTGTGTG-3'	qRT-PCR
<i>Pbsit1</i> Antisense	5'-CGCGAAGACTGCAATCAAAAG-3'	qRT-PCR
<i>Pbkat</i> Sense	5'-CAGATTACAGATGGAGCCGC-3'	qRT-PCR
<i>Pbkat</i> Antisense	5'-GGTTGTACATCGAGAGCAGC-3'	qRT-PCR
<i>Pbech</i> Sense	5'-TACCCCTGTCATCGCTGCC-3'	qRT-PCR
<i>Pbech</i> Antisense	5'-TCTTCCCAATTGCTCTCGTGA-3'	qRT-PCR
<i>Pbacdh</i> Sense	5'-GCGCAGGACAGATGGGACT-3'	qRT-PCR
<i>Pbacdh</i> Antisense	5'-CTCTTTGGCGATGTCCTTTTC-3'	qRT-PCR

8. References

Arnér, E. S., Zhong, L., Holmgren, A., 1999. Preparation and assay of mammalian thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods Enzymol* 300: 226-239.

Bailão, A. M., Schrank, A., Borges, C. L., Dutra, V., Molinari-Madlum, E. E. W. I., Felipe, M. S. S., Mendes-Giannini, M. J. S., Martins, W. S., Pereira, M., 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.

Bailão, A. M., Shrank, A., Borges, C. L., Parente, J. A., Dutra, V., Felipe, M. S., Fiuza, R. B., Pereira, M., 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.

Barbosa, M. S., Bão, S. N., Andreotti, P. F., de Faria, F. P., Felipe, M. S., dos Santos Feitosa, L., Mendes-Giannini, M. J., Soares, C. M. A., 2006. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. *Infect Immun* 74: 382-389.

Bookout, A. L., Cummins, C. L., Mangelsdorf, D. J., Pesola, J. M., Kramer, M. F., 2006. High-throughput real-time quantitative reverse transcription PCR. *Curr Protoc Mol Biol* 15: 15-18.

Castells-Roca, L., Mühlenhoff, U., Lill, R., Herrero, E., Bellí, G., 2011. The oxidative stress response in yeast cells involves changes in the stability of Aft1 regulon mRNAs. *Mol Microbiol* 81: 232-248.

Coleman, M., Henricot, B., Arnau, J., Oliver, R. P., 1997. Starvation-induced genes of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum* are also induced during growth in planta. *Mol Plant Microbe Interact* 10:1106-1109.

Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, J. M., Terol, J., Talón, M., Robles, M., 2005. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21: 3674-3676.

Costa, M., Borges, C. L., Bailão, 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., 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.

Ewing, B., Green, P., 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res* 8: 186-194.

Farhana, A., Guidry, L., Srivastava, A., Singh, A., Hondalus, M. K., Steyn, A. J., 2010. Reductive stress in microbes: implications for understanding *Mycobacterium tuberculosis* disease and persistence. *Adv Microb Physiol* 57: 43-117.

Fleck, C. B., Schöbel, F., Brock, M., 2011. Nutrient acquisition by pathogenic fungi: Nutrient availability, pathway regulation, and differences in substrate utilization. *Int J Med Microbiol* 301: 400-407.

Franco, M., 1987. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol* 25: 5–18.

Götz, S., García-Gómez, J. M., Terol, J., Williams, T. D., Nagaraj, S. H., Nueda, M. J., Robles, M., Talón, M., Dopazo, J., Conesa, A., 2008. High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Res* 36: 3420-3435.

Hara, A., Radin, N. S., 1978. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Anal Biochem* 90: 420-426.

Huang, X., Madan, A., 1999. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res* 9: 868-877.

Kim, H., Yoon, S. C., Lee, T. Y., Jeong, D., 2009. Discriminative cytotoxicity assessment based on various cellular damages. *Toxicol Lett* 184:13-7.

Kosman, D. J., 2003. Molecular mechanisms of iron uptake in fungi. *Mol Microbiol* 47: 1185-1197.

Miyazawa, S., Osumi, T., Hashimoto, T., 1980. The presence of a new 3-oxoacyl-CoA thiolase in rat liver peroxisomes. *Eur j Biochem* 103: 589-596.

Neri, B. P., Frings, C. S., 1973. Improved method for determination of triglycerides in serum. *Clin Chem* 19: 1201-1202. Nogueira, S. V., Fonseca, F. L., Rodrigues, M.L., Mundodi, V., Abi-Chacra, E. A., Winters, m. S., Alderete, J. F., Soares, C. M.

Nogueira, S. V., Fonseca, F. L., Rodrigues, M.L., Mundodi, V., Abi-Chacra, E. A., Winters, m. S., Alderete, J. F., Soares, C. M. A., 2010. *Paracoccidioides brasiliensis* enolase is a surface protein that binds plasminogen and mediates interaction of yeast forms with host cells. *Infect immun* 78: 4040-4050.

Numa, S., 1984. Fatty acid metabolism and its regulation, new comprehensive biochemistry, vol 7 (Neuberger, A. & Van Deenen, L. L. M., series eds), Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.

Parente, J. A., Salem-Izacc, S. M., Santana, J. M., Pereira, M., Borges, C. L., Bailão, A. M., Soares, C. M. A., 2010. A secreted serine protease of *Paracoccidioides brasiliensis* and its interactions with fungal proteins. *BMC Microbiol* 10: 292-299.

Parente, A. F., Bailão, A. M., Borges, C. L., Parente, J. A., Magalhães, A. D., Ricart, C. A., Soares, C. M. A., 2011. Proteomic analysis reveals that iron availability alters the metabolic status of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *PLoS One* 6: e22810.

Pereira, M., Bailão, A. M., Parente, J. A., Borges, C. L., Salem-Izacc, S. M., Soares, C. M. A., 2009. Preferential transcription of *Paracoccidioides brasiliensis* genes: host niche and time-dependent expression. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 486-491.

Ramírez, M. A., Lorenz, M. C., 2007. Mutations in alternative carbon utilization pathways in *Candida albicans* attenuate virulence and confer pleiotropic phenotypes. *Eukaryot Cell* 6:280-290.

Ramírez, M. A., Lorenz, M. C., 2009. The transcription factor homolog CTF1 regulates β -oxidation in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 2009 8: 1604-1614.

Restrepo, A., McEwen, J. G., Castañeda E., 2001. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med Mycol* 39: 233–241.

San-Blas, G., Nino-Vega, G., Iturriaga, T., 2002. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med Mycol* 40:225–242.

Seidl, V., Song, L., Lindquist, E., Gruber, S., Koptchinskiy, A., Zeilinger, S., Schmoll, M., Martínez, P., Sun, J., Grigoriev, I., Herrera-Estrella, A., Baker, S. E., Kubicek, C. P., 2009. Transcriptomic response of the mycoparasitic fungus *Trichoderma atroviride* to the presence of a fungal prey. *BMC Genomics* 10: 567-574.

Shin, J. H., Yang, J. Y., Jeon, B. Y., Yoon, Y. J., Cho, S. N., Kang, Y. H., Ryu, H., Hwang, G. S., 2001. (1)HNMR-based metabolomic profiling in mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Proteome Res* 6: 2238-2247.

Silva, M. G., Schrank, A., Bailão, E. F., Bailão, A. M., Borges, C. L., Staats, C. C., Parente, J. A., Pereira, M., Salem-Izacc, S. M., Mendes-Giannini, M. J., Oliveira, R.M., Silva, L. K., Nosanchuk, J. D., Vainstein, M. H., Soares, C. M. A., 2011. The homeostasis of iron, copper, and zinc in *Paracoccidioides brasiliensis*, *Cryptococcus neoformans* var. *Grubii*, and *Cryptococcus gattii*: a comparative analysis. *Front Microbiol* 2: 49-58.

Singh, A., Crossman, D. K., Mai, D., Guidry, L., Voskuil, M. I., Renfrow, M. B., Steyn, A. J., 2009. *Mycobacterium tuberculosis* WhiB3 maintains redox homeostasis by regulating virulence lipid anabolism to modulate macrophage response. *PLoS Pathog* 5: 545-553.

Strijbis, K., Van Roermund, C. W., Visser, W. F., Mol, E. C., Van den Burg, J., MacCallum, D. M., Odds, F. C., Paramonova, E., Krom, B. P., Distel, B., 2008. Carnitine-dependent transport of acetyl coenzyme A in *Candida albicans* is essential for growth on nonfermentable carbon sources and contributes to biofilm formation. *Eukaryot Cell* 7: 610-618.

Strijbis, K., Distel, B., 2010. Intracellular acetyl unit transport in fungal carbon metabolism. *Eukaryot Cell* 9: 1809-1815.

Tavares, A. H., Silva, S. S., Dantas, A., Campos, E. G., Andrade, R. V., Maranhão, A. Q., Brigido, M. M., Passos-Silva, D. G., Fachin, A. L., Teixeira, S. M., Passos, G. A., Soares, C. M. A., Bocca, A. L., Carvalho, M. J., Silva-Pereira, I., Felipe, M. S., 2007. Early transcriptional response of *Paracoccidioides brasiliensis* upon internalization by murine macrophages. *Microbes Infect* 9: 583-590.

Taylor, B. L. & Zhulin, I. B., 1999. PAS domains: Internal Sensors of Oxygen, Redox Potential, and Light. *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 479-506.

Thön, M., Al-Abdallah, Q., Hortschansky, P., 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.

DISCUSSÃO

PERSPECTIVAS

5- DISCUSSÃO

Microorganismos patogênicos desenvolvem uma série de estratégias específicas para sobrevivência, quando deparados com o ambiente hostil do hospedeiro. As respostas adaptativas de *P. brasiliensis* durante interação com hospedeiro estão começando a ser elucidadas. Assim, buscou-se isolar genes diferencialmente expressos em células de levedura derivadas do baço de camundongos infectados. Foram identificados 61 genes diferencialmente expressos classificados de acordo com suas categorias funcionais. As categorias com maior número de ocorrência estavam relacionadas com a beta-oxidação de ácidos-graxos, síntese de lipídeos e estresse oxidativo e redutivo.

Uma vez que nutrientes como glicose e aminoácidos não são facilmente disponíveis, patógenos devem apresentar uma flexibilidade metabólica suficiente para adaptar-se e sobreviver ao ambiente do hospedeiro. Neste sentido, durante a infecção, genes relacionados à biossíntese/ aquisição de aminoácidos e utilização de fontes alternativas de carbono e nitrogênio são induzidos em organismos patogênicos (Fleck *et al.*, 2011). Diversos estudos têm descrito o que ácidos-graxos são potenciais fontes de carbono para fungos patogênicos durante infecção e a deleção de genes envolvidos na beta-oxidação causa uma acentuada atenuação da virulência (Ramírez & Lorenz, 2007). Em células leveduriformes de *P. brasiliensis* derivadas do baço infectado, pode-se observar um aumento na expressão de genes codificantes para proteínas envolvidas na beta-oxidação de lipídeos, tais como o transportador carnitina/acilcarnitina, o fator transcricional C6 e para as enzimas acil-CoA desidrogenase, enoil-CoA hidratase, beta-hidroxiacil-CoA desidrogenase e 3-cetoacil-CoA tiolase. O aumento na expressão de transcritos para a beta-hidroxiacil-CoA desidrogenase e 3-cetoacil-CoA tiolase reforça a sugestão de que a beta-oxidação de lipídeos esteja induzida em *P. brasiliensis* derivado

do baço infectado, uma vez que estas enzimas são inibidas por metabólitos que sinalizam condição plena de energia (Numa, 1984). Assim, as análises sugerem que durante infecção no baço, *P. brasiliensis* seja submetido a uma condição de privação nutricional, podendo os lipídeos do hospedeiro serem utilizados como fonte de carbono e energia através da beta-oxidação. O aumento na expressão de enzimas da beta-oxidação durante a infecção tem sido também observado em outros fungos e bactérias patogênicas (Strijbis & Distel, 2010; Farhana *et al.*, 2010; Shin *et al.*, 2011).

Um aumento na expressão de transcritos codificantes para enzimas envolvidas na síntese de ácidos-graxos e triacilgliceróis foi também observado em *P. brasiliensis* derivado do baço de camundongos infectados. A indução de transcritos para ácido-graxo sintase, esterol-O-aciltransferase, diacilglicerolaciltransferase e o aumento do nível de triacilgliceróis observadas em células de levedura recuperadas de baço infectado reforça a sugestão. Como discutido anteriormente, uma vez que lipídeos poderiam ser utilizados como fonte de carbono por *P. brasiliensis* durante colonização no baço, a indução da beta-oxidação poderia levar a um aumento no nível de moléculas redutivas, como NADH, NADPH e FADH₂. Neste sentido, sugere-se que uma indução nas vias metabólicas de síntese de ácidos-graxos poderia promover a oxidação destes compostos redutivos e assim, manter o balanço redox. O aumento dos níveis de triacilglicerol em *P. brasiliensis* durante ensaios de estresse redutivo induzido por DTT suportam esta especulação. Um aumento na produção de metabólitos redutivos foi observado em *Mycobacterium tuberculosis* durante infecção no baço (Singh *et al.*, 2009; Farhana *et al.*, 2010; Shin *et al.*, 2011). Os autores destes estudos sugeriram que o anabolismo de ácidos-graxos durante a infecção poderia funcionar como uma importante estratégia para eliminação destes compostos redutivos e conseqüentemente na manutenção do estado redox celular.

Outros transcritos codificantes para proteínas reguladoras do potencial redox foram também induzidos em *P. brasiliensis* recuperado de baço de camundongos. Nas análises de RDA, o transcrito codificante para uma proteína com motivo PAS apresentou o maior número de ocorrências. Estes domínios PAS, identificados em proteínas relacionadas com a comunicação celular, são importantes sinalizadores de mudanças no potencial redox da célula (Taylor & Zhulin, 1999). Assim, a super regulação do produto gênico para a proteína com o motivo PAS sugere que *P. brasiliensis* utilize estes sistema de sinalização para responder a condições de estresse oxidativo e/ou redutivo durante o desenvolvimento da infecção no hospedeiro.

Um aumento na expressão de transcritos codificantes para as oxidoredutases glutational-S-transferase e tioredoxina redutase foi também observado neste estudo. Estas enzimas fazem parte de um sistema redox, protegendo os componentes celulares dos danos causados por condições de estresse oxidativo e redutivo (Thön *et al.*, 2007). Avaliando a atividade enzimática da tioredoxina redutase de *P. brasiliensis*, pode-se observar um aumento na atividade da enzima tanto em células de levedura derivadas de baço infectado quanto em células tratadas com DTT. As análises sugerem que estas oxidoredutases poderiam proteger o fungo contra as moléculas redutivas, produzidas pelas vias metabólicas induzidas durante a infecção. Outro mecanismo de defesa oxidante identificado em *P. brasiliensis* recuperado do baço de camundongos infectados envolve a utilização do aldeído pela betaína aldeído desidrogenase. A reação de oxido-redução realizada pela betaína aldeído desidrogenase produz NADH e conseqüentemente promove a manutenção do balanço redox (Shin *et al.*, 2011).

Além da importância de uma fonte de carbono adequada, a absorção de nitrogênio é um pré-requisito essencial para o desenvolvimento de infecção (Fleck *et al.*, 2011). Assim, muitas evidências sugerem que proteases de *P. brasiliensis* são necessárias para a

aquisição de nitrogênio, para a defesa ou para facilitar a invasão de células, enfraquecendo as barreiras de ligação dos tecidos do hospedeiro (Nishikaku *et al*, 2009; Parente *et al*, 2010). A identificação de ESTs para uma serino protease e uma zinco metaloprotease em *P. brasiliensis* recuperado do baço infectado, reforça a sugestão do envolvimento de proteases no progresso da infecção. Além disso, a indução do transcrito codificante para a permease de aminoácidos (Dip5), neste modelo, sugere que o fungo esteja reorganizando os processos de aquisição e assimilação de moléculas para utilizar os nutrientes disponíveis no baço, esta característica também é observada em *C. albicans* durante a fagocitose (Lorenz *et al.*, 2004).

Nos tecidos do hospedeiro o nível de micro e macro nutrientes livres é significativamente limitado e, portanto, os mecanismos dos patógenos para aquisição destas moléculas são altamente adaptativos e importantes para virulência. A homeostase de ferro é crítica para a célula, uma vez que este metal é um cofator essencial para diversas proteínas antioxidantes. Neste aspecto, a captação e estoque de ferro são particularmente importantes para patógenos quando estes se encontram no interior do hospedeiro. Como estratégia, *P. brasiliensis* supostamente secreta sideróforos e/ou induz a expressão de sistemas de alta e baixa afinidade para aquisição de ferronos tecidos do hospedeiro (Parente *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2011). Em células leveduriformes derivadas do baço infectado pode-se identificar indução na expressão de transcritos codificantes para a proteína regulatória ATF1, para o transportador de sideróforo 1 e para uma zinco/ferro permease de alta afinidade. Estes dados sugerem que um sistema de captura de ferro deve ser um mecanismo de sobrevivência indispensável para *P. brasiliensis* quando este se encontra colonizando os tecidos do hospedeiro.

Analisando as ESTs mais abundantes identificadas em células leveduriformes derivadas de baço e fígado de camundongos infectados (Bailão *et al.*, 2006; Costa *et al.*,

2007), é possível obter informações dos principais aspectos adaptativos de *P. brasiliensis* durante processo de infecção em tecidos do hospedeiro. A beta-oxidação de ácidos-graxos poderia ser detectada como uma importante adaptação de *P. brasiliensis* durante infecção no baço. Em contraste, pode-se observar que em células recuperadas de fígado transcritos codificantes para proteínas relacionados com a assimilação de carbono através da via glicolítica e fermentação alcoólica foram induzidos. A indução do metabolismo de carboidratos e produção de etanol sugere que estas vias são importantes durante infecção no fígado, uma vez que a glicose possivelmente seria mais disponível para o fungo neste nicho, como descrito previamente por Costa *et al.* (2007). Além da beta-oxidação a síntese de lipídeos também se mostrou induzida tanto em baço quanto em fígado infectados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6 – PERSPECTIVAS/ TRABALHOS EM DESENVOLVIMENTO

Considerando os resultados obtidos as seguintes perspectivas são propostas:

- Avaliação da resposta transcricional de *P. brasiliensis* por diferenças na vias de inoculação fúngica;
- Comparação da resposta obtida pela infecção no baço com aquelas observadas em outros nichos;
- Análise proteômica de *P. brasiliensis* recuperado do baço de modelos experimentais;
- Avaliar a resposta de *P. brasiliensis* em tempos iniciais de infecção no baço através de modelos de infecção *ex vivo*;
- Avaliação da relação transcrito/proteína de *P. brasiliensis* durante infecção no baço;
- Análise do padrão de expressão gênica e protéica em outros nichos do hospedeiro, como pulmão.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andes, D., Lepak, A., Pitula, A., Marchillo, K., Clark, J., 2005. A simple approach for estimating gene expression in *Candida albicans* directly from a systemic infection site. *J Infect Dis* 192(5): 893-900.

Andrade, R. V., Paes, H. C., Nicola, A. M., de Carvalho, M. J., Fachin, A. L., Cardoso, R. S., Silva, S. S., Fernandes, L., Silva, S. P., Donadi, E. A., Sakamoto-Hojo, E. T., Passos, G. A., Soares, C. M., Brigido, M. M., Felipe, M. S., 2006. Cell organisation, sulphur metabolism and ion transport-related genes are differentially expressed in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium and yeast cells. *BMC Genomics* 7: 201-208.

Bagagli, E., Bosco, S. M., Theodoro, R. C., Franco, M. 2006. Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. *Infect Genet Evol* 6(5): 344-351.

Bagagli, E., Theodoro, R. C., Bosco, S. M., McEwen, J. G., 2008. *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. *Mycopathologia* 165(4-5): 197-207.

Bailao, A. M., Schrank, A., Borges, C. L., Dutra, V., Molinari-Madlum, E. E. W. I., Felipe, M. S. S., Mendes-Giannini, M. J. S., Martins, W. S., Pereira, M., 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(12-13): 2686-2697.

Bailao, A. M., Shrank, A., Borges, C. L., Parente, J. A., Dutra, V., Felipe, M. S., Fiuza, R. B., Pereira, M., Soares, C. M. A., 2007. The transcriptional profile of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells is influenced by human plasma. *FEMS Immunol Med Microbiol* 51(1): 43-57.

Barrozo, L. V., Mendes, R. P., Marques, S. A., Benard, G., Silva, M.E., Bagagli, E., 2009. Climate and acute/subacute paracoccidioidomycosis in a hyper-endemic area in Brazil. *Int J Epidemiol* 38(6): 1642-1649.

Bastos, K. P., Bailao, A. M., Borges, C. L., Faria, F. P., Felipe, M. S., Silva, M. G., Martins, W. S., Fiuza, R. B., Pereira, M., Soares, C. M. A., 2007. The transcriptome analysis of early morphogenesis in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium reveals novel and induced genes potentially associated to the dimorphic process. *BMC Microbiol* 7: 22-29.

Brummer, E., Castaneda, E., Restrepo, A., 1993. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev* 6(2): 89-117.

Buitrago, M. J., Bernal-Martínez, L., Castelli, M. V., Rodríguez-Tudela, J. L., Cuenca-Estrella, M., 2011. Histoplasmosis and paracoccidioidomycosis in a non-endemic area: a review of cases and diagnosis. *J Travel Med* 18(1): 26-33.

Bukau, B., Horwich, A. L., 1998. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92(3): 351-66.

Cabiscol, E., Bellí, G., Tamarit, J., Echave, P., Herrero, E., Ros, J., 2002. Mitochondrial Hsp60, resistance to oxidative stress, and the labile iron pool are closely connected in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 277(46): 44531-44538.

Chagas, R.F., Bailão, A.M., Pereira, M., Winters, M.S., Smullian, A.G., Deepe, G.S. Jr, Soares, C.M.A., 2008. The catalases of *Paracoccidioides brasiliensis* are differentially regulated: protein activity and transcript analysis. *Fungal Genet Biol* 45(11): 1470-1478.

Corredor, G. G., Peralta, L. A., Castano, J. H., Zuluaga, J. S., Henao, B., Arango, M., Tabares, A. M., Matute, D. R., McEwen, J. G., Restrepo, A., 2005. The nakedtailed armadillo *Cabassous centralis* (Miller 1899): a new host to *Paracoccidioides brasiliensis*. Molecular identification of the isolate. *Med Mycol* 43(3): 275-280.

Corte, A. C., Svoboda, W. K., Navarro, I. T., Freire, R. L., Malanski, L. S., Shiozawa, M. M., Ludwig, G., Aguiar, L. M., Passos, F. C., Maron, A., Camargo, Z. P., Itano, E. N., Ono, M. A., 2007. Paracoccidioidomycosis in wild monkeys from Parana State, Brazil. *Mycopathologia* 164(5): 225-228.

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. 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(12): 4194-4207.

Dantas, S.F., Rezende, T.C.V., Bailão, A.M., Taborda, C.P., Santos, R.S., Castro, K.P., Soares, C.M.A., 2009. Identification and characterization of antigenic proteins potentially expressed during the infectious process of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect.* 11(10-11): 895-903.

Doherty, C. P., 2007. Host-pathogen interactions: the role of iron. *J Nutr* 137(5): 1341-1344.

Ejim, L. J., D'Costa, V. M., Elowe, N. H., Loredó-Osti, J. C., Malo, D., Wright, G. D., 2004. Cystathionine beta-lyase is important for virulence of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Infect Immun* 72(6): 3310-3314.

Enjalbert, B., MacCallum, D.M., Odds, F.C., Brown, A.J., 2007. Niche-specific activation of the oxidative stress response by the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Infect Immun.* 75(5): 2143-2151.

Farhana, A., Guidry, L., Srivastava, A., Singh, A., Hondalus, M. K., Steyn, A. J., 2010. Reductive stress in microbes: implications for understanding *Mycobacterium tuberculosis* disease and persistence. *Adv Microb Physiol* 57: 43-117.

Felipe, M. S., Andrade, R. V., Arraes, F. B., Nicola, A. M., Maranhão, 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., Carvalho, M. J., Brigido, M. M., 2005. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus

Paracoccidioides brasiliensis in mycelium and yeast cells. J Biol Chem 280(26): 24706-24714.

Felipe, M.S.S., Andrade, R.V., Petrofeza, S.S. et al., 2003. Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. Yeast 20: 263–271.

Fernández-Arenas, E., Cabezón, V., Bermejo, C., Arroyo, J., Nombela, C., Diez-Orejas, R., Gil, C., 2007. Integrated proteomics and genomics strategies bring new insight into *Candida albicans* response upon macrophage interaction. Mol Cell Proteomics 6(3): 460-78.

Fleck, C. B., Schöbel, F., Brock, M., 2011. Nutrient acquisition by pathogenic fungi: nutrient availability, pathway regulation, and differences in substrate utilization. Int J Med Microbiol 301: 400-407.

Fortes, R. M, Kipnis, A., Junqueira-Kipnis, A. P., 2009. *Paracoccidioides brasiliensis* pancreatic destruction in *Calomys callosus* experimentally infected. BMC Microbiol 7: 79-84.

Fradin, C., De Groot, P., MacCallum, D., Schaller, M., Klis, F., Odds, F. C., Hube, B., 2005. Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. Mol Microbiol 56(2): 397-415.

Fradin, C., Kretschmar, M., Nichterlein, T., Gaillardin, C., d'Enfert, C., Hube, B., 2003. Stage-specific gene expression of *Candida albicans* in human blood. Mol Microbiol 47(6): 1523-1543.

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

Garcia, P., Tajadura, V., Garcia, I., Sanchez, Y., 2006. Rgf1p is a specific Rho1-GEF that coordinates cell polarization with cell wall biogenesis in fission yeast. *Mol Biol Cell* 17(4): 1620-1631.

Georgopapadakou, N. H., 1998. Antifungals: mechanism of action and resistance, established and novel drugs. *Curr Opin Microbiol* 1(5): 547-557.

Goldani, L. Z., 2011. Gastrointestinal paracoccidioidomycosis: an overview. *J Clin Gastroenterol* 45(2): 87-91.

Goldman, G. H., dos Reis Marques, E., Duarte Ribeiro, D. C., de Souza Bernardes, L. A., Quiapin, A. C., Vitorelli, P. M., Savoldi, M., Semighini, C. P., de Oliveira, R. C., Nunes, L. R., Travassos, L. R., Puccia, R., Batista, W. L., Ferreira, L. E., Moreira, J. C., Bogossian, A. P., Tekaia, F., Nobrega, M. P., Nobrega, F. G., Goldman, M. H., 2003. Expressed sequence tag analysis of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase: identification of putative homologues of *Candida albicans* virulence and pathogenicity genes. *Eukaryot Cell* 2(1): 34-48.

Gravelat, F. N., Doedt, T., Chiang, L. Y., Liu, H., Filler, S. G., Patterson, T. F., Sheppard, D. C., 2008. In vivo analysis of *Aspergillus fumigatus* developmental gene expression determined by real-time reverse transcription-PCR. *Infect Immun* 76(8): 3632-3639.

Grose, E. & Tamsitt, J. R., 1965. *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from the intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia, S.A. *Sabouraudia* 4(2):124-125.

Hartmann, T., Sasse, C., Schedler, A., Hasenberg, M., Gunzer, M., Krappmann, S., 2011. Shaping the fungal adaptome--stress responses of *Aspergillus fumigatus*. *Int J Med Microbiol* 301(5): 408-416.

Johnson, L., 2008. Iron and siderophores in fungal-host interactions. *Mycol Res* 112: 170-183.

Kniemeyer, O., Schmidt, A. D., Vödisch, M., Wartenberg, D., Brakhage, A. A., 2011. Identification of virulence determinants of the human pathogenic fungi *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* by proteomics. *Int J Med Microbiol* 301(5): 368-377.

Kniemeyer, O., Schmidt, A. D., Vödisch, M., Wartenberg, D., Brakhage, A. A., Identification of virulence determinants of the human pathogenic fungi *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* by proteomics. *Int J Med Microbiol* 301(5): 368-377.

Kumamoto, C. A., 2008. Niche-specific gene expression during *Candida albicans* infection. *Curr Opin Microbiol* 11(4): 325-330.

Lopes, D. L., Araújo, S. A., Santos, J. P., Lyon, A. C., Dantas, D. V., Reis, B. S., Góes, A. M., Pedroso, E. R., 2009. Prostatic paracoccidioidomycosis: differential diagnosis of prostate cancer. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104(1): 33-36.

Lorenz, M.C., Bender, J.A., Fink, G.R., 2004. Transcriptional response of *Candida albicans* upon internalization by macrophages. *Eukaryot Cell*. 3(5): 1076-1087.

Marques, E. R., Ferreira, M. E., Drummond, R. D., Felix, J. M., Menossi, M., Savoldi, M., Travassos, L. R., Puccia, R., Batista, W. L., Carvalho, K. C., Goldman, M. H., Goldman, G. H., 2004. Identification of genes preferentially expressed in the pathogenic yeast phase of *Paracoccidioides brasiliensis*, using suppression subtraction hybridization and differential macroarray analysis. *Mol Genet Genomics* 271(6): 667-677.

Martin, R., Wächtler, B., Schaller, M., Wilson, D., Hube, B., 2011. Host-pathogen interactions and virulence-associated genes during *Candida albicans* oral infections. *Int J Med Microbiol* 301(5): 417-422.

Matute, D. R., Sepulveda, V. E., Quesada, L. M., Goldman, G. H., Taylor, J. W., Restrepo, A., McEwen, J. G., 2006. Microsatellite analysis of three phylogenetic species of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Clin Microbiol* 44(6): 2153-2157.

- McQuiston, T., Luberto, C., Del Poeta, M., 2011. Role of sphingosine-1-phosphate (S1P) and S1P receptor 2 in the phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* by alveolar macrophages. *Microbiology* 157(5): 1416-1427.
- Nemecek, J. C., Wuthrich, M., Klein, B. S., 2006. Global control of dimorphism and virulence in fungi. *Science* 312(5773): 583-588.
- Nishikaku, A.S., Ribeiro, L.C., Molina, R.F., Albe, B.P., Cunha, Cda, S., Burger, E. (2009) Matrix metalloproteinases with gelatinolytic activity induced by *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Int J Exp Pathol.* 90(5):527-37.
- Numa, S., 1984. Fatty acid metabolism and its regulation, new comprehensive biochemistry, vol 7 (Neuberger, A. & Van Deenen, L. L. M., series eds), Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.
- Nunes, L. R., Costa de Oliveira, R., Leite, D. B., da Silva, V. S., dos Reis Marques, E., da Silva Ferreira, M. E., Ribeiro, D. C., de Souza Bernardes, L. A., Goldman, M. H., Puccia, R., Travassos, L. R., Batista, W. L., Nobrega, M. P., Nobrega, F. G., Yang, D. Y., de Braganca Pereira, C. A., Goldman, G. H., 2005. Transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* cells undergoing mycelium-to-yeast transition. *Eukaryot Cell* 4(12): 2115-2128.
- Okagaki, L. H., Strain, A. K., Nielsen, J. N., Charlier, C., Baltes, N. J., Chrétien, F., Heitman, J., Dromer, F., Nielsen, K., 2010. Cryptococcal cell morphology affects host cell interactions and pathogenicity. *PLoS Pathog* 6(6): 953-963.
- Paniago, A. M., Aguiar, J. I., Aguiar, E. S., Cunha, R. V., Pereira, G. R., Londero, A. T., Wanke, B., 2003. Paracoccidioidomycosis: a clinical and epidemiological study of 422 cases observed in Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop.* 36(4): 455-459.
- Paniago, A. M., Aguiar, J. I., Aguiar, E. S., da Cunha, R. V., Pereira, G. R., Londero, A. Panunto-Castelo, A., Freitas-da-Silva, G., Bragheto, I. C., Martinez, R., Roque-Barreira, M. C., 2003. *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens: recognition by IgG

from patients with different clinical forms of paracoccidioidomycosis. *Microbes Infect* 5(13): 1205-1211.

Parente, A. F., Bailão, A. M., Borges, C. L., Parente, J. A., Magalhães, A. D., Ricart, C. A. O., Soares, C. M. A., 2011. Proteomic analysis reveals that iron availability alters the metabolic status of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Plos One* 6(7): 281-288.

Paris, S., Duran-Gonzalez, S., Mariat, F., 1985. Nutritional studies on *Paracoccidioides brasiliensis*: the role of organic sulfur in dimorphism. *Sabouraudia* 23(2):85-92.

Pereira, M., Bailão, A.M., Parente, J.A., Borges, C.L., Salem-Izacc, S.M., Soares, C.M. A., 2009. Preferential transcription of *Paracoccidioides brasiliensis* genes: host niche and time-dependent expression. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 104(3): 486-491.

Peres da Silva, P. R., Matsumoto, M. T., Braz, J. D., Voltan, A. R., Oliveira, H. C., Soares, C. P., Mendes Giannini, M. J., 2011. Differential gene expression analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* during keratinocyte infection. *J Med Microbiol* 60(3): 269-280.

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

Ramírez, M. A., Lorenz, M. C., 2007. Mutations in alternative carbon utilization pathways in *Candida albicans* attenuate virulence and confer pleiotropic phenotypes. *Eukaryot Cell* 6:280-290.

Ramos-Silva, M., Saraiva, L. E., 2008. Paracoccidioidomycosis. *Dermatol Clin* 26(2): 257-69.

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

- Ravi, S., Pierce, C., Witt, C., Wormley, F. L. Jr., 2009. Biofilm formation by *Cryptococcus neoformans* under distinct environmental conditions. *Mycopathologia* 167(6): 307-314.
- Restrepo, A., 1985. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *Sabouraudia* 23(5): 323-334.
- Restrepo, A., Benard, G., Castro, C. C., Agudelo, C. A., Tobón, A. M., 2008. Pulmonary paracoccidioidomycosis. *Semin Respir Crit Care Med* 29(2): 182-97.
- Rezende, T. V., Borges, C. L., Magalhães, A. D., Sousa, M. V., Ricart, C. A., Bailão, A. M., Soares, C. M. A., 2011. A quantitative view of the morphological phases of *Paracoccidioides brasiliensis* using Proteomics. *J Proteomics*. In press
- Richini-Pereira, V. B., Bosco, S. M., Theodoro, R. C., Macoris, S. A., Bagagli, E., 2009. Molecular approaches for eco-epidemiological studies of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104(4):636-643.
- Rodrigues, M. F., Anuska, Z., C. L., Garcia, R. M., Moraes, G., B., S., Dominguez, M. M., Werner, J., Cordeiro, T. R., Bagagli, E., Alencar, M. S., Franco, M., 2011. Paracoccidioidomycosis in a dog: case report of generalized lymphadenomegaly. *Mycopathologia* 172(2):147-152.
- San-Blas, G. & Nino-Vega, G., 2001. *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and host response. *Fungal pathogenesis: principles and clinical applications*. Cihlar, R. L. & Calderone, R. A. New York, Marcel Dekker: 205-242.
- San-Blas, G. & Nino-Vega, G., 2008. *Paracoccidioides brasiliensis*: chemical and molecular tools for research on cell walls, antifungals, diagnosis, taxonomy. *Mycopathologia* 165(4-5): 183-195.
- San-Blas, G., 1993. Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol* 31(2): 99-113.

San-Blas, G., Suzuki, S., Hearn, V., Pineda, C., Kobayashi, H., Mendez, C., Niño, G., Nishikawa, A., San-Blas, F., Shibata, N., *et al.*, 1994. Fungal polysaccharides. *J Med Vet Mycol* 1: 321-328.

San-Blas, G., Nino-Vega, G., Iturriaga, T., 2002. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med Mycol* 40(3): 225-242.

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

Shin, J. H., Yang, J. Y., Jeon, B. Y., Yoon, Y. J., Cho, S. N., Kang, Y. H., Ryu, H., Hwang, G. S., 2001. (1)HNMR-based metabolomic profiling in mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Proteome Res* 6: 2238-2247.

Shankar, J., Restrepo, A., Clemons, K. V., Stevens, D. A., 2011. Hormones and the resistance of women to paracoccidioidomycosis. *Clin Microbiol Rev* 24(2): 296-313

Silva, M. G., Schrank, A., Bailão, E. F., Bailão, A. M., Borges, C. L., Staats, C. C., Parente, J. A., Pereira, M., Salem-Izacc, S. M., Mendes-Giannini, M. J., Oliveira, R.M., Silva, L. K., Nosanchuk, J. D., Vainstein, M. H., Soares, C. M. A., 2011. The homeostasis of iron, copper, and zinc in *Paracoccidioides brasiliensis*, *Cryptococcus neoformans* var. *Grubii*, and *Cryptococcus gattii*: a comparative analysis. *Front Microbiol* 2: 49-58.

Souza, C. A., Kronstad, J. W., Taylor, G., Warren, R., Yuen, M., Hu, G., Jung, W. H., Sham, A., Kidd, S. E., Tangen, K., Lee, N., Zeilmaker, T., Sawkins, J., McVicker, G., Shah, S., Gnerre, S., Griggs, A., Zeng, Q., Bartlett, K., Li, W., Wang, X., Heitman, J., Stajich, J. E., Fraser, J. A., Meyer, W., Carter, D., Schein, J., Krzywinski, M., Kwon-Chung, K. J., Varma, A., Wang, J., Brunham, R., Fyfe, M., Ouellette, B. F., Siddiqui, A., Marra, M., Jones, S., Holt, R., Birren, B. W., Galagan, J. E., Cuomo, C. A., 2011. Genome variation in *Cryptococcus gattii*, an emerging pathogen of immunocompetent hosts. *MBio* 2(1): 342-350.

Steen, B.R., Zuyderduyn, S., Toffaletti, D. L., Marra, M., Jones, S. J., Perfect, J. R., Kronstad, J., 2003. *Cryptococcus neoformans* gene expression during experimental cryptococcal meningitis. *Eukaryot Cell* 2(6): 1336-1349.

Strijbis, K., Distel, B., 2010. Intracellular acetyl unit transport in fungal carbon metabolism. *Eukaryot Cell* 9: 1809-1815.

Sugui, J.A., Kim, H.S., Zarembek, K.A., Chang, Y.C., Gallin, J.I., Nierman, W.C., Kwon-Chung, K.J., 2008. Genes differentially expressed in conidia and hyphae of *Aspergillus fumigatus* upon exposure to human neutrophils. *PLoS One* 3(7): 2655-2662.

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., Soares, C. M., Bocca, A. L., Carvalho, M. J., Silva-Pereira, I., Felipe, M. S., 2007. Early transcriptional response of *Paracoccidioides brasiliensis* upon internalization by murine macrophages. *Microbes Infect* 9(5): 583-590.

Taylor, B. L. & Zhulin, I. B., 1999. PAS domains: Internal Sensors of Oxygen, Redox Potential, and Light. *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 479-506.

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

Terçarioli, G. R., Bagagli, E., Reis, G. M., Theodoro, R. C., Bosco, S. M., Macoris, S. A., Richini-Pereira, V. B., 2007. Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. *BMC Microbiol* 22: 7:92.

Thewes, S., Kretschmar, M., Park, H., Schaller, M., Filler, S.G., Hube, B., 2007. In vivo and ex vivo comparative transcriptional profiling of invasive and non-invasive *Candida albicans* isolates identifies genes associated with tissue invasion. *Mol Microbiol* 63(6): 1606-1628.

Thön, M., Al-Abdallah, Q., Hortschansky, P., 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.

Walker, L. A., Maccallum, D. M., Bertram, G., Gow, N. A., Odds, F. C., Brown, A. J., 2009. Genome-wide analysis of *Candida albicans* gene expression patterns during infection of the mammalian kidney. *Fungal Genet Biol.* 46(2): 210-229.

Capítulo II

ESSTRESSE OXIDATIVO

RESUMO

Catalases são componentes essenciais da célula para proteção contra com o estresse oxidativo. Três diferentes isoformas catalase (*PbCATA*, *PbCATP* e *PbCATC*) foram identificados em *P. brasiliensis*. Géis de atividade para catalases revelaram uma expressão diferencial destas isoenzimas em resposta às condições de estresse e diferentes tipos celulares do fungo. *PbCATA* apresentou maior atividade na fase miceliana, mostrando uma maior atividade durante a transição de micélio para levedura e em condições de estresse oxidativo endógeno. Consistente com nossos estudos anteriores, *PbCATP* apresentou maior atividade em células de levedura, uma vez que é supostamente envolvidos no controle das espécies reativas de oxigênio exógenas. *P. brasiliensis* apresentou uma resposta ao estresse oxidativo após a fagocitose por macrófagos, induzindo a expressão de transcritos para as catalases A e P. *PbCATC* exibiu um padrão relativamente constante de expressão, sendo modestamente induzida em células expostas a estresse osmótico e choque-térmico. Adicionalmente, a catalase P foi purificada e a purificação foi validada utilizando espectrometria de massa e análises de bioinformática. Como a maioria das catalases monofuncionais, *PbCATP* é homotetramérica, resistente à inativação por condições ácidas, temperatura e desnaturantes. Além disso, o comportamento cinético da catalase P foi diferente em baixa concentração de H_2O_2 em comparação com altas concentrações do substrato. Os resultados demonstraram que um *PbCATP* purificada é uma enzima homotetramérica, classificada como uma catalase de subunidade pequena.

Palavras-chave: Catalases A, P e C; transição de micélio para levedura; infecção; estresse oxidativo; purificação e estudos cinéticos

ABSTRACT

Catalases are essential components of the cellular equipment to cope with oxidative stress. Three distinct catalase isoforms (*PbCATA*, *PbCATP* e *PbCATC*) were identified in *P. brasiliensis*. Native catalase activity gels revealed a differential expression of these isozymes in reply to the different stress conditions and the cell types. *PbCATA* manifested higher activity in the mycelial phase, showed increased activity during transition from mycelium to yeast and during conditions of endogenous oxidative stress. Consistent with our previous studies, *PbCATP* manifested higher activity in yeast cells since it is putatively involved in the control of exogenous reactive oxygen species. *P. brasiliensis* displays an oxidative stress response following phagocytosis by macrophages, inducing the expression of catalase A and P transcripts. *PbCATC* displayed a relatively constant pattern of expression, being modestly induced in cells exposed to osmotic and heat stress. Additionally, the catalase P was purified and the purification was validated using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry and bioinformatics analysis. Like most monofunctional catalases, *PbCATP* is a homotetramer, resistant to inactivation by acidic conditions, temperature and denaturants. Furthermore, the kinetic behaviour of catalase P was observed to be different at low compared to high H₂O₂ concentrations. The results demonstrated that a purified *PbCATP* is a homotetrameric enzyme, classified as a small subunit catalase.

Keywords: *Paracoccidioides brasiliensis*; catalases A, P and C; mycelium to yeast transition; infection; oxidative stress; purification and kinetic studies

INTRODUÇÃO

1 – INTRODUÇÃO

1.1 - Estresse oxidativo e moléculas antioxidantes

Em organismos aeróbicos o oxigênio exerce papel fundamental no metabolismo energético celular, uma vez que funciona como aceptor final da cadeia transportadora de elétrons. Porém, o oxigênio molecular (dioxigênio, O₂) pode alcançar estados excitados e altamente reativos. As espécies reativas de oxigênio (EROs) são geradas a partir da ativação ou redução do dioxigênio além de produtos derivados de sua redução. Entre estas moléculas reativas incluem-se o radical superóxido (O₂^{•-}), o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o radical hidroxila (OH[•]) (Heller & Tudzynski, 2010).

As espécies intermediárias de oxigênio são extremamente reativas e citotóxicas para todos os organismos, podendo interagir com proteínas, lipídios e ácidos nucleicos ocasionando sérios danos às estruturas celulares (Wang *et al.*, 2007; Rizzo *et al.*, 2011). Durante exposição das células de *Penicillium expansum* à H₂O₂, observou-se uma ativação das vias de morte celular. Análises proteômicas revelaram que o tratamento promovia danos oxidativos severos nas proteínas mitocondriais levando a um colapso no potencial de membrana da organela e conseqüentemente a apoptose celular (Qin *et al.*, 2011). A oxidação do DNA pode causar alterações nas bases nitrogenadas ou promover a clivagem de ligações fosfodiéster. Uma das mutações mais estudadas causadas por EROs é 8-hidroxi guanina (8-OH-Gua), a qual leva à conversão de guanina/citosina para timina/adenina, sendo essa mutação envolvida em diversas doenças incluindo câncer e doenças neurodegenerativas (Lee & Pervaiz, 2011).

É essencial que as células consigam manter um meio intracelular reduzido, com um potencial intrínseco de redução controlado, que garanta um funcionamento satisfatório do sistema celular. No entanto, as células são submetidas a uma série de

processos metabólicos (transporte de elétrons nas mitocôndrias, β -oxidação de ácidos-graxos, foto respiração em plantas, diferenciação celular) e fatores ambientais (exposição à alta osmolaridade, choque térmico e estresse por irradiação), que são capazes de alterar o potencial redox celular podendo levar à formação de ERO (Tighe *et al.*, 2011). Para garantir a homeostase e proteger contra danos oxidativos, os organismos aeróbicos apresentam sistemas de defesa antioxidante que reagem com as ERO e impedem que estas promovam a oxidação dos componentes celulares. Os sistemas antioxidantes podem agir de maneira independente ou se complementar na célula com a função de eliminar os intermediários de oxigênio. Assim, os fungos apresentam antioxidantes de natureza enzimática ou moléculas produzidas pelo metabolismo secundário para combate aos radicais livres de oxigênio (Chauhan & Calderone, 2006). Melanina, β -carotenos, Zeaxantina, Ascorbato e Vitamina E são alguns exemplos de moléculas antioxidantes não enzimáticas. Dentre os antioxidantes de natureza enzimática podem-se destacar as superóxido dismutases (SODs), as peroxidases, o sistema tioredoxina, as glutathione S-transferase e catalases (Scandalios, 2005; Wang *et al.*, 2007; Alpsoy & Yalvac, 2011).

As EROs são produzidas em todos os organismos aeróbicos e normalmente existem na célula em balanço com as moléculas antioxidantes. O estresse oxidativo ocorre quando este balanço crítico é interrompido pela falta de moléculas antioxidantes ou pelo excesso de produção de EROs (Scandalios, 2005). A formação deste estado altamente oxidante pode ser desencadeada por processos metabólicos endógenos (estresse oxidativo endógeno), principalmente aqueles relacionados à produção de energia ou através da exposição celular a agentes estressores externos e na fagocitose por células efectoras do hospedeiro (estresse oxidativo exógeno) (Cap *et al.*, 2009).

Durante o desenvolvimento de processos infecciosos, organismos patogênicos precisam adaptar-se aos ambientes do hospedeiro, regulando seus processos metabólicos

no intuito de aproveitar de maneira satisfatória os nutrientes disponíveis nestes nichos. Assim, observa-se que em alguns tecidos estes organismos podem utilizar a glicose como fonte geradora de energia e em outros os lipídios exercem esse papel. Independente da fonte energética utilizada, a indução destas vias metabólicas acaba promovendo um aumento de intermediários de oxigênio nos patógenos, fazendo com que estes aumentem a expressão de moléculas antioxidantes como forma de proteção ao estresse oxidativo endógeno gerado durante a adaptação no hospedeiro (Hartmann *et al.*, 2011).

Adicionalmente, durante colonização no hospedeiro, microrganismos patogênicos são ainda confrontados por EROs produzidas pelas células efectoras do sistema imune, na tentativa de eliminação do patógeno e controle da doença. Análises recentes sugerem que o estresse oxidativo exógeno gerado em organismos patogênicos durante o confronto com as células de defesa, seja um dos principais fatores que determina o curso da infecção. As respostas ao estresse oxidativo foram analisadas em ambos os fungos patogênicos *C. albicans* e *A. fumigatus* durante a fagocitose. As análises proteômicas revelaram que diversas proteínas com funções antioxidantes foram identificadas, confirmando o papel do sistema de defesa antioxidante na regulação redox em fungos patogênicos fagocitados (Kniemeyer *et al.*, 2011).

1.2 – Catalases

As catalases (EC 1.11.1.6) são oxidoreductases tetraméricas que apresentam um átomo de ferro ou manganês ligado à porfirina, promovendo a degradação do H₂O₂ em água e oxigênio (Kirkman & Gaetani, 2007). O nome catalase foi primeiramente aplicado, em 1900 e a proteína tem sido objeto de estudos em vários organismos diferentes desde então (Chelikani *et al.*, 2004). As catalases foram inicialmente caracterizadas por Loew (1901) e diversos motivos conservados para esta família de

enzimas vêm sendo identificados nas sequências deduzidas de aminoácidos (Schliebs *et al.*, 2006). Assim, observa-se à presença de um sítio ativo proximal, definido como essencial à catálise do H_2O_2 , o qual é altamente conservado, correspondendo a um espectro de possibilidades que incluem (IF) X (RH) X4 (EQ) RX2 HX2 (GAS) – (GASTF)-(GAST). Tem sido também observado um provável sítio de ligação ao grupo heme com espectro de possibilidades que abrange R – (LIVMFSTAN)-F-(GASTNP) YXD (AST)-(QEH) (Von Ossowski *et al.*, 1993) e o resíduo conservado S-133, descrito por promover o correto dobramento da proteína e H-96 possivelmente envolvido na ligação e redução do H_2O_2 (Zámochný & Koller, 1999; Ding *et al.*, 2000).

De acordo com suas similaridades funcionais e estruturais as catalases podem ser classificadas em três grupos; as catalases manganês, catalases peroxidases e catalases monofuncionais. Catalases manganês, também conhecidas como pseudocatalases, são caracterizadas por apresentar o manganês ligado à porfirina. O segundo grupo compreende as catalases peroxidases ou catalases bifuncionais, que degradam, além do H_2O_2 , outras EROs. O terceiro grupo, classificado como catalases monofuncionais ou catalases verdadeiras, são enzimas homotetraméricas que degradam somente o H_2O_2 . Este último grupo é ainda subdividido e classificado de acordo com o tamanho molecular de seus monômeros, apresentando catalases de subunidade pequena (<60 kDa) e catalases de subunidade grande (>75 kDa). As catalases de subunidade grande ainda podem ser divididas em outros dois grupos: as catalases A, específicas de esporo e as catalases B que correspondem a um grupo de catalases secretadas (Chelikani *et al.*, 2004).

As catalases realizam reações de catálise do H_2O_2 . Este processo envolve a degradação de duas moléculas de H_2O_2 formando duas moléculas de H_2O e uma molécula de O_2 (Fig. 2). Durante o processo, quatro diferentes estágios de ativação podem ser formados: dois estados ativos denominados, composto I e ferricatalase e dois estados

inativos de catalases, denominados composto II e III. Durante o processo de reação enzimática as catalases se alternam entre estes dois estados ativos, enquanto os estados inativos podem ser formados com a exposição ao H_2O_2 ou $O_2^{\cdot-}$. O composto inativo II é formado pela redução de um único elétron do composto I e o composto inativo III é formado pela ação do H_2O_2 no composto II. Estes estados inativos são capazes de reverterem-se espontaneamente em uma catalase ativa quando a quantidade de substrato estiver controlada. Na presença contínua de H_2O_2 a formação destes compostos torna-se mais freqüente de modo a levar à inativação irreversível da enzima (Kirkman & Gaetani, 2007; Domínguez *et al.*, 2010).

Catalases de subunidade pequena apresentam capacidade de ligar ao NADPH. O NADPH é uma molécula que pode se ligar à catalase e oxidar-se a $NADP^+$ com o objetivo de doar elétrons ao composto I, evitando assim à formação de compostos II (Chelikani *et al.*, 2004). Em catalases de subunidade grande não se observa sítios de ligação ao NADPH; no entanto uma ligação covalente, não usual, entre uma cisteína na posição 356 e tirosina na posição 379 é capaz de evitar a formação de compostos inativos II. Sendo assim, não há necessidade em catalases de subunidade grande da ligação ao NADPH para impedir a inibição e inativação da enzima pelo substrato (Díaz *et al.*, 2004).

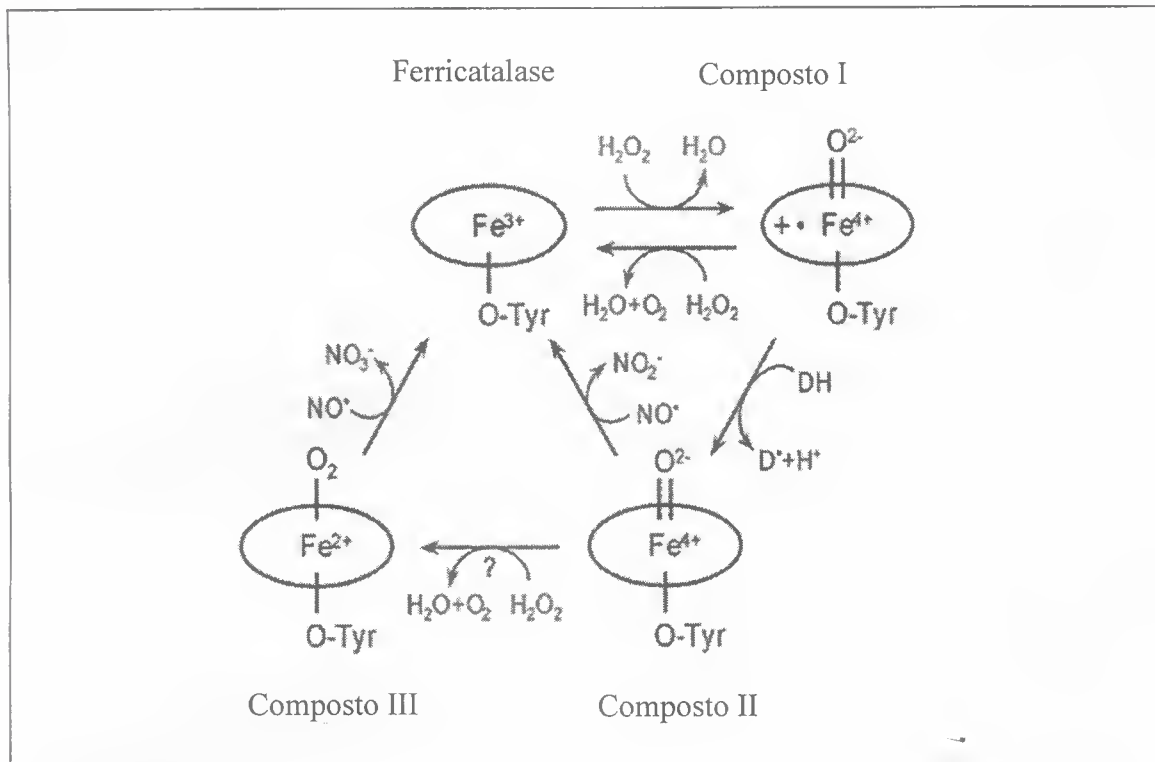


Figura 2 – Reação de catálise do H_2O_2 pelas catalases.

Tem sido amplamente discutido o papel das catalases na contribuição para a patogênese de diversos microrganismos, incluindo fungos patogênicos como *A. fumigatus* (Abad *et al.*, 2010) e *P. expansum* (Lai *et al.*, 2011). Neste sentido, as catalases fúngicas são consideradas fatores de virulência (Rappleye & Goldman, 2006; Tanabeet *et al.*, 2011) e moléculas cruciais para tolerância às EROs produzidas durante a diferenciação celular e condições de estresse (Michanet *et al.*, 2003; Drakulicet *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007; Morales Hernandez *et al.*, 2010). Adicionalmente, as catalases tem sido também descritas como antígenos imunodominantes em *H. capsulatum*, *Aspergillus niger* e *P. brasiliensis* (Zancopé-Oliveira *et al.*, 1999; Calera *et al.*, 1997; Fonseca *et al.*, 2001).

O tratamento com agentes oxidantes induz uma alta expressão de catalases (Yin *et al.*, 2009). A deleção do gene codificante para catalase 1 (homóloga a catalase A) diminuiu a sobrevivência e elevou a susceptibilidade de *C. albicans* ao H_2O_2 (Nakagwa *et*

al., 2003; Kush *et al.*, 2007). Em *A. fumigatus* e *Neurospora crassa* a deleção do gene codificante para a catalase específica de esporo (CATAp e CAT-1, respectivamente), levou a um aumento de sensibilidade ao H₂O₂ pelos mutantes comparados à linhagem selvagem, sugerindo que a proteína possa ser importante na sobrevivência destes fungos em condições de estresse oxidativo (Paris *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2007).

Diversos ensaios vêm sendo realizados no intuito de validar o papel das catalases durante o desenvolvimento de processos infecciosos. Em modelos de aspergilose experimental pelo fungo *A. fumigatus* pode-se observar que o duplo mutante para as catalases micelianas ($\Delta\text{cat1p}/\Delta\text{cat2p}$) desenvolveram um processo infectivo tardio em modelos animais. Os dados sugerem que as enzimas possam atuar na proteção do fungo contra as EROs do hospedeiro e ainda poderiam funcionar como importantes alvos para desenvolvimento de novos agentes antifúngicos para aspergilose (Shibuya *et al.*, 2006; Abad *et al.*, 2010). Em modelos de infecção por *C. glabrata* observou-se que a expressão de catalases foi essencial para promover a resistência do fungo ao estresse oxidativo e a adaptação ao ambiente do hospedeiro (Roetezer *et al.*, 2011). Ainda, durante o processo de infecção invasiva pelo fungo *Magnaporthe oryzae* foi observado que uma das estratégias requeridas pelo fungo para a patogenicidade durante crescimento no hospedeiro, consiste na indução da expressão de enzimas antioxidantes, incluindo catalases (Mathioni *et al.*, 2011).

Outras condições de estresse, como estresse osmótico e choque térmico, podem também promover uma alta expressão de moléculas antioxidantes. Em *A. nidulans* o transcrito para catalase peroxidase CATC foi induzido em condições de estresse osmótico por sorbitol (Kawasaki & Aguirre, 2001; Balázs *et al.*, 2010). Em resposta ao estresse osmótico, a expressão da catalase 1 (homóloga a catalase A) de *N. crassa* foi aumentada em células tratadas na presença de NaCl (Noguchi *et al.*, 2007). Kimet *al.*

(2006) demonstraram que células de *Saccharomyces cerevisiae*, em condições de choque térmico, apresentaram aumento nos níveis de H_2O_2 , e conseqüentemente aumento na expressão de catalases; este aspecto foi também observado em ensaios associativos de estresse oxidativo e choque térmico em *A. niger* (Abrashv *et al.*, 2008). Os dados sugerem que as enzimas antioxidantes, incluindo as catalases, podem contribuir na manutenção da homeostase celular em condições de aumento da entropia induzida pela brusca mudança de temperatura e também pela alteração da osmolaridade.

Um papel adicional das catalases tem sido observado durante a diferenciação morfológica de fungos (Papapostolou & Georgiou, 2010). Durante o ciclo de vida assexual de *N. crassa* a atividade específica de catalases mostrou-se alterada. A catalase 1 (homóloga a catalase A) do fungo mostrou maior acúmulo nos conídios, enquanto a catalase 3 (homóloga a catalase B) aumentou sua atividade durante o crescimento exponencial do micélio (Michán *et al.*, 2003). Em *C. albicans* a formação de hifas consiste em um dos fatores importantes para a colonização nos tecidos do hospedeiro. Neste fungo, a diferenciação é induzida por concentrações sub tóxicas de H_2O_2 exógeno; assim o nível de expressão de catalases é aumentado como estratégia para impedir acúmulo de H_2O_2 e conseqüentemente favorecer a diferenciação (Nasution *et al.*, 2008).

Catalases apresentam papel fundamental nos processos de germinação de esporos fúngicos. A alta expressão de catalases nos fungos *Metarhizium anisopliae* e *P. expansum* reduziram o tempo de germinação dos esporos e aumentaram a patogenicidade dos fungos, uma vez que estas inibiram os danos oxidativos causados pelas EROs nestas condições (Morales Hernandez *et al.*, 2010; Lai *et al.*, 2011). Adicionalmente, análises proteômicas empregadas para identificação de proteínas envolvidas nas fases iniciais de germinação dos conídios de *A. nidulans*, confirmaram o aumento de expressão da

catalase A no conídio, reforçando o papel das catalases no controle de ERO durante a diferenciação celular de fungos (Oh *et al.*, 2010).

1.3 - Estresse oxidativo e expressão de catalases em *P. brasiliensis*

Acredita-se que o processo infeccioso de *P. brasiliensis* ocorra através da inalação pelo hospedeiro humano de conídios/propágulos derivados da fase saprofítica do fungo. A primeira linha de defesa do hospedeiro à infecção por *P. brasiliensis* consiste na fagocitose do parasita pelos macrófagos pulmonares e na produção de ERO ou ERN (espécies reativas de nitrogênio), que induzem a formação de um estado altamente oxidativo no fungo (Santos *et al.*, 2011). Tem sido demonstrado que H₂O₂ produzido pelos neutrófilos polimorfonucleares (PMN) apresenta capacidade de restringir o crescimento e até mesmo promover a morte de *P. brasiliensis* (McEwen *et al.*, 1984; Meloni-Bruneri *et al.*, 1998). Rodrigues *et al.* (2007) concluíram que a ativação de citocinas é requerida para morte de *P. brasiliensis* por PMN humanos e que o H₂O₂ participa como uma molécula efetora no processo.

Apesar de serem fagocitados pelas células imunoprotetoras do hospedeiro na fase inicial de infecção, os conídios de *P. brasiliensis* diferenciam-se para a forma parasitária (levedura) que sobrevive normalmente no ambiente hostil intrafagossomal (Brummer *et al.*, 1989). Nesta etapa do ciclo de vida do fungo, a condição de choque térmico faz-se necessária para que ocorra a diferenciação de micélio à levedura permitindo o desenvolvimento da doença. A partir dos pulmões o fungo pode disseminar-se através das vias linfáticas e hematogênicas atingindo órgãos como fígado e baço. Em experimentos mimetizando a distribuição de *P. brasiliensis* através do sangue, tem sido observada uma indução de transcritos envolvidos no controle e sinalização a alta osmolaridade, sugerindo que durante desenvolvimento da doença as células

leveduriformes são também expostas a condições de estresse osmótico (Bailão *et al.* 2006, 2007).

Portanto, durante todo o ciclo de vida de *P. brasiliensis*, o fungo pode ser exposto a diferentes condições de estresse (estresse oxidativo, choque térmico e estresse osmótico), promovendo a formação de EROs e induzindo nas células do fungo uma condição altamente oxidante. A habilidade de resistir as EROs é predita como um importante mecanismo para estabelecimento da infecção de fungos patogênicos; sendo as catalases enzimas envolvidas na proteção dos fungos contra a ação oxidante dos peróxidos, estas proteínas podem ser consideradas importantes candidatas envolvidas na virulência de *P. brasiliensis* (Pereira *et al.*, 2009).

Diversas proteínas têm sido caracterizadas como possíveis antígenos imunodominantes em *P. brasiliensis*. Objetivando identificar novos antígenos do fungo através de ensaios imunoproteômicos, Fonseca *et al.* (2001) observaram a presença de uma catalase de 61 kDa e *pI* de 6.2 reativa com soros de pacientes com PCM. O novo antígeno (*PbCATP*) caracterizado apresentou alta homologia a catalases monofuncionais de subunidade pequena com motivo de endereçamento aos peroxissomos, PTS-1. *PbCATP* mostrou-se mais expressa em células de levedura, sendo regulada durante a transição morfológica do fungo. Na presença de concentrações crescentes de H₂O₂, *PbCATP* apresentou um perfil de expressão aumentado, sugerindo que a proteína responde ao tratamento de agentes indutores de estresse oxidativo (Moreira *et al.*, 2004).

Adicionalmente, durante o processo de transição de micélio para levedura em *P. brasiliensis*, uma série de genes envolvidos na manutenção do potencial redox intracelular e na proteção contra o estresse oxidativo mostrou-se induzidos. As análises sugerem que um estado altamente oxidante pode ser formado durante a diferenciação celular de *P. brasiliensis*, sugerindo que os sistemas antioxidantes no fungo possam ser

importantes, não somente para sobrevivência em macrófagos, mas também na proteção de EROs geradas durante a transição morfogenética (Nunes *et al.*, 2005). Bastos *et al.* (2007) identificaram transcritos relacionados à proteção de *P. brasiliensis* à EROs durante a transição dimórfica do fungo. O transcrito codificante para catalase P de *P. brasiliensis* foi induzido nesta condição, sendo classificado como um possível fator de virulência do fungo, visto que a proteína pode estar envolvida na proteção ao H₂O₂ durante a transição.

Em condições de infecções superficiais *P. brasiliensis* pode ser exposto ao plasma humano. Para mimetizar o processo de infecção superficial do fungo, Bailão *et al.* (2007) avaliaram o perfil de expressão dos genes de *P. brasiliensis* na presença de plasma humano. As análises mostraram que todos os genes codificantes de enzimas envolvidas no processo de β -oxidação foram induzidos durante o tratamento. Uma destas enzimas altamente expressas é a flavoproteína desidrogenase relacionada à β -oxidação em peroxissomos, onde promove a transferência de elétrons diretamente para o oxigênio produzindo H₂O₂. Nessa condição, o H₂O₂ poderia ser removido dos peroxissomos pela catalase A de *P. brasiliensis*, uma vez que a proteína mostrou-se induzida durante incubação de células de leveduras em plasma humano (Bailão *et al.*, 2007).

JUSTIFICATIVAS

OBJETIVOS

2 – JUSTIFICATIVA

A Paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença que apresenta grande importância para a saúde coletiva, pois se relaciona a custos sociais e econômicos, derivados não apenas de seu caráter endêmico e da atividade da doença, mas também por afetar indivíduos em fase produtiva e por deixar seqüelas secundárias.

Fungos patogênicos contam com mecanismos de defesa antioxidantes para proteção contra o estresse oxidativo. Os mecanismos de defesa estão envolvidos na adaptação do crescimento em um ambiente aeróbico, na utilização da fosforilação oxidativa para produção de energia, na proteção contra oxidantes exógenos e dos radicais tóxicos de oxigênio produzidos durante o processo de fagocitose.

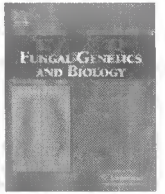
Apesar de *P. brasiliensis* apresentar um complexo sistema antioxidante, pouco se tem discutido a respeito dos mecanismos de regulação e resposta ao estresse oxidativo no fungo. O Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Goiás está inserido em um programa que visa à identificação, caracterização e estudo funcional de moléculas potencialmente associadas à interação de *P. brasiliensis* ao hospedeiro humano. As EROs, em particular o H_2O_2 , participam de mecanismos oxidativos fungicidas, que são produzidos pelas células efetoras do hospedeiro em resposta a infecção por *P. brasiliensis*. Neste contexto, a produção de catalases é umas das estratégias utilizadas pelo fungo na proteção as EROs produzidas durante o curso da infecção.

No intuito de se obter um melhor entendimento a respeito da biologia do fungo e compreender as respostas do mesmo a condições altamente oxidantes, este estudo visa identificar as diferentes espécies da família de catalases de *P. brasiliensis* e analisar o perfil de expressão das proteínas em células submetidas a diversas condições de estresse e durante o processo de transição dimórfica do fungo.

3– OBJETIVOS

- 1- Detectar e avaliar o perfil de expressão das catalases de *P. brasiliensis* em levedura e micélio utilizando géis de atividade para catalases.
- 2- Analisar a expressão das catalases do fungo sob condições de estresse oxidativo exógeno e endógeno, em resposta ao estresse osmótico e choque térmico.
- 3- Avaliar a expressão das catalases do fungo durante a diferenciação celular de micélio para levedura.
- 4- Promover estratégias de purificação, para obtenção da catalase peroxissomal de *P. brasiliensis* (*PbCATP*).
- 5- Realizar ensaios de atividade enzimática para caracterização da catalase purificada.
- 6- Analisar a resistência enzimática da *PbCATP* purificada a agentes desnaturantes e a diferentes inibidores específicos para catalases.

MANUSCRITOS



The catalases of *Paracoccidioides brasiliensis* are differentially regulated: Protein activity and transcript analysis

Ronney Fernandes Chagas^a, Alexandre Melo Bailão^a, Maristela Pereira^a, Michael S. Winters^b, Alan George Smullian^b, George S. Deepe Jr.^b, 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 University of Cincinnati, College of Medicine, Cincinnati, OH, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 April 2008

Accepted 22 August 2008

Available online 30 August 2008

Keywords:

Paracoccidioides brasiliensis

Catalases A, P and C

Mycelium to yeast transition

Infection

Oxidative stress

ABSTRACT

Paracoccidioides brasiliensis is a fungal pathogen of humans. The *P. brasiliensis* response to oxidative stress is largely unexplored. We report the analysis of three catalases, *PbCatA*, *PbCatP* and *PbCatC*. The former are monofunctional catalases and the latter is a catalase-peroxidase. Differential expression of catalases as measured by activity and by quantitative analysis of transcripts was observed in the morphological conversion and in response to different stress conditions. *PbCatA* manifested higher activity in the mycelial phase, showed increased activity during transition from mycelium to yeast and during conditions of endogenous oxidative stress. Consistent with our previous studies, *PbCatP* manifested higher activity in yeast cells since it is putatively involved in the control of exogenous reactive oxygen species. *P. brasiliensis* displays an oxidative stress response following phagocytosis by macrophages, inducing the expression of catalase A and P transcripts. *PbCatC* displayed a relatively constant pattern of expression, being modestly induced in cells exposed to osmotic and heat stress.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Paracoccidioides brasiliensis is an important fungal pathogen located predominantly in Central and South America. The fungus is the causative agent of paracoccidioidomycosis (PCM). At room temperature, *P. brasiliensis* takes the form of filamentous mold (mycelia). The main route for infection is by inhalation of airborne fungal propagules. Generation of infectious arthrospores during fungal growth has been well documented (Bustamonte-Simon et al., 1985). Upon elevation of temperature to that of the mammalian body, the fungus adopts a yeast-like form that is associated with its pathogenic lifestyle (Restrepo et al., 2001).

Fungi, like many other organisms, rely on antioxidant defense mechanisms for protection against oxidative damage (Giles et al., 2006). A prerequisite for the success of human pathogenic fungus is their ability to defend against reactive oxygen species (ROS) elicited by host cells in the course of an infection. ROS are extremely reactive and cause damage of cellular constituents, including DNA, proteins, lipids, leading to cellular death (Halliwell and Gutteridge, 1999). Organisms have therefore developed a series of antioxidant defense mechanisms to maintain and protect the cells against oxidative damage. Several genes encoding molecules in-

involved in antioxidant defense have been identified in *P. brasiliensis*, such as those encoding for superoxide dismutase, peroxiredoxin, peroxidases, thioredoxin and catalases (Moreira et al., 2004; Campos et al., 2005).

Several families evolved in the ancestral genomes capable of H₂O₂ dismutation. The most abundant are heme-containing enzymes that are divided in two main groups, typical or monofunctional catalases (E.C. 1.11.1.6) and catalase-peroxidases; both types of heme enzymes exhibit high catalase activities (Zamocky et al., 2007). The proteins contribute to the pathogenesis of several microorganisms, including fungi as the oxidative stress response in the virulence of fungi has been emphasized by the observation that mutations that inactivate such responses attenuate the virulence of the pathogens (Wysong et al., 1998; Paris et al., 2003).

Our laboratory had previously characterized a small-subunit monofunctional catalase in *P. brasiliensis*, named catalase P (*PbCatP*). The protein was characterized as an immunodominant antigen of *P. brasiliensis* reacting with sera from PCM patients (Fonseca et al., 2001). *PbCatP* is expressed at high levels in the fungus yeast phase and is positively regulated in the transition from mycelium to yeast and in contact of the cells with H₂O₂ (Moreira et al., 2004). Additionally, some oxidative stress functions are induced when *P. brasiliensis* is induced to differentiate to yeast cells (Bastos et al., 2007), when yeast cells are exposed to human plasma (Bailão et al., 2007), or when yeast cells infect macrophages (Silva et al., 2007). This observation is consistent with the idea that *P. brasiliensis*

* Corresponding author. Fax: +55 62 35211110.

E-mail address: celia@icb.ufg.br (C.M. de Almeida Soares).

must cope with reactive oxygen species in the course of development and infection.

In the present study we sought to identify novel classes of *P. brasiliensis* catalases and to elucidate the contribution of such molecules to the *P. brasiliensis* antioxidant defense system. We characterized three members of the *P. brasiliensis* catalase family that are differentially expressed on dependence of the stress condition. Our results are consistent with the hypothesis that *PbCatA* can mainly play a role in the protection of *P. brasiliensis* against endogenous stress, while *PbCatP* could preferentially protect fungal cells against exogenous stress. The complete cDNA sequence of the *PbCATA* was obtained.

2. Materials and methods

2.1. Cloning of the cDNA encoding catalase A and sequence analysis

A *P. brasiliensis* yeast cells cDNA library was constructed in EcoRI and XhoI sites of λ ZapII (Stratagene, La Jolla, CA, USA), as described (Moreira et al., 2004). The screening of the library was performed using a partial cDNA encoding catalase A obtained from a cDNA library of yeast cells treated with human plasma (Baillão et al., 2007). Plating 5×10^6 plaque forming units (p.f.u), DNA transfer to membranes and hybridization were performed as described in standard procedures (Sambrook and Russel, 2001). Two positive clones were obtained and phage particles were released from the plaques. DNA sequencing was performed by the double-strand dideoxy-chain termination method (Sanger et al., 1977) by using a Mega BACE 1000 sequencer (GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK) for automated sequence analysis. The cDNA was translated and compared to all non-redundant polypeptides in the translated NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) database. The alignment of *PbCATA* with other catalases from fungi was generated with Clustal X software (<http://www.ebi.ac.uk/clustalx/>). The PROSITE (<http://www.us.expasy.org/prosite>), Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/sftwer/pfam/index.shtml>) and Sprint ([\[www.sbs.man.ac.uk/dbbrowser/sprint/\]\(http://www.sbs.man.ac.uk/dbbrowser/sprint/\)\) algorithms were used for the analysis of the deduced protein.](http://</p>
</div>
<div data-bbox=)

The complete cDNA (*PbCATA*) presents 2619 nucleotides (Fig. 1, Supplementary material). The open reading frame is 2277 bp in length and codes for a 759 amino acids protein (GenBank Accession No. AAR87484).

Appreciable sequence similarities were found between the predicted ORF product and known catalases A, as shown in Supplementary Fig. 1. The translated amino acid sequence predicted a protein with a molecular mass of 84 kDa and pI of 6.12. Sequence analysis of the deduced *P. brasiliensis* *PbCatA*, revealed the seven-element fingerprint of the catalase protein family. Foremost, both catalase consensus patterns are present: the active site at position 82–98 and at position 390–398 the proximal heme binding signature. Canonical motifs of catalases are depicted in Fig. 1, Supplementary material.

2.2. *Paracoccidioides brasiliensis* isolate and growth conditions and cellular extracts preparation

The *P. brasiliensis* isolate *Pb01* (ATCC MYA-826) has been investigated by our laboratory and was cultivated in Fava-Neto's medium (1% w/v peptone, 0.5% w/v yeast extract, 0.3% w/v proteose peptone, 0.5% w/v beef extract, 0.5% w/v NaCl, 1% w/v agar, pH 7.2) at 36 °C for the yeast form and at 22 °C for the mycelium phase. For some experiments the fungal cells were transferred to the medium of McVeigh and Morton (MMcM) with modifications (15.0 mM glucose, 10.0 mM MgSO₄, 29.4 mM KH₂PO₄, 13.0 mM glycine, 3.0 μ M vitamin B1, pH 6.3) (Restrepo and Jiménez, 1980) or YPD medium (0.5% w/v yeast extract, 0.5% w/v casein peptone and 1.5% w/v glucose, pH 6.3). The cellular extracts were prepared as described (Fonseca et al., 2001). Yeast and mycelium protein crude extracts were obtained by disruption of frozen cells in the presence of proteases inhibitors *N*- α -*p*-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK) (50 μ g/mL), 4-chloromercuribenzoic acid (1 mM), leupeptin (20 mM), phenylmethylsulfonyl fluoride (20 mM) and

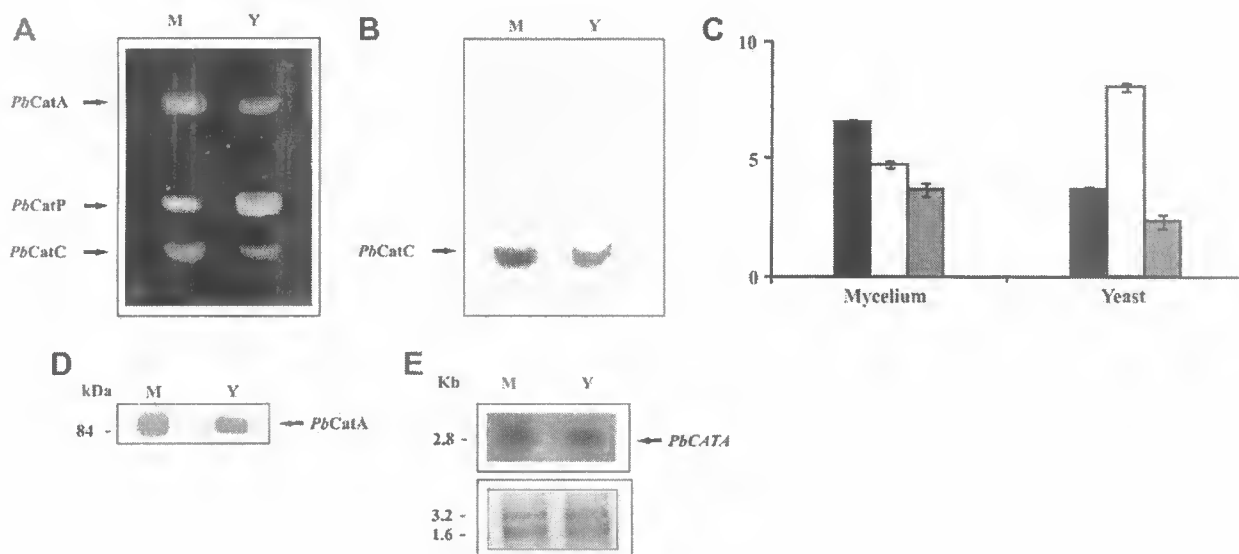


Fig. 1. Expression analysis of catalases in *P. brasiliensis*. (A) Activity of catalases in *P. brasiliensis* mycelium and yeast cells. Protein extracts from mycelium (M) and yeast (Y), 30 μ g, were separated on a 10% acrylamide gel under nondenaturing conditions. Catalase activity was visualized by potassium ferricyanide-negative staining. (B) Catalase-peroxidase expression was visualized by reaction to *o*-dianisidine substrate. (C) Catalase expression was quantified. Three catalase species were detected, *PbCatA* (black), *PbCatP* (white) and *PbCatC* (gray). Bars represent the standard deviation of three independent experiments. (D) Western-blot analysis of *P. brasiliensis* protein extracts. Protein extracts from mycelium (M) and yeast (Y) were obtained and equal amounts (30 μ g) were fractionated on a 10% SDS-PAGE, blotted to a membrane and detected by using the antibody anti-Cat 1 of *N. crassa* (1:6000 diluted). (E) Northern blot analysis of *PbCATA* transcript. Ten micrograms of total RNA from mycelium (M) and yeast (Y) was fractionated and hybridized to the complete cDNA of catalase A. The rRNAs from the ethidium-bromide stained agarose gel were used for the loading control.

iodoacetamine (5 mM) in homogenization buffer (2 mM CaCl₂, 20 mM Tris-HCl, pH 8.8).

2.3. Western blot analysis

Protein extracts were obtained from *P. brasiliensis* yeast cells and mycelium grown under standard conditions. SDS-PAGE was performed with 10% polyacrylamide gels. The protein extracts were electrophoresed and transferred to membrane. The membrane was incubated in 0.05% (v/v) Tween 20 plus Tris-buffered saline (TBS) containing 1% (w/v) dry fat milk and were then incubated with a polyclonal antibody raised to the catalase 1 (homologous of catalase A) of *Neurospora crassa* (Schliebs et al., 2006). The secondary antibody was anti-rabbit IgG alkaline phosphatase coupled. For in-gel-activity analysis, control reactions were performed with the polyclonal antibody anti glyceraldehyde-3-phosphate (PbGapdh) of *P. brasiliensis* (Barbosa et al., 2004, 2006); and the secondary antibody anti-rabbit IgG, alkaline phosphatase coupled (1:3000 diluted). Reactions were developed by using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate and nitroblue tetrazolium (BCIP/NBT).

2.4. Isolation of RNA and Northern blotting

Total RNA was isolated from mechanically disrupted yeast and mycelium cells by vortexing with glass beads for 10 min in the presence of TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA), according to the instructions provided by the manufacturer. Contaminating DNA in the RNA preparations was digested with RNase-free DNase I (Promega, Madison, WI). Standard conditions were used for electrophoresis and Northern blotting (Sambrook and Russel, 2001) carried out with 10 µg of total RNA per lane. Hybridizations were performed with RNAs fractioned on a 1.2% agarose-formaldehyde denaturing gel and transferred to a Hybond-N+ nylon membrane (GE Healthcare). The RNAs were hybridized to the correspondent insert of the cDNA encoding catalase A (*PbCATA*) in Rapid-hyb buffer (GE Healthcare) and washed according to the manufacturer's instructions.

2.5. Enzymatic determination of catalase activity

Catalase activity was measured by reduction of the absorbance during the conversion of the hydrogen peroxide to oxygen (Aebi, 1984). Briefly, catalase-catalyzed decomposition of H₂O₂ was monitored by the decrease in the absorbance at 240 nm, utilizing the extinction coefficient of 39.40 M⁻¹ cm⁻¹. The extinction coefficient was calculated through a standard curve generated by increasing concentrations of hydrogen peroxide (1–10 mM) and monitored at 240 nm. One unit of activity was defined as the amount of enzyme that catalyzed the consumption of 1 µmol of H₂O₂ per min under these standard conditions.

2.6. Semi-quantitative determination of catalase activity on polyacrylamide gels

A ferricyanide-negative stain was used to locate catalase species on native polyacrylamide gels according to Woodbury et al. (1971). In brief, samples were separated on native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) with loading of 30 µg of protein in each lane. Electrophoresis was run at 200 V for 6 h, at 4 °C. Catalase activity was determined by incubating the gel for 10 min in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.2 (PB buffer), containing 10 mM of H₂O₂. The gel was rinsed three times with water and incubated in a mixture (v/v) of freshly prepared potassium ferricyanide (1.0%, w/v) and ferric chloride (1.0%, w/v). Upon emergence of the unstained catalase bands, reactions were stopped by washing the gels with water. Additionally, protein loading in samples was normalized

for the control protein *PbGapdh*, as described above. Images were acquired and the catalase expression was quantified for differences on catalases areas in three independent experiments using the program Scion Image for Windows (<http://www.scioncorp.com>). Due to the exceedingly rapid kinetics of the reaction and to the nature of this enzymatic reaction that could result in measuring areas of saturated activity, triplicate experiments were performed using several concentrations of total proteins (from 10 to 50 µg) to analyze catalases expression. The negative image of catalase staining and its reverse image were used to measure the areas of catalase activity.

2.7. Special staining for peroxidase

After SDS-PAGE the gel was soaked in 0.01 M potassium phosphate buffer (pH 7.2) containing 2 mM *o*-dianisidine for 1 h at room temperature. The gel was equilibrated in 0.01 M potassium phosphate buffer (pH 7.2) containing 2 mM diaminobenzidine and 0.1 mM H₂O₂ for 15 min (Misra and Fridovich (1977)).

2.8. Measurement of *P. brasiliensis* catalase activity under conditions of oxidative, osmotic and heat shock stress

To evaluate the activity of catalases under conditions of exogenous oxidative stress, yeast cells were incubated for 1 h in PB buffer with different concentrations of H₂O₂: 0.25, 0.5, 1.0 and 2.0 mM. To assess fungal survival during the incubation with H₂O₂, yeast cells were cultivated in PB buffer supplemented in several concentration of H₂O₂ for 1 and 6 h. Additionally it was performed a time-course determination of yeast cells viability in the presence of 2 mM H₂O₂. The analysis of fungal viability was performed with Trypan blue staining. The expression of catalases under endogenous oxidative stress conditions was analyzed in yeast cells and mycelium after growth for 12 h in MMcM medium, supplemented with 2% (w/v) of glucose or 2 mM of oleic acid as the sole carbon and energy sources. After each treatment the cells were processed and the protein extract was prepared as described above. The catalase activity was visualized on native polyacrylamide gels. For osmotic stress treatments of *P. brasiliensis*, yeast and mycelium, were incubated in YPD medium supplemented with 1.5 M KCl, 1.0 M NaCl and 1.0 M Sorbitol to analyze the cell response to osmotic stress. After incubation for 6 h, total protein was obtained and loaded in a nondenaturing PAGE to analyze catalase activity. In order to analyze the activity of catalases in heat shock conditions, yeast cells were cultivated in YPD medium at 36 °C for 4 days and shifted to 42 °C for 30 and 60 min. Aliquots were obtained and the catalase activity was assayed.

2.9. Expression of catalases during mycelium to yeast differentiation of *P. brasiliensis*

Equivalent amounts of mycelium cultures (1.5 g) were grown for 4 days in YPD medium at 22 °C. The cultures were then shifted to 36 °C for temperature-induced phase transition. Cultures were collected at 1–14 days after the temperature shift. The expression of catalases was analyzed by nondenaturing PAGE. Quantitative real-time RT-PCRs (qRT-PCR) were used to investigate the transcript levels.

2.10. Preparation and infection of murine macrophages

Bone marrow-derived macrophages were obtained by flushing the femurs of 4–12 weeks old female C57BL/6 mice, as previously described by Fortier and Falk (2001). The prepared cells were cultured at 37 °C under 6% CO₂ in RPMI 1640 (Biowhittaker, Walkersville, Md.) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS),

1% (w/v) L-glutamine, 5×10^{-5} M of 2-mercaptoethanol, 100 ng/mL of granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) and 10 μ g of gentamicin per mL. After 8 days the non-adherent cells were discarded and the adherent cells were washed twice with 10 mL of Hank's Balanced Salt Solution (HBSS). The cells were treated with 10 μ g/mL of dispase (Invitrogen) in HBSS at 37 °C for 5 min. Further, macrophages were removed using a cell scraper and washed in HBSS. Cells were centrifuged at 500g for 5 min, and resuspended in RPMI 1640 (supplemented as describe above, minus GM-CSF) at a concentration of 1×10^6 cells per mL. For infection experiments, 1×10^7 *P. brasiliensis* yeast cells were added to 2 mL of macrophage suspension plated in 6 well plates. After 24 h of co-cultivation at 37 °C in 6% CO₂, the wells were washed twice with HBSS to remove unattached yeast forms. RNA from infected murine macrophages was extracted by using Trizol reagent. RNAs from uninfected macrophages and from *P. brasiliensis* grown in RPMI 1640 were obtained as controls.

2.11. Quantitative real-time RT-PCR

RNA samples were reverse transcribed using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) and oligo(dT)15 primer. cDNA samples were diluted 1:5 in water, and qRT-PCR was performed using SYBR green PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) in the Applied Biosystems 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems). Quantitative RT-PCR was performed in triplicate for each cDNA sample. The specificity of each primer pair for the target cDNA was confirmed by the visualization of a single PCR product in agarose gel electrophoresis. The primers and sequences used were as follows: for *PbCATP* the oligonucleotides were constructed on basis on the sequence deposited on GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) Accession No. AF428076: sense, 5'-AGG TGCAGGAGCTTACGGTG-3'; antisense, 5'-CCCAATTCCTGCTCGG TG-3'. For *PbCATA* the oligonucleotides were based on the sequence characterized in this work and deposited in GenBank database under Accession No. AAR87484: sense, 5'-CGCCTGCTCCT TTCACCACC-3'; antisense, 5'-GCACCTGTTCTCCTCGAGCATG-3'. The controls were performed with α -tubulin primers: sense, 5'-ACAG TGCTTGGGAAGTATAACC-3'; antisense, 5'-GGACATATTTGCCACTGCC A-3', constructed on basis on the sequence available at <http://www.lbm.icb.ufg.br/phorestwww/index.php>. The annealing temperatures for *PbCATP*, *PbCATA* and tubulin primers were 57, 62, and 57 °C, respectively. The standard curves were generated using the target fragments cloned into pCR2.1-TOPO (Invitrogen). The plasmids were diluted 1:1000, and a standard curve was generated using five samples, serially diluted 1:4 from the original dilution.

The relative expression levels of genes of interest were calculated using the standard curve method for relative quantification (Bookout et al., 2006).

3. Results

3.1. Detection and activity of the *P. brasiliensis* catalases in yeast and mycelium

We detected the presence of three catalases (*PbCatA*, *PbCatP* and *PbCatC*) in crude cell extracts. The activity was visualized by the degradation of H₂O₂ in the gel. Catalase activity was analyzed using different concentrations of protein extracts, as shown in Fig. 2, Supplementary material.

The proteins demonstrated different profiles of migration (Fig. 1A). Mass spectrometry analysis confirmed the position in gels of *PbCatP* that has been purified by gel filtration chromatography after treatment of yeast cells with hydrogen peroxide. The purified fraction was resolved by two-dimensional gel electrophoresis, and *PbCatP* sequences were detected from trypsin-digested peptides (data not shown). The *PbCatA* was highly expressed in the mycelial phase; *PbCatP* migrated faster than *PbCatA* and manifested high expression in yeast cells, as demonstrated previously by Western blot assays in our laboratory (Moreira et al., 2004). A third catalase was detected under these conditions, which we named, *PbCatC*. It migrated faster than *PbCatP* and was more abundant in mycelial than in yeast cells. This species was defined as a catalase-peroxidase, as demonstrated when staining specifically for peroxidase (Fig. 1B). Quantification of activities is shown in Fig. 1C. The *PbCatA* protein level was assessed by Western blotting of total protein extracts from mycelium and yeast cells, corroborating the higher protein activity in mycelium, when compared to yeast cells (Fig. 1D). By Northern blot analysis, *PbCATA* was expressed more abundantly in mycelium as compared to yeast cells (Fig. 1E). The preferential expression of *PbCatP* and the cognate transcript in yeast cells has been previously demonstrated (Moreira et al., 2004).

3.2. Catalases activity under oxidative exogenous and endogenous stress conditions

To determine the effect of oxidative stress in the activity of catalases of *P. brasiliensis*, yeast fungal cells were treated with different concentrations of H₂O₂ to provide exogenous oxidative stress. In yeast cells (Fig. 2A and B), expression of *PbCatP* directly correlated with the concentration of H₂O₂. In the presence of

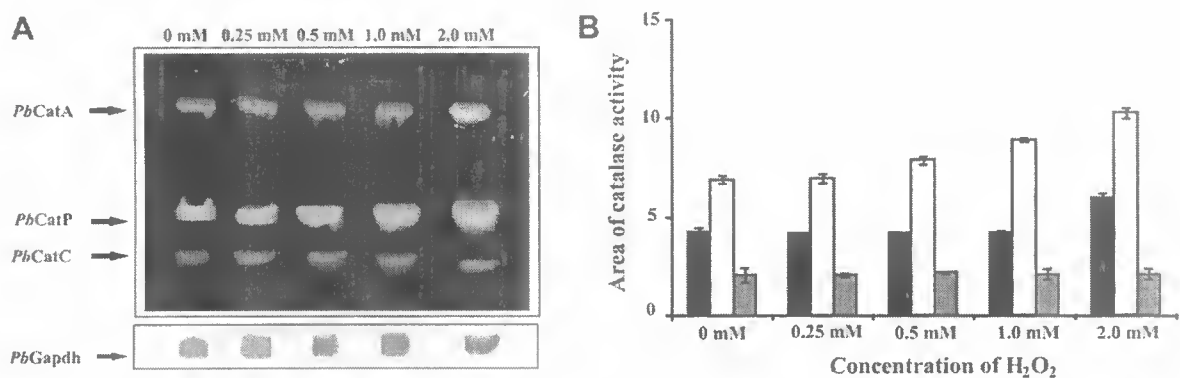


Fig. 2. *Paracoccidioides brasiliensis* catalases activity under conditions of exogenous oxidative stress. Yeast cells were incubated for 1 h in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.2) with the concentrations of H₂O₂, from 0.25 to 2.0 mM. (A) Upper panel: samples with equal amounts of proteins (30 μ g) were separated by nondenaturing PAGE and analyzed for catalase in-gel-activity. Lower panel: Western blot analysis of the protein extracts with the polyclonal antibody anti-Gapdh of *P. brasiliensis*, as loading control. (B) Catalase expression was quantified. The three catalases are indicated, as described in Fig. 1.

H₂O₂, *PbCatA* activity slightly increased while that of *PbCatC* remained unchanged. As demonstrated in Fig. 3, Supplementary material, the specific activity of total catalases remains unchanged from 1 to 4 h of hydrogen peroxide treatment (2 mM). The viability of yeast cells did not change at 2 mM of H₂O₂, as demonstrated in Fig. 4, Supplementary material.

Reactive oxygen species are produced during β -oxidation of short-, medium-, and long-chain fatty acids in the mitochondria and during β -oxidation chain shortening of long-chain fatty acids in the peroxisomes (Van den Branden et al., 1984; Maggior-Hall and Keller, 2004). To analyze if catalase activity was induced under conditions of endogenous stress, we compared the expression of *P. brasiliensis* catalases in cells growing in the presence of glucose and oleic acid, as the only carbon and energy sources. In the presence of oleic acid, the dependency on β -oxidation and respiration for energy production would be expected to result in increased levels of endogenous reactive oxygen species. We observed that in both yeast cells and mycelia the activity of *PbCatA* increased when the fungus was grown under endogenous oxidative stress, i.e. in oleic acid; *PbCatP* and *PbCatC* demonstrated no alteration in activity under these conditions (Fig. 3A–D).

3.3. Activity of the *P. brasiliensis* catalases in response to osmotic stress

Cells subjected to an osmotic shock can suffer loss of water and alteration in intracellular turgor (Hohmann, 2002). This condition can lead to generation of ROS in response to changes of the redox state of the cell. To explore if the osmotic stress promotes an increase in *P. brasiliensis* catalases activity, yeast and

mycelium cells were cultivated in YPD supplemented with the ionic osmotic stress agents KCl (1.5 M), NaCl (1.0 M) and the non-ionic osmotic stress agent, sorbitol (1.0 M). As shown in Fig. 4A–D, *PbCatC* exhibited a striking increase in activity under osmotic stress conditions when compared to control in both, yeast and mycelium. *PbCatA* and *PbCatP* activities were unchanged during osmotic stress.

3.4. Evaluation of catalase activity during heat shock stress

Yeast cells increased expression of *PbCatC* at 30 and 60 min following induction of heat stress (Fig. 5A and B). The activity of *PbCatA* and *PbCatP* remained unchanged.

3.5. Evaluation of catalases activity during mycelium to yeast transition in *P. brasiliensis*

A temperature shift from 22 to 36 °C is known to trigger the transition from mycelium to yeast in *P. brasiliensis*. To determine if catalase activity was modulated by morphological differentiation, we exposed mycelia to 36 °C and visualized catalase activity at 0 h, 1 day, 2 days, 5 days, 8 days, 10 days, 12 days and 14 days following temperature shift (Fig. 6A and B). *PbCatA* activity increased transiently during phase transition, with increasing activity from 1 day to 8 days after the temperature shift and with a subsequent reduction in activity (Fig. 6A and B). *PbCatP* also had a gradual increase in activity during the cellular differentiation, reaching high levels as the cells adopt the yeast form. *PbCatC* expression demonstrated a small decrease at the end of the differentiation process (Fig. 6A and B).

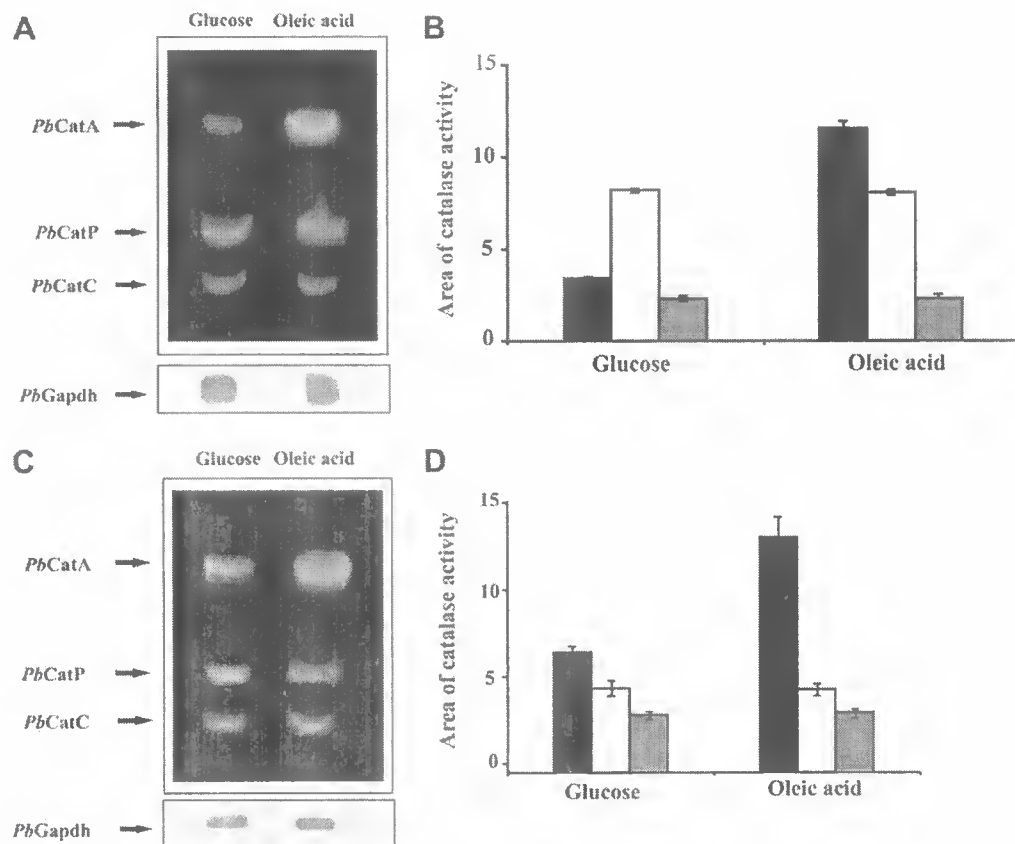


Fig. 3. Changes in the *P. brasiliensis* catalases activity under conditions of endogenous oxidative stress. Yeast cells (A) and mycelium (C) were incubated in minimal media containing 2% glucose or 2 mM oleic acid. After growth for 12 h, the cells were washed and the obtained cell extracts (30 μ g each lane) were examined by native PAGE and stained for catalase activity. The lower panels represent the loading control performed with *PbGapdh*. (B and D) Catalases expression was quantified, as described in Fig. 1.

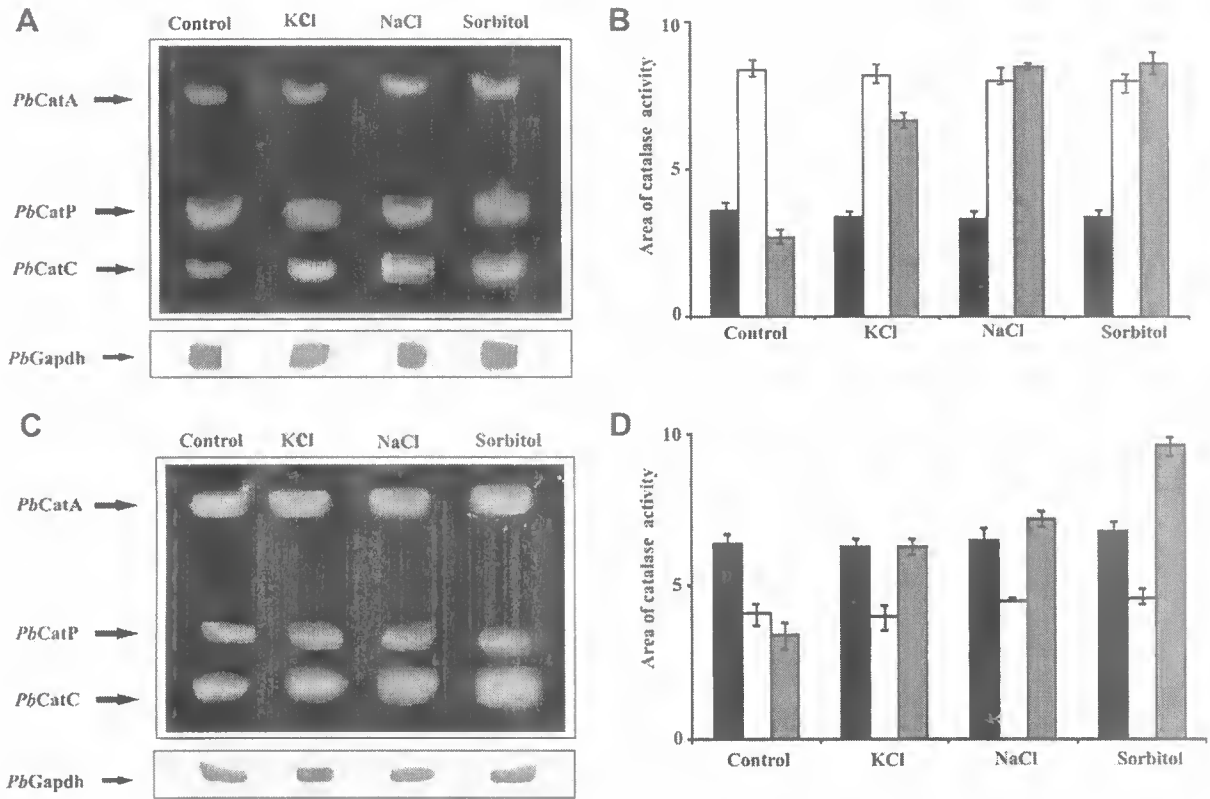


Fig. 4. Activity of catalases in *P. brasiliensis* cells submitted to osmotic stress conditions. Yeast cells (A) and mycelium (C) were grown in YPD medium or YPD medium supplemented with 1.5 M KCl, 1.0 M NaCl and 1.0 M Sorbitol. After 6 h, the cellular extracts were obtained and native polyacrylamide gel electrophoresis was performed. The lower panels in A and C represent the loading control. (B and D) Catalase expression was quantified, as described in Fig. 1.

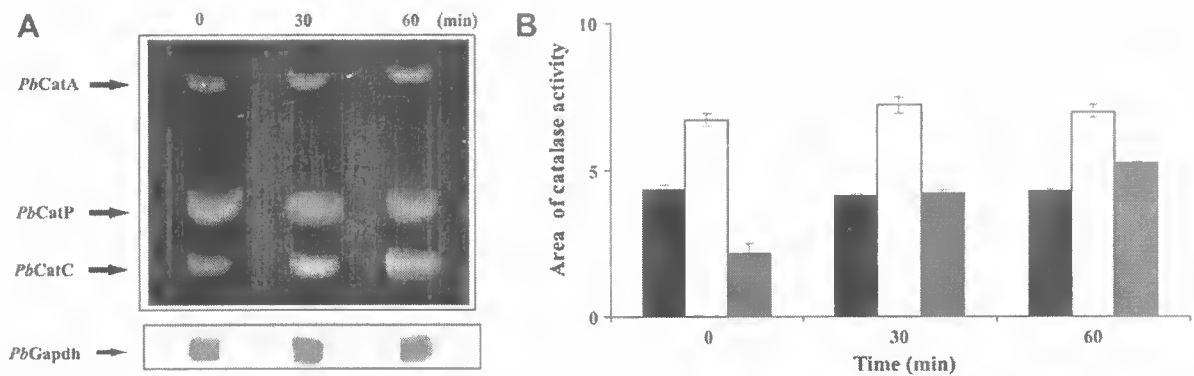


Fig. 5. Activity of catalases during heat shock stress. Yeast cells were submitted to heat shock at 42 °C for 30 and 60 min for protein extraction. (A) The catalases activity was analyzed. Lower panel represents the protein loading control with *PbGapdh*. (B) Quantification of catalases was performed, as described in Fig. 1.

3.6. Expression of the *P. brasiliensis* *PbCATA* and *PbCATP* transcripts during phase transition and in yeast cells infecting murine macrophages

Quantitative RT-PCR analysis of *PbCATA* and *PbCATP* were used to confirm the expression level in the fungal transition of phases, as well as, during macrophage infection by *P. brasiliensis* yeast cells. The complete sequences encoding *PbCatA* (this work) and *PbCatP* (Moreira et al., 2004) had been obtained and utilized to design primers in regions specific to each *P. brasiliensis* catalases and with limited homology to the catalases of macrophages (data not shown). *PbCATA* and *PbCATP* transcripts were increased during transition from mycelium to yeast in agreement to the proteins in gel-activity (Fig. 6C–D). The results also demonstrated that

expression of *PbCATA* and *PbCATP* are up regulated in yeast cells during infection of macrophages (Fig. 7A and B, respectively) strongly suggesting a role for these proteins in the response to the oxidative killing mechanism by the host macrophage system.

3.7. An overview of the *P. brasiliensis* catalases expression in response to endogenous and exogenous stresses

As summarized in Table 1, a common theme of the regulation of *P. brasiliensis* catalases seems to be induction of some species under particular conditions. Particularly noteworthy is the *PbCatP*, whose expression is preferentially correlated to exogenous oxidative stress. On the other hand, expression of *PbCatA* appears to be mainly correlated to endogenous stress. Both species are in-

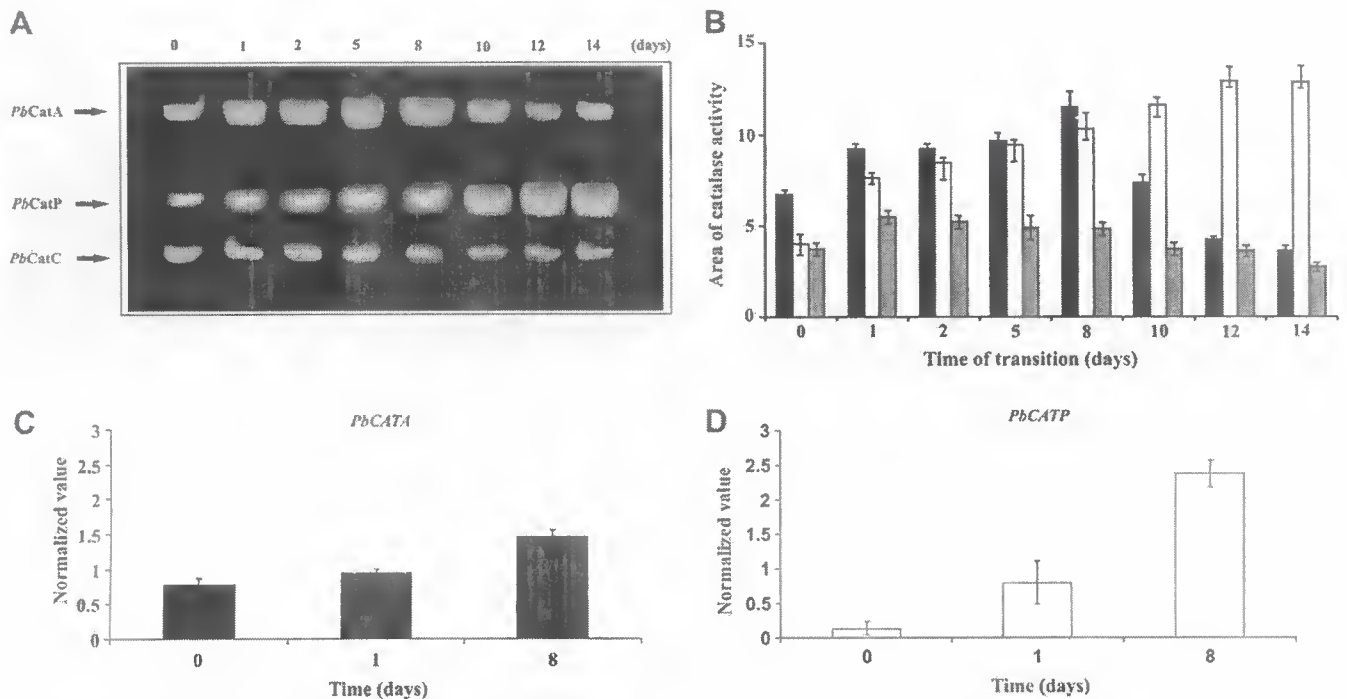


Fig. 6. Activity of catalases and expression of the cognate transcripts during mycelium to yeast differentiation of *P. brasiliensis*. Mycelia were induced to undergo morphological transformation by changing the temperature of incubation from 22 to 36 °C. (A) The catalases activity was analyzed in nondenaturing PAGE using samples collected at different times of transition. (B) Catalases activity was quantified, as described in Fig. 1. (C and D) analysis of *PbCATA* and *PbCATP* transcripts, respectively, during transition. The catalases transcripts *PbCATA* (black) and *PbCATP* (white) are indicated. Bars indicate the standard deviation of three independent experiments.

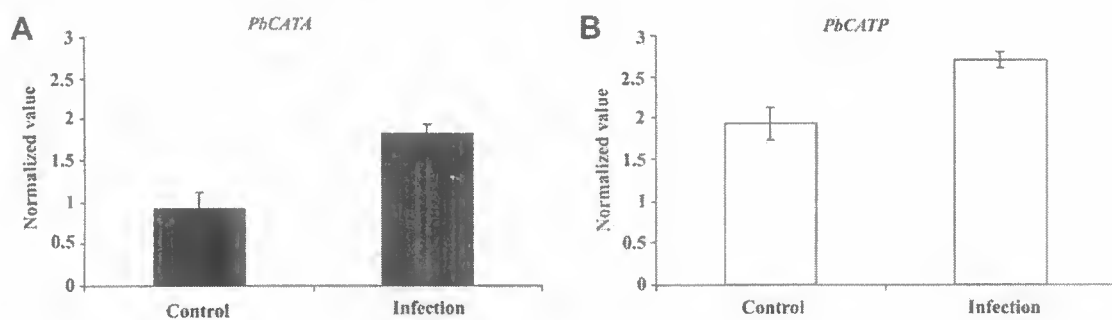


Fig. 7. Analysis of the *PbCATA* and *PbCATP* transcripts by quantitative real-time RT-PCR in an *ex vivo* model of infection. Bone marrow-derived macrophages were obtained by flushing the femurs of 4–12 weeks old female C57BL/6 mice. 1×10^7 *P. brasiliensis* yeast cells were added to 2 mL of macrophage suspension at 37 °C in 6% CO₂. After the co-cultivation the RNA of infected murine macrophages was extracted and qRT-PCRs were performed to verify the expression of *PbCATA* and *PbCATP* transcripts in infection. Expression of the catalases was standardized to expression of α -tubulin. The catalases *PbCATA* (black) and *PbCATP* (white) are indicated. Bars indicate the standard deviation of three different experiments.

duced during transition from fungal mycelium to yeast cells, suggesting an increase in ROS in that condition.

4. Discussion

ESTs have been obtained for the isolate *Pb01* transcriptome projects (<http://dna.biomol.unb.br/Pb>; <http://www.lbm.icb.ufg.br/phorestwww/index.php>). A search for deduced catalases in those ESTs and in public databases allowed the identification of two expressed monofunctional catalases, *PbCatA* and *PbCatP* (Moreira et al., 2004; Felipe et al., 2005; Bastos et al., 2007; Costa et al., 2007). Three monofunctional catalases, A, B and P, and at least two bifunctional catalases were found in the genome developed by the Broad Institute (http://www.brosd.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis.1/MultiHome.html).

According to our data there are three distinct activities of catalase detectable in native gels. All three enzymes were clearly

discernible under multiple conditions. The catalase running most slowly in the native polyacrylamide gel was designated as *PbCatA*, since it is recognized by antibodies to the ortholog in *N. crassa* (Schliebs et al., 2006). The slightly faster running catalase was designated *PbCatP*, as demonstrated by mass spectrometry of trypsin-digested peptides of the purified protein (data not shown). The species with the highest mobility was designated as *PbCatC*, which clearly represents a catalase-peroxidase member, as demonstrated by its strong reaction to the *o*-dianisidine substrate.

PbCatA, *PbCatP* and *PbCatC* demonstrated differential activity in *P. brasiliensis* phases. Developmental regulation of catalases is likely to be widespread in prokaryotes and eukaryotes. *Aspergillus fumigatus* encodes one conidial catalase *CATap* and two mycelial catalases, *CAT1p* and *CAT2p*. Although *CAT1p* and *CAT2p* protect *A. fumigatus* from peroxide killing they are not sufficient for protection against macrophage killing (Paris et al., 2003). Four cata-

Table 1
Summary of the *P. brasiliensis* response mediated by catalases to endogenous and exogenous stresses

Experimental Condition	Change in protein/transcript level		
	Catalase A	Catalase P	Catalase C
Yeast cells*	–	I	–
Mycelium*	I	–	I
Stress condition			
H ₂ O ₂ †	–	I	–
Osmotic shock†	–	–	I
M to Y differentiation	I	I	–
Heat shock of yeast cells*	–	–	I
Macrophage phagosome‡	I	I	ND
Oleic acid*	I	–	–

M, *P. brasiliensis* mycelium phase; Y, *P. brasiliensis* yeast phase; –, unchanged expression; I, increased expression; ND, not determined.

* Results obtained by analysis of protein activity.

† Results obtained by analysis of protein activity and transcript levels.

‡ Results obtained by analysis of transcript levels.

lases in *Aspergillus nidulans* have been elucidated. CatA activity is detected in spores and protects this fungus from peroxide stress and heat shock (Navarro et al., 1996; Navarro and Aguirre, 1998). CatB is induced in growing and developing hyphae and in response to oxidation and other stresses (Kawasaki et al., 1997; Kawasaki and Aguirre, 2001). CatD is induced during late stationary phase by glucose starvation, high temperature and peroxide stress (Kawasaki and Aguirre, 2001). The three catalase genes in *Histoplasma capsulatum* present differential expression. The *CATA* transcript abundance is regulated by morphology and oxidative stress, while *CATB* and *CATP* transcripts are regulated by carbon sources (Johnson et al., 2002).

The monofunctional catalases *PbCatA*, *PbCatP* and the catalase-peroxidase *PbCatC* demonstrated differential activity on dependence of environmental and physiological conditions. Our results support the concept that *PbCatP* could be related to fungal protection against exogenous production of H₂O₂. In addition to the increase in *PbCatP* activity in response to H₂O₂ treatment, *PbCATP* is induced following phagocytosis by macrophages in an *ex vivo* model. H₂O₂ is induced in *P. brasiliensis* infected macrophages (Meloni-Bruneri et al., 1996). Therefore, upregulation of catalase indicates that the fungus has evolved an efficient adaptive system for detoxification of NADPH oxidase –dependent oxidative burst products.

Expression of *PbCatA* is induced in yeast cells that utilize fatty acids as the only carbon and energy source. Based on our results, *PbCatA* may be involved in response to detoxification of endogenous processes, such as hydrogen peroxide generated by acyl-CoA oxidase during fatty acid β -oxidation in peroxisomes. In this regard, we have described that the treatment of *P. brasiliensis* yeast cells with human plasma promoted the over expression of transcripts encoding all the enzymes related to the β -oxidation pathway, as well as of the one encoding *PbCatA* (Bailão et al., 2007). The flavoprotein dehydrogenase that introduces the double bond passes electrons directly to O₂ during β -oxidation in peroxisomes, producing H₂O₂ that is probably removed by the *PbCatA* in the endogenous stress condition.

The *PbCATA* transcript is induced in yeast cells infecting macrophages. Fungi rapidly adapt to the new intracellular environment within the phagosome by changing the expression of proteins belonging to different pathways. In *Candida albicans* the up-regulation of lipid, fatty acid, glyoxylate, and tricarboxylic acid cycles, indicates that yeast shifts to a starvation mode with activation of degradation and detoxification protein machinery (Lorenz et al., 2004; Fernández-Arenas et al., 2007). The increase

of expression of *PbCATA* in response to ingestion by macrophages could suggest that *P. brasiliensis* in that condition could be exposed to high levels of peroxide produced by increase in the fatty acid β -oxidation metabolism during phagocytosis. Future studies will focus on this subject.

Although a significant specificity in the induction of the members of the catalase family has been described here, redundancy among the three detoxifying enzymes expression was observed. The A and P species were significantly induced during the fungal transition from mycelium to yeast cells. In *P. brasiliensis* a series of genes involved in maintenance of the intracellular redox potential and protection against oxidative stress are over expressed during the dimorphic transition, suggesting that the differentiation process in *P. brasiliensis* could produce a hiperoxidant state, as compared to other microorganisms (Nunes et al., 2005; Bastos et al., 2007; Hansberg and Aguirre, 1990). Of relevance, the treatment of yeast cells at 42 °C does not promote increase in the fungal catalases A and P, suggesting that the difference of activity of both proteins between yeast cells and mycelia is not a direct consequence of incubation temperature, but closely correlates with changes in cell morphology as described in *H. capsulatum* (Johnson et al., 2002).

Our results suggest that *P. brasiliensis* responds to oxidative stress by altering its transcriptional program. Consistent with the occurrence of a hyper oxidant state during cellular differentiation, both catalases *PbCatA* and *PbCatP* are induced, as demonstrated by proteomic and transcripts expression analysis. Additionally, the *PbCatA* expression seems to be also associated with the endogenous stress promoted by the over utilization of fatty acid β -oxidation. Also *PbCATP* and *PbCATA* transcripts expression seems to be related to the fungal antioxidant response that follows the antimicrobial burst in phagocytosing macrophages and or to the shift to the starvation mode that follows fungal cells upon macrophage infection.

Despite efforts genetic manipulation of *P. brasiliensis* has remained impossible for many years. In this way it is still not possible, for example, to specifically knock out a *P. brasiliensis* gene and to firmly demonstrate the biological role of the cognate protein, which has limited the functional studies in the organism itself. The response to stress is a key step in the pathogenesis of many fungi and consequently the demonstration of the biological role of the characterized fungal catalases remains an important objective.

Acknowledgments

This work at Universidade Federal de Goiás was supported by grants from Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP-0106121200), Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Goiás and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq- 505658/2004-6 and 471808/2006-7). The authors wish to thank Dr. Wolfgang Schliebs, Institut für Physiologische Chemie, Germany, for providing the antibody anti-Cat 1 of *N. crassa*.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.fgb.2008.08.007.

References

- Aebi, H., 1984. Assays of catalase in vitro. In: Parker, L. (Ed.), *Catalase In vitro*. Academic Press, New York, NY, pp. 122–126.
- Bailão, A.M., Shrank, A., Borges, C.L., Parente, J.A., Dutra, V., Felipe, M.S.S., Fiúza, R.B., Pereira, M., 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.

- Barbosa, M.S., Cunha-Passos, D.A., Felipe, M.S.S., Jesuino, R.S.A., Pereira, M., Soares, C.M.A., 2004. The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is differentially regulated in phases of *Paracoccidioides brasiliensis*: molecular and phylogenetic analysis. *Fungal Genet. Biol.* 41, 667–675.
- Barbosa, M.S., Bao, S.N., Andreotti, P.F., Faria, F.P., Felipe, M.S.S., Santos Feitosa, L., Mendes-Giannini, M.J., Soares, C.M.A., 2006. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. *Infect. Immun.* 74, 382–389.
- Bastos, K.P., Bailão, A.M., Borges, C.L., Faria, F.P., Felipe, M.S.S., Silva, M.G., Martins, W.S., Fiúza, R.B., Pereira, M., Soares, C.M.A., 2007. The transcriptome analysis of early morphogenesis in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium reveals novel and induced genes potentially associated to the dimorphic process. *BMC Microbiol.* 7, 29.
- Bookout, A.L., Cummins, C.L., Mangelsdorf, D.J., Pesola, J.M., Kramer, M.F., 2006. High-throughput real-time quantitative reverse transcription PCR. In: Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (Eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, Hoboken, NJ, pp. 1581–1628.
- Bustamante-Simon, B., McEwen, J.G., Tabares, A.M., Arango, M., Restrepo, A., 1985. Characteristics of the conidia produced by mycelial form of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sabouraudia* 23, 407–414.
- Campos, E.G., Jesuino, R.S., Dantas, A.S., Brígido, M.M., Felipe, M.S.S., 2005. Oxidative stress response in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Genet. Mol. Res.* 4, 409–429.
- Costa, M., Borges, C.L., Bailão, A.M., Meirelles, G.V., Mendonça, Y.A., Dantas, S.F.I.M., Faria, F.P., Felipe, M.S.S., Molinari-Madlum, E.E.W.I., Mendes-Giannini, M.J.S., Fiúza, R.B., Martins, W.S., Pereira, M., 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.
- Felipe, M.S.S., Andrade, R.V., Arraes, F.B., Nicola, A.M., Maranhão, A.Q., Torres, F.A., Silva-Pereira, I., Poças-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., Brígido, M.M., Network, PbGenome, 2005. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. *J. Biol. Chem.* 280, 24706–24714.
- Fernández-Arenas, E., Cabezón, V., Bermejo, C., Arroyo, J., Nombela, C., Diez-Orejas, R., Gil, C., 2007. Integrated proteomics and genomics strategies bring new insight into *Candida albicans* response upon macrophage interaction. *Mol. Cell. Proteomics* 6, 460–478.
- Fonseca, C.A., Jesuino, R.S., Felipe, M.S., Cunha, D.A., Brito, W.A., Soares, C.M.A., 2001. Two-dimensional electrophoresis and characterization of antigens from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect.* 3, 535–542.
- Fortier, A.H., Falk, L.A., 2001. Isolation of murine macrophages. In: Coligan, J.E., Bierer, B.E., Margulies, D.H., Shevach, E.M., Strober, W., Brown, P. (Eds.), *Current Protocols in Immunology*. John Wiley and Sons, Hoboken, NJ, pp. 14.1.1–14.1.9.
- Giles, S.S., Stajich, J.E., Nichols, C., Gerrald, Q.D., Alspaugh, J.A., Dietrich, F., Perfect, J.R., 2006. The *Cryptococcus neoformans* catalase gene family and its role in antioxidant defense. *Eukaryot. Cell* 5, 1447–1459.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1999. *Free radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press, Oxford University Press.
- Hansberg, W., Aguirre, J., 1990. Hydroperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell isolation from dioxygen. *J. Theor. Biol.* 142, 201–221.
- Hohmann, S., 2002. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 300–372.
- Johnson, C.H., Klotz, M.G., York, J.L., Krutz, V., McEwen, J.E., 2002. Redundancy, phylogeny and differential expression of *Histoplasma capsulatum* catalases. *Microbiology* 148, 1129–1142.
- Kawasaki, L., Wysong, D., Diamond, R., Aguirre, J., 1997. Two divergent catalase genes are differentially regulated during *Aspergillus nidulans* development and oxidative stress. *J. Bacteriol.* 179, 3284–3292.
- Kawasaki, L., Aguirre, J., 2001. Multiple catalase genes are differentially regulated in *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.* 183, 1434–1440.
- Lorenz, C.M., Bender, J.A., Fink, G.R., 2004. Transcriptional response of *Candida albicans* upon internalization by macrophages. *Eukaryot. Cell* 3, 1076–1087.
- Maggio-Hall, L.A., Keller, N.P., 2004. Mitochondrial beta-oxidation in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 54, 1173–1185.
- Meloni-Bruneri, L.H., Campos, A., Abdalla, D.S., Calich, V.L., Lenzi, H.L., Burger, E., 1996. Neutrophil oxidative metabolism and killing of *Paracoccidioides brasiliensis* after air pouch infection of susceptible and resistant mice. *J. Leukoc. Biol.* 59, 526–533.
- Misra, H.P., Fridovich, I., 1977. Superoxide-dismutase and peroxidase: a positive activity stain applicable to polyacrylamide gel electrophoregrams. *Arch. Biochem. Biophys.* 183, 511–515.
- Moreira, S.F., Bailão, A.M., Barbosa, M.S., Jesuino, R.S.A., Felipe, M.S.S., Pereira, M., Soares, C.M.A., 2004. Monofunctional catalase P of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification, characterization, molecular cloning and expression analysis. *Yeast* 21, 173–182.
- Navarro, R.E., Aguirre, J., 1998. Posttranscriptional control mediates cell type-specific localization of Catalase A during *Aspergillus nidulans* development. *J. Bacteriol.* 180, 5733–5738.
- Navarro, R.E., Stringer, M.A., Hansberg, W., Timberlake, W.E., Aguirre, J., 1996. CatA, a new *Aspergillus nidulans* gene encoding a developmentally regulated catalase. *Curr. Genet.* 29, 52–59.
- Nunes, L.R., Costa de Oliveira, R., Leite, D.B., da Silva, V.S., dos Reis Marques, E., Silva Ferreira, M.E., Ribeiro, D.C., de Souza Bernardes, L.A., Goldman, M.H., Puccia, R., 2005. Transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* cells undergoing mycelium-to-yeast transition. *Eukaryot. Cell* 4, 2115–2128.
- Paris, S., Wysong, D., Debeaupuis, J.P., Shibuya, K., Philippe, B., Diamond, R.D., Latgé, J.P., 2003. Catalases of *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Immun.* 71, 3551–3562.
- Restrepo, A., Jiménez, B.E., 1980. Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase in a chemically defined culture medium. *J. Clin. Microbiol.* 12, 279–281.
- Restrepo, A., McEwen, J.G., Castañeda, E., 2001. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med. Mycol.* 39, 233–241.
- Sambrook, J., Russel, D.W., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, NY.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463–5467.
- Schliebs, W., Würtz, C., Kunau, W.H., Veenhuis, M., Rottensteiner, H., 2006. A eukaryote without catalase-containing microbodies: *Neurospora crassa* exhibits a unique cellular distribution of its four catalases. *Eukaryot. Cell* 5, 1490–1502.
- Silva, S.S., Tavares, A.H., Passos-Silva, D.G., Fachin, A.L., Teixeira, S.M., Soares, C.M.A., Carvalho, M.J., Bocca, A.L., Silva-Pereira, I., Passos, G.A., Felipe, M.S.S., 2007. Transcriptional response of murine macrophages upon infection with opsonized *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells. *Microbes Infect.* 10, 12–20.
- Van den Branden, C., Kerckaert, I., Roels, F., 1984. Peroxisomal beta-oxidation from endogenous substrates. Demonstration through H₂O₂ production in the unanaesthetized mouse. *Biochem. J.* 218, 697–702.
- Woodbury, W., Spencer, A.K., Stahman, M.A., 1971. An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. *Anal. Biochem.* 44, 301–305.
- Wysong, D.R., Christin, L., Sugar, A.M., Robbins, P.W., Diamond, R.D., 1998. Cloning and sequencing of a *Candida albicans* catalase gene and effects of disruption of this gene. *Infect. Immun.* 66, 1953–1961.
- Zamocky, M., Jakopitsch, C., Vlasits, J., Obinger, C., 2007. Fungal catalase-peroxidases: a novel group of bifunctional oxidoreductases. *J. Biol. Inorg. Chem.* 12, S97–2007.

Purification of *Paracoccidioides brasiliensis* catalase P: subsequent kinetic and stability studies

Received September 22, 2009; accepted October 14, 2009; published online November 6, 2009

Ronney Fernandes Chagas¹, Alexandre Melo Bailão¹, Kátia Flávia Fernandes², Michael S. Winters³, Maristela Pereira¹ and Célia Maria de Almeida Soares^{1,*}

¹Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas; ²Laboratório de Química de Proteínas, Universidade Federal de Goiás Goiânia, Goiás, Brazil; and ³University of Cincinnati, College of Medicine, Cincinnati, OH, USA

*Célia Maria de Almeida Soares, Laboratório de Biologia Molecular, ICBII, Campus II Universidade Federal de Goiás, 74001-970, Goiânia-Goiás, Brazil, Tel./Fax: +55-62-35211110; E-mail: celia@icb.ufg.br

Catalases are essential components of the cellular equipment to cope with oxidative stress. Here we have purified a highly abundant catalase P of *Paracoccidioides brasiliensis* (*PbCatP*) that is preferentially expressed in the parasitic yeast phase. This oxidative stress-induced protein was isolated from yeast cells grown in the presence of 15 mM of hydrogen peroxide (H_2O_2). We have used consecutive steps of protein precipitation and gel filtration chromatography to achieve the purified protein. Protein purification was validated using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and bioinformatics analysis. The purified enzyme showed strong similarity to small-subunit catalases. Like most monofunctional catalases, *PbCatP* is a homotetramer, resistant to inactivation by acidic conditions, temperature and denaturants. Furthermore, the kinetic behaviour of catalase P was observed to be different at low compared to high H_2O_2 concentrations. The results demonstrated that a purified *PbCatP* is a homotetrameric enzyme, classified as a small subunit catalase.

Keywords: Catalase P/Homotetrameric enzyme/Mass spectrometry/*Paracoccidioides brasiliensis*/Protein purification and characterization.

Among several potentially harmful reactive oxygen species (ROS), hydrogen peroxide (H_2O_2) is probably the most abundant, occurring in the cells and in their environment. H_2O_2 is produced intracellularly as a by-product in reactions catalysed by several oxidases (1). Catalases (EC 1.11.1.6) are enzymes capable of consuming H_2O_2 , reducing the harmful effect of this reactive oxygen compound and protecting the cellular environment against oxidative stress.

The catalytic reaction by catalases takes place in two steps; first the H_2O_2 molecule oxidizes haeme to an oxyferryl species in which one oxidation equivalent is removed from the iron and one from the porphyrin ring to generate a porphyrin cation radical.

Next, H_2O_2 is then used as a reductant of compound I to regenerate the resting state enzyme, water and oxygen. Catalases can also assume an inactive state, called compound II, a product of compound I, during exposure to its own substrate, H_2O_2 . The fraction of catalase becoming compound II reaches a steady-state level during exposure to H_2O_2 that is generated at a constant rate. When exposure to H_2O_2 stops, catalase returns to the ferricatalase state (2). A tightly bound NADP⁺ and NADPH were discovered in catalase preparations (3) that prevents or reverses the formation of compound II by small catalases in the presence of H_2O_2 (4, 5).

The three families of catalases are Mn catalases, bifunctional catalase-peroxidases and monofunctional or true catalases. The last family corresponds to homotetrameric haeme-containing enzymes that are composed of two clearly distinct classes. These classes can be recognized by the size of the subunits: the small-subunit catalases (<60 kDa) and large-subunit catalases (>75 kDa); the last group can be subdivided in spore-specific catalases and secreted catalases (6).

The dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* can cause paracoccidioidomycosis (PCM) in the human host. After inhalation into the lung, the fungus disseminates and replicates in multiple tissues (7). Fungal stressors include those that are potentially toxic such as reactive oxidative species. Studies have demonstrated that cytokine activation is required for *P. brasiliensis* killing by phagocytes and that H_2O_2 and superoxide anion participate as effector molecules in this process (8). Our laboratory had previously characterized a small-subunit monofunctional catalase in *P. brasiliensis*, named catalase P (*PbCatP*) that presents high levels of expression in the yeast parasitic phase and is regulated in the transition from mycelium to yeast cells. *PbCatP* can be induced by H_2O_2 as part of the cellular responses to oxidative stress (9, 10). The protein was characterized as an immunodominant antigen of *P. brasiliensis* reacting with sera of patients with PCM (11). Additionally, the transcript was induced in an *ex vivo* model of macrophage infection, suggesting that the *PbCatP* is involved in the control of exogenous ROS (10).

In this study, we have described, for the first time, the characterization of *PbCatP* from *P. brasiliensis*. Here, we have used successive steps of protein precipitation and gel filtration chromatography to purify the fungal *PbCatP*. The purification procedures were followed by SDS-PAGE and non-denaturing gel analysis. The *PbCatP* amino acid sequence was verified by mass spectrometric (MS) analysis. *PbCatP* exhibited resistance to inactivation by temperature and denaturants.

Different kinetic behaviour at low and high H₂O₂ concentrations for *PbCatP* was also observed. Importantly, the native protein purifies as a high molecular mass species suggesting a tetrameric structure as previously described (6). Future investigations pertaining to the roles of this protein in host–fungus interactions may provide the key knowledge to understanding the pathogenicity of *P. brasiliensis*.

Materials and Methods

Paracoccidioides brasiliensis isolate and growth conditions

The *P. brasiliensis* isolate *Pb01* (ATCC MYA-826) was grown in Fava–Netto's medium [1% (w/v) peptone, 0.5% (w/v) yeast extract, 0.3% (w/v) proteose peptone, 0.5% (w/v) beef extract, 0.5% (w/v) NaCl, 1% (w/v) agar, pH 7.2] at 36°C for the yeast form.

Expression of *PbCatP*

The yeast cells were scraped off the medium cited above and grown in a liquid SP buffer (50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.2) for 2 h. The expression of *PbCatP* was induced by the addition of H₂O₂ (15 mM) for 2 h. The cells expressing the inducible *PbCatP* were harvested by centrifugation at 5,000g for 10 min.

Purification of *P. brasiliensis PbCatP*

Purification steps were carried out at 0–4°C unless otherwise stated. *P. brasiliensis* yeast cells (9.0 g) were collected by centrifugation at 5,000g for 10 min and washed. Yeast protein extracts were obtained by disruption of frozen cells in the presence of proteases inhibitors (50 µg ml⁻¹) *N*α-p-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK), (1 mM) 4-chloromercuribenzoic acid, (20 mM) leupeptin, (20 mM) phenylmethylsulphonyl fluoride and (5 mM) iodoacetamide in the homogenization buffer (2 mM CaCl₂, 20 mM Tris–HCl, pH 8.8). The crude extract was precipitated by addition of 100% cold acetone (ratio 1:3) at 4°C. The mixture was centrifuged at 12,000g at 4°C for 10 min and the pellet was resuspended in 1.0 ml of SP buffer. The homogenate (1.0 ml) was applied to a column (18.5 cm × 0.8 cm) of Sephadex G-150 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) equilibrated and eluted with SP buffer, applying a flow rate of 1.0 ml min⁻¹. Fractions of 1.0 ml were collected, and those yielding enzymatic activity and high molecular mass (Supplementary Fig. S1) were pooled. Samples were concentrated to 1.0 ml by precipitation with cold acetone, as described earlier. Each purification step was followed by enzymatic assay, native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and in-gel activity staining of catalases, as described below.

Native PAGE

The cellular extracts were prepared as described earlier. Protein quantification was carried out by the Bradford method (12) at each step of the purification process, using bovine serum albumin as standard. Electrophoresis of native proteins was performed as previously described (13). The samples were resuspended in the lyses buffer containing 9.5 M urea, 2% (v/v) Nonidet P-40, 0.5% (v/v) β-mercaptoethanol and ampholines at pH ranges of 5.0–8.0 and 3.5–10.0 (ratio 4:1). The proteins were analysed by sodium dodecyl sulphate PAGE (SDS–PAGE) according to Laemmli (14), and Coomassie Blue stained.

Enzymatic determination of catalase activity

Catalase activity was determined by measuring the absorbance during the conversion of H₂O₂ to oxygen (10, 15). Catalase-catalyzed decomposition of H₂O₂ was monitored by the decrease in the absorbance at 240 nm, utilizing the extinction coefficient of 39.40 M⁻¹ cm⁻¹. The activity was calculated using a standard curve generated by different concentrations of H₂O₂ monitored at 240 nm. One unit of activity was defined as the amount of enzyme that catalysed the consumption of 1 µmol of H₂O₂ per min (15).

Determination of catalase activity on polyacrylamide gels

A ferricyanide-negative stain was used to locate catalase species on native polyacrylamide gels following the method of Wayne and Díaz (16) PAGE under nondenaturing conditions was performed at 200 V for 6 h, at 4°C. Catalase activity was determined by incubating the

gel for 10 min in the SP buffer, containing 10 mM of H₂O₂. The gel was rinsed three times with water and incubated in a mixture (v/v) of freshly prepared 1.0% (w/v) potassium ferricyanide and 1.0% (w/v) ferric chloride. Green color developed in the gel except at zones where peroxide molecule was degraded by catalase.

In-gel digestion

Protein bands were excised and sliced into small pieces (~1 mm) and placed into 0.65 ml siliconized tubes (PGC Scientific). Fifty microlitres of 25 mM ammonium bicarbonate/50% (v/v) acetonitrile (ACN) were added to each sample, followed by vortexing for 10 min. The supernatant was discarded and this step was repeated twice. Gel pieces were then brought up in 100 µl of ACN and placed in a speed vacuum until dry. Next, 50 µl of 10 mM dithiothreitol (DTT) in 25 mM ammonium bicarbonate was added to the dried gel pieces. Samples were vortexed and spun briefly. The reaction was allowed to proceed at 56°C for 1 h. The supernatant was removed and 50 µl of 55 mM iodoacetamide was added to the gel pieces. Samples were vortexed and spun briefly. The reaction was allowed to proceed in the dark for 45 min at room temperature. Supernatant was removed and the gels were washed with 100 µl of ammonium bicarbonate by vortexing for 10 min. Supernatant was removed and gel pieces were dehydrated in 100 µl of 25 mM ammonium bicarbonate/50% (v/v) ACN, vortexed for 5 min and spun. This step was repeated. Gel pieces were placed in a speed vacuum until dry. Thirty microlitres of a 12.5 ng ml⁻¹ trypsin (Pierce, Rockford, IL, USA) solution was added to the gel pieces that were rehydrated on ice at 4°C for 10 min. Samples were spun down and 25 µl of 25 mM of ammonium bicarbonate was added. Samples were spun briefly and incubated at 37°C overnight. Following overnight digestion, the solution was placed into a clean 0.65 ml siliconized tube. To the gel pieces, 50 µl of 50% (v/v) ACN/5% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA) was added. Samples were vortexed for 30 min, sonicated for 5 min and the solution was combined with the first aqueous extraction. This step was repeated and samples were then dried in a speed vacuum.

Mass spectrometric analysis

Dried peptide extracts were dissolved in 5 µl of water. Next, 2.5 µl of sample was mixed with 2.5 µl of α-cyano-4-hydroxycinnamic acid in 50% (v/v) ACN and 5% (v/v) TFA, 10 mg ml⁻¹. Mass spectra were collected on a Voyager-DE PRO (Applied Biosystems) matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) MS. Each spectrum was an average of 200 spectra. Trypsin auto-digestion peaks (2211.11 and 842.51) were used to calibrate each spectrum.

Saturation kinetics

Kinetic analysis was performed using Microcal Origin (Microcal Software, Inc. Northampton, MA, USA). *PbCatP* was active in the range of 0.01–3.0 M H₂O₂. To protect catalase P against inactivation by its substrate, 10 µg of protein was incubated in the presence of different concentrations of NADPH and the catalase activity was measured as described earlier.

pH dependence and pH inactivation of *PbCatP*

For determination of the pH dependence of enzyme activity, a mixture of 50 mM of the following buffers 2-(*N*-morpholino) ethanesulphonic acid (MES), 4-(2-hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulphonic acid (HEPES), 2-(*N*-cyclohexylamino) ethanesulphonic acid (CHES) and 3-(cyclohexylamino)-1-propanesulphonic acid (CAPS) were adjusted to the desired pH with 0.5 M HCl or 0.5 M NaOH. Catalase activity was assayed with 10 mM of H₂O₂. To measure *PbCatP* stability in the acid medium, the enzyme was incubated for 5 min in the 50 mM acetate buffer (pH 3.0–7.0) and the activity was determined using 10 mM H₂O₂. Fractions of the acidic treatment were washed and precipitated with cold acetone 100% (ratio 1:3) at 4°C. The samples were resuspended in 50 mM phosphate buffer, pH 7.8, for renaturing assays. Activity assayed at pH 7.8 in 50 mM phosphate buffer was set as 100%.

Determination of *PbCatP* thermal and chemical stabilities

PbCatP (10 µg in 20 µl of 50 mM phosphate buffer, pH 7.8) was incubated at 65°C for different times (0, 5, 10, 20, 30, 40, 50 and 60 min) and samples from this heat treatment were incubated at 40°C

for renaturing analysis. The remaining activity was assayed by PAGE (5 µg in each lane) under non-denaturing conditions as described earlier and stained for catalase activity and with Coomassie Brilliant Blue. *PbCatP* (20 µg in 20 µl of the 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.8) was incubated with different concentrations of guanidine hydrochloride (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) for 48 h at room temperature. Activity was assayed by diluting the incubation mixture 1:3 directly in 2 ml of 10 mM H₂O₂ in 50 mM phosphate buffer, pH 7.8. The remaining incubation mixture was dialysed by centrifuging the sample in a Centricon filter at 5,000g by washing three times with 2 mM of the sodium phosphate buffer, pH 7.8. Samples were divided into two fractions and analysed by PAGE under non-denaturing conditions. Gels were run in duplicate, stained for activity and with Coomassie Brilliant Blue.

Inhibition and inactivation of *PbCatP*

Irreversible inactivation of *PbCatP* by 3-amino-1,2,4-triazole was investigated at 37°C by incubation of 20 µg of the enzyme in 1.0 ml of 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.8, containing 20 mM 3-amino-1,2,4-triazole, 4 mM ascorbate and 4 mM H₂O₂. Samples (50 µl) were withdrawn every 5 min from the incubation mixture and the remaining catalase activity was assayed. *PbCatP* (1 µg in 2 ml of 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.8) was incubated at 37°C for 1 min in the presence of a different concentrations of azide or hydroxylamide, and the remaining activity was measured by adding 10 mM H₂O₂ to the mixture.

Results and Discussion

Purification of the *PbCatP*

PbCatP was chromatographically purified on a Sephadex G-150 column and the resulting chromatogram is shown in Supplementary Fig. S1. Catalase activity was observed in P1 and P2, as demonstrated in Supplementary Fig. S1. Table 1 describes catalase P purification. Crude enzyme extract was precipitated using cold acetone. The catalase yield and purity were 79% and 1.3-fold, respectively. Precipitated fractions were then subjected to size exclusion chromatography after precipitation with cold acetone. The catalase purification increased 3-fold and the enzyme yield was 62%. Starting with 9.0 g of *P. brasiliensis* yeast cells, 2.0 mg of purified catalase P were obtained. The success of this approach was achieved due to induction of catalase expression by H₂O₂, as can be seen by the high final specific activity of 1,133.9 U mg⁻¹. In synthesis, the high level of the protein in *P. brasiliensis* (3,665 U mg⁻¹) allowed its purification by simple steps that yield nearly homogenous catalase with 60% recovery.

The purity of the final preparation of the partially purified enzyme was analysed by denaturing SDS-PAGE and by in-gel catalase assays (Table 1). In a single chromatographic step, we were able to

purify catalase to near homogeneity. The purified enzyme migrated as a single protein species in electrophoresis under non-denaturing conditions, indicating that a pure protein species had been isolated after the final purification step (Fig. 1, lane 1).

Three catalases of *P. brasiliensis* (*PbCatA*, *PbCatP* and *PbCatC*) were also detected by in-gel activity of the crude protein extracts (data not shown). The position of the protein species in the non-denaturing gels is consistent with previous descriptions of the catalases in fungi (17), as we had previously described (10). One H₂O₂-reactive band was detected in the potassium ferricyanide-negative-stained gel (Fig. 1, lane 2). The purified catalase migrated as a species of 244 kDa, corresponding to the predicted homotetramer of the enzyme (18, 19) (Fig. 1, lanes 1 and 2). Similar results were observed during the molecular analysis of the purified catalase-1 from *Neurospora crassa*. In this organism, data indicated that the native catalase-1 protein, like most monofunctional catalases, can be considered a homotetramer (18, 19).

MS analysis of purified *PbCatP*

The purified fraction was resolved by 2D gel electrophoresis (Fig. 2A). The migration of the protein in the gel corresponded to a *pI* of 6.2 and molecular mass

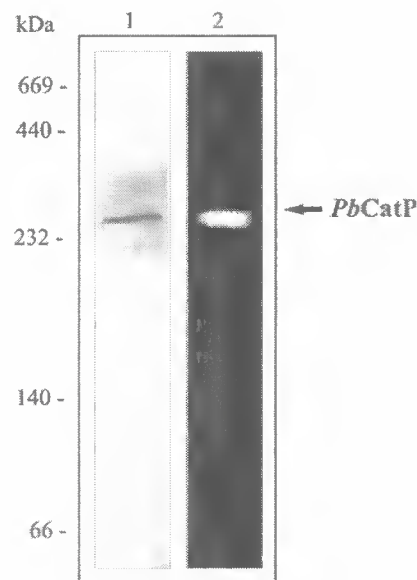


Fig. 1 Analysis of the purified catalase under non-denaturing conditions. The purified protein sample (5 µg) was analysed: (1) in native PAGE stained with Coomassie Blue; (2) in native PAGE stained for catalase activity.

Table 1. Purification of the *PbCatA*.

Fraction	Total activity ^a (U ml ⁻¹)	Amount of protein ^b (mg ml ⁻¹)	Specific activity ^c (U mg ⁻¹)	Purification (fold) ^d	Yield (%) ^e	In-gel catalase activity ^f
Crude extract	3665.6	10.0	366.6	1	100	<i>PbCatA</i> , <i>PbCatP</i> e <i>PbCatC</i> .
Acetone precipitation	2889.1	6.0	481.5	1.3	79	<i>PbCatA</i> , <i>PbCatP</i> e <i>PbCatC</i> .
Gel filtration	2267.8	2.0	1133.9	3.1	62	<i>PbCatP</i> .

^aAmount of protein measured in 1.0 ml of protein extract. ^bProtein concentration was determined by the method of Bradford, using BSA as standard. ^cUnits of protein in 1.0 mg of crude extract. ^dCalculated as the ratio between the specific activity and total activity. ^ePercentage of remaining activity in each step. ^fCatalases species determined by in-gel analysis.

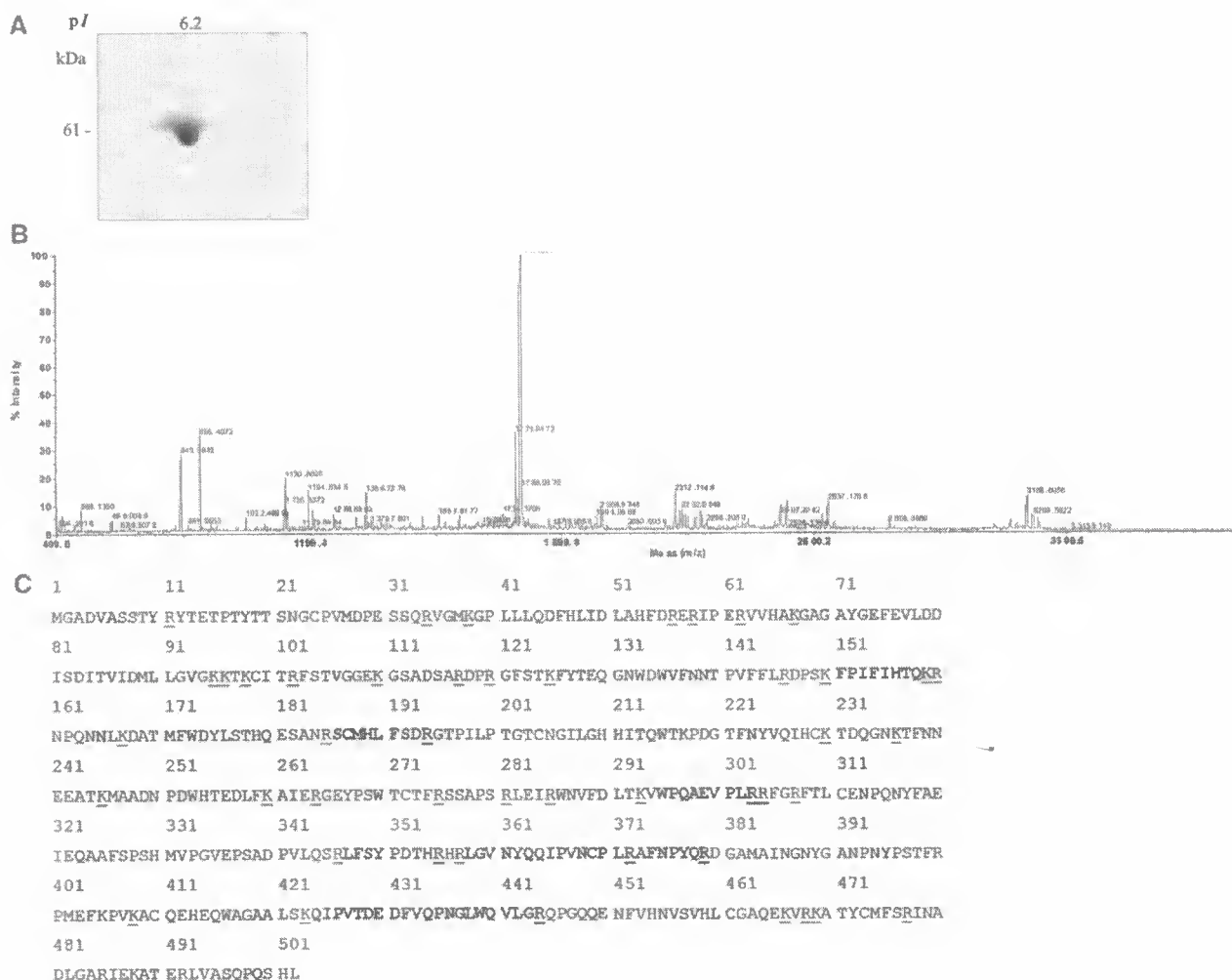


Fig. 2 2D electrophoresis of the purified protein and a representative peptide sequence obtained by enzymatic digestion and MS/MS. (A) The purified protein fraction obtained from gel filtration was analysed by 2D gel electrophoresis. The deduced molecular mass and isoelectric point are indicated. The protein spot was excised, digested by trypsin and submitted to MS as detailed in the 'Materials and Methods' section. (B) MS spectra of the purified *PbCatP* after 2D protein fractionation and subsequent protein digestion. (C) Catalase P sequences detected by spectrometry analysis. The sequence of the deduced catalase P encoded by *PbcatalP* (GenBank accession number AF428076) is shown. The peptides sequences detected by MS are indicated in bold letters.

of 61 kDa. Figure 2B shows the representative mass spectrum acquired from a tryptic digestion of the protein spot in figure 2A. The MS data were searched against public fungal databases using MASCOT (<http://www.matrixscience.com>). Seven masses out of 20 matched the *P. brasiliensis* catalase P (GenBank accession no. AF428076) sequence yielding a probability-based MOWSE score of 86. This hit was considered significant, as it was the only protein sequence, which exceeded the threshold score calculated by the MASCOT software assuming $P < 0.05$. Figure 2C shows the seven peptides detected by MS mapped onto the *P. brasiliensis* catalase P amino acid sequence. Thirteen out of the 20 masses detected by MALDI-TOF MS were not matched with the catalase P amino acid sequence suggesting that there is most likely another protein, which co-migrated with catalase P, or the catalase P protein is extensively modified.

Catalytic properties of *PbCatP*

Catalase has long been recognized as an enzyme with a rapid turnover rate and the maximum observed

velocities range from 54,000 to 833,000 reactions per second (20). The H_2O_2 concentrations at which 50% of maximal activity is attained (apparent K_m) revealed a similar broad variation from 38 to 600 mM (20). The classical terms, V_{max} , k_{cat} and K_m , cannot be directly applied to the observed data since catalases do not exhibit Michaelis–Menten kinetics over the complete substrate concentration range. Similar to other oxidoreductases, such as Horseradish peroxidases (21), all small subunit catalases are inhibited by high substrate concentrations presenting the typical two-step nature kinetics (6). However, at H_2O_2 concentrations below 200 mM, all small subunit catalases exhibit a Michaelis–Menten-like dependence of velocity on the H_2O_2 concentration, and these data were used to calculate theoretical K_m and V_{max} values (Table 1, supplementary material). The K_m and V_{max} were theoretically estimated to be 150 and 380 mM, respectively. The two-step nature kinetics of *PbCatP* and the theoretical dependence of velocity on the substrate concentration were calculated using the Michaelis–Menten equation as depicted in Fig. 3A

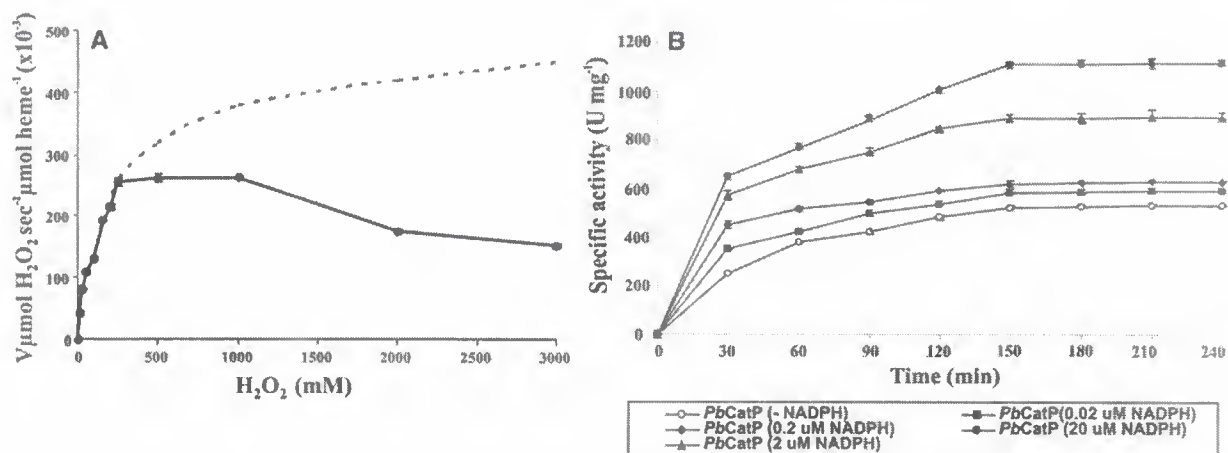


Fig. 3 Catalytic properties of *PbCatP*. (A) The *PbCatP* kinetics in the presence of millimolar concentration of H_2O_2 . In the panel, the solid and dashed lines represent, respectively, the observed and theoretical Michaelis–Menten curves calculated from constants determined at a low H_2O_2 concentration. (B) Protection of purified catalase P by NADPH. Catalase activity was determined as described. Increasing amounts of NADPH were added to the assay mixture. All assays were repeated in triplicate and the results were averaged.

(dashed lines). There is a correlation between the theoretical and observed curves at a low concentration of H_2O_2 . This correlation decreases at higher concentrations of H_2O_2 , presumably as a result of the enzyme inactivation caused by the reactive substrate, H_2O_2 , also observed for other catalases (22). The data shown for *P. brasiliensis* catalase P (Fig. 3A) are typical of the observed and theoretical curves for other small-subunit catalases (20). Most catalases are characterized at low substrate concentrations where the data resemble Michaelis–Menten kinetics sufficiently well to be misleading, but the variation of observed K_m and V_{max} values from calculated values presented here demonstrated the discrepancy. Other point is that specific activities of catalases are usually determined at substrate concentrations below the apparent K_m where there is great variation in velocity with substrate concentration, and this makes meaningful comparisons of literature data virtually impossible.

Several catalases are susceptible to inactivation by their own substrate, H_2O_2 , but this can be largely prevented by bound NADPH (23). Addition of NADPH indeed stimulated the activity of *PbCatP* in a dose-dependent manner (Fig. 3B) most likely by preventing the inactivation from oxidative damage, as has been reported for other small catalases (24).

Effect of inhibitors on enzyme activity

Catalases are sensitive to a number of compounds that interact with active-site haeme groups including azides, hydroxyl amines and aminotriazoles. The irreversible specific inhibitor of monofunctional catalases, 3-amino-1,2,4-triazole (25), inactivated *PbCatP* at 20 mM following first-order kinetics, $k = 0.05 \pm 0.001 \text{ min}^{-1}$, shown in Supplementary Fig. 2A. Using this k value an inhibition of 50% was calculated following 15 min treatment. These values are similar to the reported values for CAT-1 of *N. crassa* (26).

Inactivation kinetics by hydroxylamide, another irreversible inhibitor of catalases, was measured at different concentrations. Catalase P was sensitive to

hydroxylamine in the μM range. Inactivation was first order with a $k = 1.32 \pm 0.11 \mu\text{M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (Supplementary Fig. S2B). The I_{50} for inhibitor was $2.0 \mu\text{M}$, also similar to what was observed for the small catalase of *Saccharomyces cerevisiae* (20).

Azide, another irreversible inhibitor of haeme-enzymes, was effective at concentrations $< 1 \text{ mM}$. The kinetics of inactivation was measured by incubating the enzyme with several concentrations of the inhibitor for a fixed time. Inactivation using azide was also of first order with $k = 0.21 \pm 0.03 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (Supplementary Fig. S2C). The concentration of inhibitor producing 50% of inhibition after 1 min incubation with the enzyme, I_{50} , was $1.5 \mu\text{M}$. Similar results were obtained to small catalase (CATA) of *S. cerevisiae* and other small catalases (20).

Catalase P stability

When *PbCatP* activity was assayed at different pH values, no optimal pH was observed, but rather a plateau described for other catalases (27). The purified *PbCatP* was stable and yielded similar activity from pH 4 to 12 (Fig. 4A). This fact together with the inactivation by 3-amino-1,2,4-triazole indicates that *PbCatP* is a monofunctional catalase (4, 27). This is in contrast to catalase-peroxidases that have an optimal pH (21). The enzyme exhibited stability even at extreme acidic conditions. Approximately 20% activity was observed at pH 3.8 followed by a steady rise of activity as the pH was increased to 7.8 (Fig. 4B). The samples submitted to acid treatment were resuspended in 50 mM phosphate buffer, pH 7.8, to renaturing conditions. In this condition, the catalase activity was restored (Fig. 4B).

Like most monofunctional catalases, *PbCatP* activity did not appear to be greatly influenced by temperature, as demonstrated in Fig. 5A. Many interactions that stabilize the secondary, tertiary and quaternary structure throughout the protein are likely to be involved in this property, as described (20, 26). The purified *PbCatP* was incubated at 65°C for

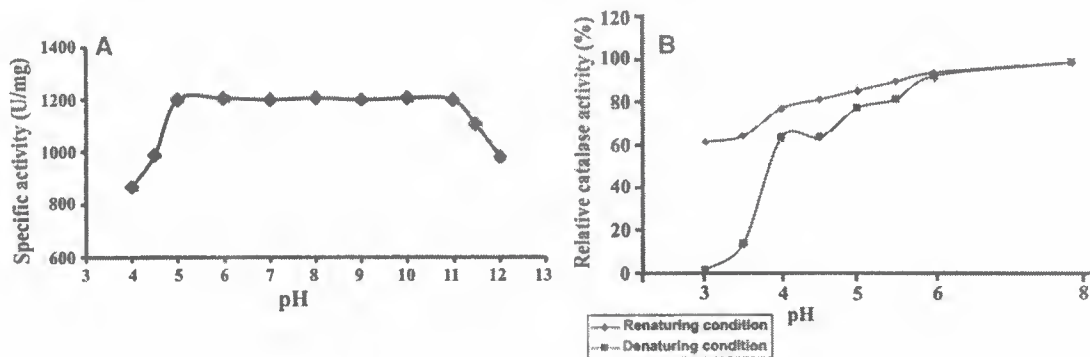


Fig. 4 Effect of pH on catalase P activity and stability. (A) Specific activity of *PbCatP* assayed at the indicated pH values. (B) Stability at the acidic range of pH and renaturing of *PbCatP*. The purified catalase was submitted to acid pH and catalase activity was determined. Samples were taken to renaturing in pH 7.8. Enzyme activity at pH 7.8 was taken as 100%. Data were obtained of three separated determinations.

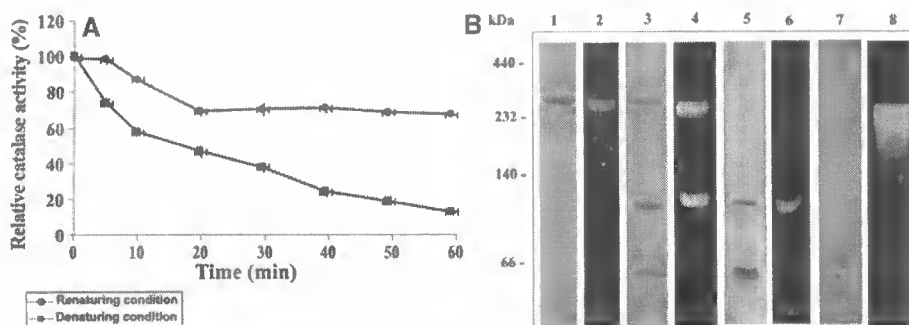


Fig. 5 Catalase P stability at high temperatures. (A) *PbCatP* was incubated at 65°C at different time intervals. Samples were incubated at 40°C for renaturing conditions. Enzyme activity was determined. (B) PAGE under non-denaturing conditions using samples of 0 (lanes 1 and 2), 30 min (lanes 3 and 4), 60 min (lanes 5 and 6) of heat treatment. Samples were changed to the temperature of 40°C for renaturing assays (lanes 7 and 8). The gel was stained with Coomassie Brilliant Blue (lanes 1, 3, 5 and 7) and potassium ferricyanide/ferric chloride for activity (lanes 2, 4, 6 and 8).

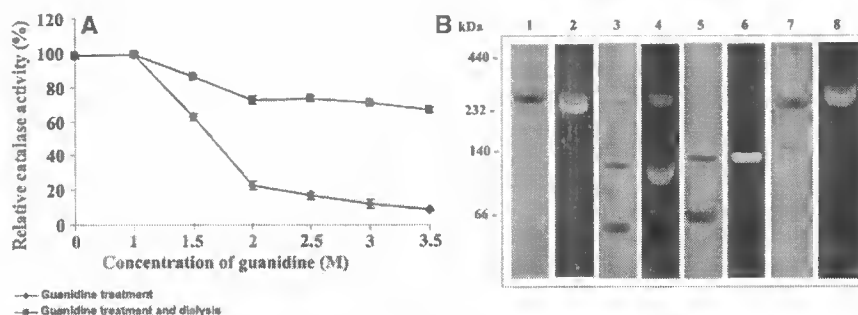


Fig. 6 Enzyme stability in the presence of a molar concentration of guanidinium ion. (A) *PbCatP* was incubated 48 h at different guanidine hydrochloride concentrations and the relative enzyme activity was determined. (B) *PbCatP* was incubated 48 h at different guanidine hydrochloride concentrations and then analysed by PAGE using samples treated with 1 M (lanes 1 and 2), 1.5 M (lanes 3 and 4) and 3.5 M of guanidine-HCl (lanes 5 and 6). Lanes 7 and 8 represent the activity of *PbCatP* after treatment with 3.5 M of guanidine and subsequent dialysis. Gels were stained with Coomassie Brilliant Blue (lanes 1, 3, 5 and 7) and potassium ferricyanide/ferric chloride (lanes 2, 4, 6 and 8).

different amounts of time. The time required for 50% inactivation is shown in Fig. 5A. Furthermore, the protein was analysed by PAGE under non-denaturing conditions. Protein species were observed at 244 kDa, 122 kDa and 61 kDa, suggesting a temperature-dependent release of the tetrameric, dimeric and monomeric forms of the enzyme (Fig. 5B). The tetramers and dimers are fully active while monomers are inactive (Fig. 5B, lanes 4 and 6), as observed in *N. crassa* (26). Only the tetrameric form was observed in the control (Fig. 5B, lanes 1 and 2); after 30 min of heat treatment, the presence of dimers and monomers were detected (Fig. 5B, lanes 3 and 4). Only the dimer and

monomer remained after 60 min of heat treatment (Fig. 5B, lanes 5 and 6). After treatment at 65°C, the samples were incubated at 40°C for renaturing treatment. Under this condition, the inactive forms generated in the heat treatment were recovered by renaturing (Fig. 5A), showing only the tetrameric form (Fig. 5B, lanes 7 and 8).

To further test *PbCatP* stability, we treated the enzyme with different concentrations of guanidinium chloride. Similar to acid treatment, *PbCatP* was also highly resistant to denaturation by guanidinium chloride. The enzyme conserved activity after 48 h exposure to 1 M guanidine hydrochloride (Fig. 6A and B, lanes 1

and 2). Guanidine-HCl at 1.5 M for 48 h decreased the catalase P activity to ~60% (Fig. 6A and 6B, lanes 3 and 4). Even at 3.5 M guanidine-HCl, PbCatP dimers were active (Fig. 6B, lanes 5 and 6). After dialysis the activity was restored (Fig. 6B, lanes 7 and 8). The high resistance to denaturing by acidic conditions, heat and chaotropic agents may be due to the inter-weaving of amino acid structures between monomers in monofunctional catalases (28).

In summary, we report the purification and identification of the catalase P of *P. brasiliensis*. The native enzyme is a tetramer that loses its activity upon denaturation to a monomer.

Supplementary Data

Supplementary Data are available at *JB* Online.

Funding

This study was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico—CNPq (505658/2004-6), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP-0104077500 and 0106121200), Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Goiás and Secretaria de Ciência e Tecnologia do Estado de Goiás.

Conflict of interest

None declared.

References

- Scandlios, J.G. (2002) The rise of ROS. *Trends Biochem. Sci.* **27**, 483–486
- Chance, B. (1950) Oxidase activity-light absorption relationships in cytochrome system of heart muscle preparations. *Biol. Bull.* **99**, 318
- Kirkman, H.N. and Gaetani, G.F. (1984) Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. *Proc. Natl Acad. Sci.* **81**, 4343–4347
- Jouve, H.M., Pelmont, J., and Gaillard, J. (1986) Interaction between pyridine adenine dinucleotides and bovine liver catalase: a chromatographic and spectral study. *Arch. Biochem. Biophys.* **248**, 71–79
- Kirkman, H.N., Galiano, S., and Gaetani, G.F. (1987) The function of catalase-bound NADPH. *J. Biol. Chem.* **262**, 660–666
- Chelikani, P., Fita, I., and Loewen, P.C. (2004) Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol. Life Sci.* **342**, 192–208
- Brummer, E., Castañeda, E., and Restrepo, A. (1993) Paracoccidioidomycosis: an update. *Microbiol. Rev.* **6**, 89–117
- Rodríguez, D.R., Dias-Melicio, L.A., Calvi, S.A., Peraçoli, M.T.S., and Soares, A.M.V.C. (2008) *Paracoccidioides brasiliensis* killing by IFN- δ , TNF- α and GM-CSF activated human neutrophils: role for oxygen metabolites. *Med. Mycol.* **45**, 27–33
- Moreira, S.F., Bailão, 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
- Chagas, R.F., Bailão, 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.* **45**, 1470–1478
- 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
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**, 248–254
- O'Farell, P.H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**, 4007–4021
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685
- Aebi, H. (1984) Assays of catalase in vitro. *Catalase in vitro* (Parker L., ed.) Vol. 105, pp. 122–126, Academic Press, New York
- Wayne, L.G. and Diaz, G.A. (1986) A double staining method for differentiating between two classes of mycobacterial catalases in polyacrylamide electrophoresis gels. *Anal Biochem.* **157**, 89–92
- Kawasaki, L. and Aguirre, J. (2001) Multiple catalase genes are differentially regulated in *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.* **183**, 1434–1440
- Diaz, A., Rangel, P., Oca, Y.M., Lledías, F., and Hansberg, W. (2001) Molecular and kinetic study of catalase-1, a durable large catalase of *Neurospora crassa*. *Free Radic. Biol. Med.* **31**, 1323–1333
- Diaz, A., Horjales, E., Rudiño-Piñe, E., Arreola, R., and Hansberg, W. (2004) Unusual Cys-Tyr covalent bond in a large catalase. *J. Mol. Biol.* **342**, 971–985
- Switala, J. and Loewen, P.C. (2002) Diversity of properties among catalases. *Arch. Biochem. Biophys.* **401**, 145–154
- Carlsson, G.H., Nicholls, P., Svistunen, D., Berglund, G.I., and Hajdu, J. (2005) Complexes of horseradish peroxidase with formate, acetate, and carbon monoxide. *Biochemistry.* **44**, 635–642
- Nicholls, P., Fita, I., and Loewen, P.C. (2001) Theoretical study of the mechanisms of substrate recognition by catalase. *Adv. Inorg. Chem.* **51**, 51–106
- Kirkman, H.N., Rolfo, M., Ferraris, A.M., and Gaetani, G.F. (1999) Mechanisms of protection of catalase by NADPH: Kinetics and stoichiometry. *J. Biol. Chem.* **274**, 13908–13914
- Gaetani, G.F., Ferraris, A.M., Sanna, P., and Kirkman, H.N. (2005) A novel NADPH:(bound) NADP+ reductase and NADH:(bound) NADP+ transhydrogenase function in bovine liver catalase. *Biochem. J.* **385**, 763–768
- Margoliash, E., Novogrodsky, A., and Schejter, A. (1960) Irreversible reaction of 3-amino-1,2,4-triazole and related inhibitors with the protein of catalase. *Biochem. J.* **74**, 339–348
- Diaz, A., Muñoz-Clares, R.A., Rangel, P., Valdés, V.J., and Hansberg, W. (2005) Functional and structural analysis of catalase oxidized by singlet oxygen. *Biochimie.* **87**, 205–214
- Chance, B. (1952) The effect of pH upon the equilibria of catalase compounds. *J. Biol. Chem.* **194**, 483–496
- Bravo, J., Fita, I., Ferrer, J.C., Ens, W., Hillar, A., Switala, J., and Loewen, P.C. (1997) Identification of a novel bond between a histidine and the essential tyrosine in catalase HPII of *Escherichia coli*. *Protein Sci.* **6**, 1016–1023

DISCUSSÃO

PERSPECTIVAS

5 – DISCUSSÃO

Diversos atributos contribuem coletivamente para o sucesso de fungos patogênicos durante infecção, um deles é a capacidade de resistir aos danos causados pelas espécies reativas de oxigênio (ERO) produzidas pelas células efetoras do hospedeiro. Esta resistência poder ser alcançada pela indução de antioxidantes enzimáticos, tais como catalases e superóxido dismutases também pela utilização de moléculas antioxidantes não-enzimáticas, que possivelmente devem contribuir de forma independente ou correlacionada na proteção do fungo as espécies reativas de oxigênio. Três catalases monofuncionais, A, B e P, e pelo menos duas catalases bifuncionais foram identificadas no genoma de *P. brasiliensis*.

De acordo com nossos estudos, foram detectadas em géis não desnaturantes, três atividades de catalases distintas, aqui denominadas de *PbCATA*, *PbCATP* e *PbCATC*. A catalase com menor mobilidade em gel de poliacrilamida não desnaturante foi designada como *PbCATA*, uma vez que é reconhecida por anticorpos contra o ortólogo em *N. crassa* (Schliebs *et al.*, 2006). A catalase com resolução intermediária foi designada *PbCATP*, o que foi confirmado por espectrometria de massa. A espécie com maior mobilidade foi designada como *PbCATC*, caracterizada como catalase-peroxidase, como demonstrado pela reação ao substrato o-dianisina.

As catalases identificadas foram diferencialmente expressas nas fases de levedura e micélio, sendo a catalase peroxissomal (*PbCATP*) mais expressa em células leveduriformes, enquanto as catalases A e C apresentaram uma maior expressão na fase miceliana. Uma expressão diferencial de catalases tem sido amplamente observada durante a diferenciação morfológica de fungos. Em *N. crassa* catalase 1 (homóloga a *PbCATA*) apresentou uma maior expressão em conídios, enquanto que a catalase 3 (homóloga a catalase B) mostrou uma maior atividade durante o crescimento exponencial do micélio (Michán *et al.*, 2003). Em *A. nidulans*, quatro catalases foram identificadas. A

CATB induzida durante desenvolvimento de hifas, CATD com maior atividade durante crescimento estacionário e CATA envolvida nas fases iniciais de germinação dos conídios (Kawasaki e Aguirre, 2001; Oh *et al.*, 2010). As análises reforçam o papel das catalases no controle de ERO durante a diferenciação celular de fungos.

As catalases monofuncionais *PbCATA* e *PbCATP* e também a catalase peroxidase *PbCATC*, foram substancialmente reguladas em resposta a diferentes condições de estresse. Uma maior indução de *PbCATP* foi observada em resposta ao tratamento com H₂O₂ e seu transcrito mostrou-se induzido em células leveduriformes durante fagocitose por macrófagos em um modelo *ex vivo*. Nossos resultados reforçam o conceito de que *PbCATP* poderia estar relacionada a proteção do fungo contra condições de estresse oxidativo exógeno. A expressão de *PbCATA* foi predominantemente aumentada em células cultivadas em meio contendo ácido oléico como fonte de carbono. Adicionalmente, o transcrito codificante para *PbCATA* foi também induzido em células leveduriformes infectando macrófagos. Uma vez no interior dos fagossomos, fungos patogênicos direcionam seu metabolismo para adaptação e sobrevivência neste ambiente hostil. Em *C. albicans* durante a fagocitose observa-se uma indução de enzimas envolvidas na β -oxidação para utilização de ácidos-graxos do hospedeiro como fonte de energia (Vialás *et al.*, 2009). O aumento na expressão de *Pbcata* em resposta a internalização por macrófagos poderia sugerir que *P. brasiliensis* nesta condição, estaria exposto a altas concentrações de peróxido produzidos pela indução da β -oxidação de lipídeos durante fagocitose. Em células de *P. brasiliensis* submetidas ao tratamento de agentes osmoestressantes e a condições de choque térmico, foi possível observar um aumento de atividade de *PbCATC*, semelhante a catalase peroxidase CATC de *A. nidulans* (Balázs *et al.*, 2010). Os resultados observados sugerem que a proteína possa conferir proteção ao fungo às ERO também geradas durante estes tratamentos.

Adicionalmente, as espécies de catalases A e P foram significativamente induzidas durante a transição de micélio para levedura. Em *P. brasiliensis* uma série de genes envolvidos na manutenção do potencial redoxi intracelular e proteção contra o estresse oxidativo são mais expressos durante a transição dimórfica, sugerindo que durante o processo de diferenciação poderia existir um estado hiperoxidante, como descrito para outros microorganismos (Nunes *et al.*, 2005; Bastos *et al.*, 2007; Papapostolou & Georgiou, 2010). Além disso, o tratamento de células leveduriformes a 42°C não promoveu indução das catalases A e P, sugerindo que a diferença de atividade de ambas as proteínas durante a diferenciação não é uma consequência direta da temperatura de incubação, mas está correlacionada com alterações na morfologia celular, conforme descrito em *H. capsulatum* (Johnson *et al.*, 2002).

Uma vez que *Pb* CATP é induzida em condições de estresse oxidativo exógeno, esta proteína foi isolada de células de levedura tratadas com 15mM de H₂O₂. Foram realizados passos consecutivos de precipitação e cromatografia de filtração em gel para aquisição da proteína purificada. A purificação foi validada utilizando espectrometria de massa. Adicionalmente, *Pb*CATP foi identificada em gel não desnaturante, com uma molécula de 244 kDa, sugerindo uma molécula homotetramérica. Resultados semelhantes foram observados para a catalase-1 purificada de *N. crassa*. Neste organismo, os dados indicaram que a catalase-1 nativa, como a maioria das catalases monofuncionais, poderia ser considerada um homotetrâmero (Diaz *et al.*, 2004).

Adicionalmente, o comportamento cinético de *Pb*CATP foi diferenciado em baixas concentrações de H₂O₂ em relação a altas concentrações. Semelhante a outras oxidoredutases (Carlsson *et al.*, 2005), todos os catalases de subunidade pequena são inibidas por altas concentrações de substrato (Kirkman & Gaetani, 2007; Domínguez *et al.*, 2010). Esta susceptibilidade de inibição pelo seu próprio substrato, H₂O₂, pode ser

prevenida através de ligações com o NADPH (Kirkman *et al.*, 1999). A adição de NADPH estimulou a atividade da *PbCATP* purificada, de uma maneira dose-dependente, provavelmente impedindo a inativação devido os danos oxidativos do substrato, como foi relatado para outras catalases de subunidade pequena (Gaetani *et al.*, 2005).

Ainda, o tratamento de *PbCATP* com inibidores específicos para catalases monofuncionais, mostraram que a proteína purificada foi sensível a compostos que interagem com seu sítio ativo e grupo heme, incluindo azidas, hidroxí aminas e aminotriazol. O comportamento inibitório foi semelhante ao observado para outras catalases monofuncionais de subunidade pequena (Switala & Loewen, 2002; Díaz *et al.*, 2005). A proteína purificada mostrou ainda uma alta capacidade de resistência à inativação por condições ácidas, temperatura e agentes desnaturantes, como a maioria de catalases de subunidade pequena. A alta resistência a estas condições desnaturantes se deve possivelmente a uma inter-relação dos aminoácidos entre os monômeros em catalases monofuncionais (Bravo *et al.*, 1997).

A expressão diferencial das catalases de *P. brasiliensis* identificadas neste estudo reflete a complexidade do sistema de defesa antioxidante em fungos dimórficos e ajuda na compreensão dos mecanismos de resposta a produção de ERO.

6– PERSPECTIVAS/ TRABALHOS EM DESENVOLVIMENTO

Considerando os resultados obtidos as seguintes perspectivas são propostas:

- Purificação das demais catalases de *P. brasiliensis*;
- Caracterização enzimática das catalases nativas purificadas;
- Obtenção de anticorpos para as catalases A, P e C do fungo;
- Avaliação da localização celular destas proteínas em *P. brasiliensis*;
- Análise do papel das catalases de *P. brasiliensis* na proteção as EROs produzidas por diversas condições de estresse e durante a interação parasito-hospedeiro;
- Avaliação transcricional e proteômica dos possíveis fatores relacionados à proteção de *P. brasiliensis* ao estresse oxidativo;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abad, A., Fernández-Molina, J. V., Bikandi, J., Ramírez, A., Margareto, J., Sendino, J., Hernando, F. L., Pontón, J., Garaizar, J., Rementeria, A., 2010. What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. *Rev Iberoam Micol* 27(4): 155-182.
- Abrashev, R. I., Pashova, S. B., Stefanova, L. N., Vassilev, S. V., Dolashka-Angelova, P. A., Angelova, M. B., 2008. Heat-shock-induced oxidative stress and antioxidant response in *Aspergillus niger* 26. *Can J Microbiol* 54(12): 977-983.
- Alpsoy, L., Yalvac, M. E., 2011. Key roles of vitamins A, C, and E in aflatoxin B1-induced oxidative stress. *Vitam Horm* 86: 287-305.
- Bailão, A.M., Schrank, A., Borges, C.L., Dutra, V., Walquíria, I., Molinari-Madlum, E.E., Soares, Felipe. M.S., Mendes-Giannini, M.J., Martins, W.S., Pereira, M., 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(12-13): 2686-2697.
- Bailão, A.M., Shrank, A., Borges, C.L., Parente, J.A., Dutra, V., Felipe, M.S.S., Fiúza, R. B., Pereira, M., Soares, C.M.A., 2007. The transcriptional profile of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells is influenced by human plasma. *FEMS Immunol Med Microbiol* 51(1): 43-57.
- Balázs, A., Pócsi, I., Hamari, Z., Leiter, E., Emri, T., Miskei, M., Oláh, J., Tóth, V., Hegedus, N., Prade, R. A., Molnár, M., Pócsi, I., 2010. AtfA bZIP-type transcription factor regulates oxidative and osmotic stress responses in *Aspergillus nidulans*. *Mol Genet Genomics* 283(3): 289-303.
- Bastos, K.P., Bailão, A.M., Borges, C.L., Faria, F.P., Felipe, M.S., Silva, M.G., Martins, W.S., Fiúza, R.B., Pereira, M., Soares, C.M., 2007. The transcriptome analysis of early morphogenesis in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium reveals novel and induced genes potentially associated to the dimorphic process. *BMC Microbiol* 10: 7-29.

- Bravo J., Fita, I., Ferrer, J. C., Ens, W., Hillar, A., Switala, J., Loewen, P. C., 1997. Identification of a novel bond between a histidine and the essential tyrosine in catalase HP11 of *Escherichia coli*. *Protein Sci* 6: 1016-1023.
- Brummer, E., Hanson, L.H., Restrepo, A., Stevens, D.A., 1989. Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: killing and restriction of multiplication by activated macrophages. *Infect Immun* 57(8): 2289-2294.
- Calera, J. A., Paris, S., Monod, M., Hamilton, A. J., Debeaupuis, J. P., Diaquin, M., López-Medrano, R., Leal, F., Latgé, J. P., 1997. Cloning and disruption of the antigenic catalase gene of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* 65: 4718-4724.
- Cáp, M., Váchová, L., Palková Z., 2009. Yeast colony survival depends on metabolic adaptation and cell differentiation rather than on stress defense. *J Biol Chem* 284(47): 32572-32581.
- Carlsson, G. H., Nicholls, P., Svistunenko, D., Berglund, G. I., Hajdu, J., 2005. Complexes of horseradish peroxidase with formate, acetate, and carbon monoxide. *Biochemistry* 44: 635-642.
- Chauhan, N., Latge, J.P., Calderone, R., 2006. Signalling and oxidant adaptation in *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Nat Rev Microbiol* 4(6), 435-444.
- Chelikani, P., Fita, I., Loewen, P.C., 2004. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci* 61(2): 192-208.
- Díaz, A., Horjales, E., Rudiño-Piñe, E., Arreola, R., Hansberg, W., 2004. Unusual Cys-Tyr covalent bond in a large catalase. *J Mol Biol* 342(3): 971-985.
- Ding, M., Clayton. C., Soldati, D., 2000. *Toxoplasma gondii* catalase: are there peroxisomes in *Toxoplasma*? *J Cell Scien* 113: 2409-2419.

Domínguez, L., Sosa-Peinado, A., Hansberg, W., 2010. Catalase evolved to concentrate H₂O₂ at its active site. *Arch Biochem Biophys* 500(1): 82-91.

Drakulic, T., Temple, M.D., Guido, R., Jarolim, S., Breitenbach, M., Attfield, P.V., Dawes, I.W., 2005. Involvement of oxidative stress response genes in redox homeostasis, the level of reactive oxygen species, and ageing in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 5(12): 1215-1228.

Fonseca, C.A., Jesuino, R.S., Felipe, M.S., Cunha, D.A., Brito, W.A., Soares, C.M.A., 2001. Two-dimensional electrophoresis and characterization of antigens from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect* 3(7): 535-542.

Gaetani, G. F., Ferraris, A. M., Sanna, P., Kirkman, H. N., 2005. A novel NADPH:(bound) NADP⁺ reductase and NADH:(bound) NADP⁺ transhydrogenase function in bovine liver catalase. *Biochem J* 385: 763-768.

Hartmann, T., Sasse, C., Schedler, A., Hasenberg, M., Gunzer, M., Krappmann, S., 2011. Shaping the fungal adaptome-stress responses of *Aspergillus fumigatus*. *Int J Med Microbiol* 301(5): 408-416.

Heller, J., Tudzynski, P., 2011. Reactive oxygen species in phytopathogenic fungi: signaling, development, and disease. *Annu Rev Phytopathol* 49: 369-390.

Johnson, C.H., Klotz, M.G., York, J.L., Kruff, V., McEwen, J.E., 2002. Redundancy, phylogeny and differential expression of *Histoplasma capsulatum* catalases. *Microbiology*. 148, 1129-1142.

Kawasaki, L., Aguirre, J., 2001. Multiple catalase genes are differentially regulated in *Aspergillus nidulans*. *J Bacteriol* 183: 1434-1440.

Kim, I.S., Moon, H.Y., Yun, H.S., Jin, I., 2006. Heat shock causes oxidative stress and induces a variety of cell rescue proteins in *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377. *J Microbiol* 44(5): 492-501.

Kirkman, H. N., Rolfo, M., Ferraris, A. M., Gaetani, G. F., 1999. Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry. *J Biol Chem* 274: 13908-13914.

Kirkman, H. N., Gaetani, G.F., 2007. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *Trends Biochem Sci* 32(1): 44-50.

Kniemeyer, O., Schmidt, A. D., Vödisch, M., Wartenberg, D., Brakhage, A. A., 2011. Identification of virulence determinants of the human pathogenic fungi *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* by proteomics. *Int J Med Microbiol* 301(5): 368-377.

Kusch, H., Engelmann, S., Bode, R., Albrecht, D., Morschhäuser, J., Hecker, M., 2008. A proteomic view of *Candida albicans* yeast cell metabolism in exponential and stationary growth phases. *Int J Med Microbiol* 298(3-4): 291-318.

Lai, T., Li, B., Qin, G., Tian, S., 2010. Oxidative damage involves in the inhibitory effect of nitric oxide on spore germination of *Penicillium expansum*. *Curr Microbiol* 62(1): 229-234.

Lai, T., Li, B., Qin, G., Tian, S., 2010. Oxidative damage involves in the inhibitory effect of nitric oxide on spore germination of *Penicillium expansum*. *Curr Microbiol* 62(1):229-234.

Lee, S. F., Pervaiz, S., 2011. Assessment of oxidative stress-induced DNA damage by immunofluorescent analysis of 8-oxodG. *Methods Cell Biol* 103:99-113.

Loew, O., 1901. Catalase, a new enzyme of general occurrence with special reference to the tobacco plant, U.S. Department of Agriculture Report 68:7-47.

Mathioni, S. M., Beló, A., Rizzo, C. J., Dean, R. A., Donofrio, N. M., 2011. Transcriptome profiling of the rice blast fungus during invasive plant infection and in vitro stresses. *BMC Genomics* 19: 12-49.

McEwen, J. G., Sugar, A. M., Brummer, E., Restrepo, A., Stevens, D. A., 1984. Toxic effect of products of oxidative metabolism on the yeast form of *Paracoccidioides brasiliensis*. J Med Microbiol 18: 423-428.

Meloni-Bruneri, L. H., Campa, A., Abdalla, D. S. P., Calich, V. L. G., Lenzi, H. L., Burger, E., 1998. Neutrophil oxidative metabolism and killing of *Paracoccidioides brasiliensis* after air pouch infection of susceptible and resistant mice. J Leuk Biol 59: 526-553.

Michán, S., Lledías, F., Baldwin, J.D., Natvig, D.O., Hansberg, W., 2002. Regulation and oxidation of two large monofunctional catalases. Free Radic Biol Med 33(4): 521-532.

Michán, S., Lledías, F., Baldwin, J.D., Natvig, D.O., Hansberg, W., 2002. Regulation and oxidation of two large monofunctional catalases. Free Radic Biol Med 33(4): 521-32.

Morales, H. C. E., Padilla, G. I. E., Gonzalez, H. G. A., Salazar, S. E., Torres, G. J. C., 2010. Catalase overexpression reduces the germination time and increases the pathogenicity of the fungus *Metarhizium anisopliae*. Appl Microbiol Biotechnol 87(3): 1033-1044.

Morales, H. C. E., Padilla, G. I. E., Gonzalez, H. G. A., Salazar, S. E., Torres, G. J. C., 2010. Catalase overexpression reduces the germination time and increases the pathogenicity of the fungus *Metarhizium anisopliae*. Appl Microbiol Biotechnol 87(3): 1033-1044.

Moreira, S.F., Bailão, A.M., Barbosa, M.S., Jesuino, R.S., Felipe, M.S., Pereira, M., Soares, C.M.A., 2004. Monofunctional catalase P of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification, characterization, molecular cloning and expression analysis. Yeast 21(2): 173-182.

Nakagawa, Y., Kanbe, T., 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(6): 395-403.

Nasution, O., Srinivasa, K., Kim, M., Kim, Y. J., Kim, W., Jeong, W., Choi, W., 2008. Hydrogen peroxide induces hyphal differentiation in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 7(11): 2008-2011.

Noguchi, R., Banno, S., Ichikawa, R., Fukumori, F., Ichiishi, A., Kimura, M., Yamaguchi, I., Fujimura, M., 2007. Identification of OS-2 MAP kinase-dependent genes induced in response to osmotic stress, antifungal agent fludioxonil, and heat shock in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* 44(3): 208-218.

Nunes, L.R., Costa de Oliveira, R., Leite, D.B., da Silva, V.S., dos Reis Marques, E., da Silva Ferreira, M.E., Ribeiro, D.C., de Souza Bernardes, L.A., Goldman, M.H., Puccia, R., 2005. Transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* cells undergoing mycelium-to-yeast transition. *Eukaryot Cell* 4(12): 2115-28.

Oh, Y. T., Ahn, C. S., Kim, J. G., Ro, H. S., Lee, C. W., Kim, J. W., 2010. Proteomic analysis of early phase of conidia germination in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* 47(3): 246-253.

Papapostolou, I., Georgiou, C. D., 2010. Superoxide radical is involved in the sclerotial differentiation of filamentous phytopathogenic fungi: identification of a fungal xanthine oxidase. *Fungal Biol* 114(5-6): 387-395.

Paris, S., Prevost, M.C., Latge, J.P., Garrison, R.G., 1986. Cytochemical study of the yeast and mycelial cell walls of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Exp Mycol* 10: 228-242.

Pereira, M., Bailão, A. M., Parente, J. A., Borges, C. L., Salem-Izacc, S. M., Soares, C. M. A., 2009. Preferential transcription of *Paracoccidioides brasiliensis* genes: host niche and time-dependent expression. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104(3): 486-491.

- Qin, G., Liu, J., Cao, B., Li, B., Tian, S., 2011. Hydrogen peroxide acts on sensitive mitochondrial proteins to induce death of a fungal pathogen revealed by proteomic analysis. PLoS One 6(7): 21945-21952.
- Rapleye, C.A., Goldman, W.E., 2006. Defining virulence genes in the dimorphic fungi. Annu Rev Microbiol 60: 281-303.
- Rizzo, A. M., Berselli, P., Zava, S., Montorfano, G., Negroni, M., Corsetto, P., Berra, B., 2011. Endogenous Antioxidants and Radical Scavengers. Adv Exp Med Biol 698: 52-67.
- Rodrigues, D.R., Dias-Melicio, L.A., Calvi, S.A., Peraçoli, M.T., Soares, A.M., 2007. *Paracoccidioides brasiliensis* killing by IFN-gamma, TNF-alpha and GM-CSF activated human neutrophils: role for oxygen metabolites. Med Mycol 45(1): 27-33.
- Roetzer, A., Klopff, E., Gratz, N., Marcet-Houben, M., Hiller, E., Rupp, S., Gabaldón, T., Kovarik, P., Schüller, C., 2011. Regulation of *Candida glabrata* oxidative stress resistance is adapted to host environment. FEBS Lett 585(2): 319-327.
- Santos, S. S., Ferreira, K. S., Almeida, S. R., 2011. *Paracoccidioides brasiliensis* - induced migration of dendritic cells and subsequent T-cell activation in the lung-draining lymph nodes. PLoS One 6(5): 19690-19695.
- Scandalios, J.G., 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. Braz J Med Biol Res 38(7): 995-1014.
- Schliebs, W., Würtz, C., Kunau, W.H., Veenhuis, M., Rottensteiner, H., 2006. A eukaryote without catalase-containing microbodies: *Neurospora crassa* exhibits a unique cellular distribution of its four catalases. Eukaryot Cell 5(9): 1490-502.
- Shibuya, K., Paris, S., Ando, T., Nakayama, H., Hatori, T., Latgé, J.P., 2006. Catalases of *Aspergillus fumigatus* and inflammation in aspergillosis. Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi 47(4): 249-255.

Silva, S. S, Paes, H. C., Soares, C. M., Fernandes, L., Felipe, M. S., 2008. Insights into the pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis* from transcriptome analysis-advances and perspectives. *Mycopathologia* 165(4-5): 249-258.

Tanabe, S., Ishii-Minami, N., Saitoh, K., Otake, Y., Kaku, H., Shibuya, N., Nishizawa, Y., Minami, E., 2011. The role of catalase-peroxidase secreted by *Magnaporthe oryzae* during early infection of rice cells. *Mol Plant Microbe Interact* 24(2):163-171.

Tighe, S., Hunter, T., Reed, P., Murray, J., 2011. Microarray analysis for *Saccharomyces cerevisiae*. *J Vis Exp* 7(50): 2585-2592.

Vialás, V., Nogales-Cadenas, R., Nombela, C., Pascual-Montano, A., Gil, C., 2009. Proteopathogen, a protein database for studying *Candida albicans*--host interaction. *Proteomics* 9: 4664-4668.

Wang, N., Yoshida, Y., Hasunuma, K., 2007. Loss of Catalase-1 (Cat-1) results in decreased conidial viability enhanced by exposure to light in *Neurospora crassa*. *Mol Genet Genomics* 277(1): 13-22.

Wang, N., Yoshida, Y., Hasunuma, K., 2007. Loss of Catalase-1 (Cat-1) results in decreased conidial viability enhanced by exposure to light in *Neurospora crassa*. *Mol Genet Genomics* 277(1): 13-22.

Wang, N., Yoshida, Y., Hasunuma, K., 2007. Loss of Catalase-1 (Cat-1) results in decreased conidial viability enhanced by exposure to light in *Neurospora crassa*. *Mol Genet Genomics* 277(1): 13-22.

Yin, Z., Stead, D., Walker, J., Selway, L., Smith, D. A., Brown, A. J., 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(20): 4686-4703.

Zámocký, M., Koller, F., 1999. Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. *Prog Bioph Molec Biol* 72: 19-66.

Zancopé-Oliveira, R. M., Reiss, E., Lott, T. J., Mayer, L. W., Deepe, G. S. JR., 1999. Molecular cloning, characterization, and expression of the M antigen of *Histoplasma capsulatum*. *Infect. Immun.* 67, 1947-1953.