

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

LUIZ PAULO ARAÚJO DOS SANTOS

Metabolismo do propionato em Paracoccidioides lutzii

Goiânia - Goiás 2015





TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: [X] Dissertação [] Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

sistema de bibliotecas ufo

Nome completo do autor: Luiz Paulo Araújo dos Santos

Título do trabalho: Metabolismo do propionato em Paracoccidioides lutzii

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento [X] SIM [] NÃO1

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Assinatura do(a) autor(a)

Ciente e de acordø Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 25 10612018

- Solicitação de registro de patente;

Versão atualizada em setembro de 2017.

Publicação como capítulo de livro;

Submissão de artigo em revista científica;

² A assinatura deve ser escaneada.

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo. Casos de embargo:

Publicação da dissertação/tese em livro.

LUIZ PAULO ARAÚJO DOS SANTOS

Metabolismo do propionato em Paracoccidioides lutzii

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Mestre em Medicina Tropical e Saúde Pública.

Orientador: Dr. Alexandre Melo Bailão

Goiânia - Goiás 2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA Rua 235, s/n – Setor Universitário - Goiânia/GO – CEP: 74605-050 Fones: (62) 3209.6362 - 3209.6102 – Fax: (62) 3209.6363 – e-mail : ppgmtsp.ufg@gmail.com



ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE LUIZ PAULO ARAÚJO DOS SANTOS - Aos trinta dias do mês de janeiro do ano de 2015 (30/01/2015), às 14:30 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. ALEXANDRE MELO BAILÃO, ELISA FLÁVIA LUIZ CARDOSO BAILÃO e CLAYTON LUIZ BORGES, para, sob a presidência do primeiro, e em sessão pública realizada no INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: "METABOLISMO DO PROPIONATO EM Paracoccidioides sp", em nível de MESTRADO, área de concentração em MICROBIOLOGIA, de autoria de LUIZ PAULO ARAÚJO DOS SANTOS, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo Orientador, Prof. Dr. Alexandre Melo Bailão, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou o Candidato sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida ao autor da dissertação que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca argüiu o Candidato, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de argüição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1081/2012 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública a Banca, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando o candidato Aprovado ou Reprovado:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Alexandre Melo Bailão Profa. Dra. Elisa Flávia Luiz Cardoso Bailão

Prof. Dr. Clayton Luiz Borges

Aprov	ado /	Rep	prova	do	
Ap	NOVE	00			
Gory	nac	do			_
A	mou	ad	0		
	1	1)	11		

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidato $\underline{14011400}$, (Habilitado ou não Habilitado), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de MESTRE EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, na área de concentração em MICROBIOLOGIA, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às $\underline{12}$ h $\underline{00}^{\circ}$ min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de tese e para constar eu, JOSÉ CLEMENTINO DE OLIVEIRA NETO, secretário do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim em duas vias de igual teor.

A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Dissertação:

Prof. Dr. Alexandre Melo Bailão (ICB/UFG) Profa. Dra. Elisa Flávia Luiz Cardoso Bailão (UEG/GO) Prof. Dr. Clayton Luiz Borges (ICB/UFG) Secretário da Pós-Graduação:

1

ssinatura

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno (a): Luiz Paulo Araújo dos Santos

Orientador (a): Dr. Alexandre Melo Bailão

Membros:

- 1. Dr. Alexandre Melo Bailão UFG
- 2. Dr. Clayton Luiz Borges UFG
- 3. Dra. Elisa Flávia Luiz Cardoso Bailão UEG

Suplentes:

- 1. Dra. Patrícia de Sousa Lima UFG
- 2. Dra. Lílian Cristiane Baeza UFG
- 3. Dra. Luciana Casaletti UFG

Data: 30/01/2015

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ser minha fonte de inspiração, protetor e guia. Quem, profundamente por fé, creio ter me dado a oportunidade de desenvolver este trabalho e conhecer pessoas dignas de admiração pela sua postura, tanto frente ao trabalho quanto frente às demais coisas da vida.

Agradeço aos meus pais por sempre darem o máximo de si na criação dos filhos e por me apoiar em tudo.

Agradeço ao meu orientador, Alexandre, por ser um exemplo de dedicação profissional, por sua disposição em sempre ajudar, por ser tão atencioso, não somente com seus alunos, mas com todos que dele precisam. Dessa relação profissional, não levo apenas a honra de tê-lo como meu orientador, mas o privilégio de ter a sua amizade.

Agradeço ao professor Clayton, pelos sábios conselhos, por sempre ter ajudado quando precisei, por ser um exemplo de dedicação e ética profissional, por ter me acolhido e dado toda atenção necessária a que eu me sentisse parte desse grupo quando iniciei no laboratório. Eu, profundamente, agradeço a sua amizade, ela sempre estará na minha memória.

À professora Célia por ser um exemplo de chefe. Uma mulher com tamanha força de espírito que eu ainda não tinha conhecido. Foi uma grande honra tê-la conhecido.

Às professoras Juliana, Mirelle, Ana Flávia, Elisa e Maristela pelo apoio e amizade.

Aos meus amigos Leandro, André e Gabriel, que além de terem contribuído para a execução deste trabalho, são grandes companheiros.

Aos meus amigos Lucas Nojosa, Igor Godinho e demais companheiros de trabalho, obrigado pela ajuda nos momentos em que foi preciso.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a execução deste trabalho.

A todos os demais companheiros que formam a família "LBM" e transformam os dias de trabalho em ótimos momentos.

Muito Obrigado!

Dedico este trablalho aos meus pais, Celismar e Niuza, e à minha irmã Najany. São eles os meus companheiros de todas as horas

SUMÁRIO

v
vii
viii
ix
x
1
1
1
3
4
8
15
16
16
16
17
17
17
18
19
M 20
21
י ב סס
22

 4.9 – Produção, purificação e atividade específica da proteína recombinante MCS de <i>P. lutzii</i>
4.9.1 – Clonagem do gene codificante para metilcitrato sintase
4.9.2 – Produção e purificação da MCS recombinante23
4.10 – Preparação da amostra, análise por NanoUPLC-MS ^E e análises de
bioinformática24
RESULTADOS27
5.1 – Identificação de enzimas do ciclo do metilcitrato codificadas por
Paracoccidioides spp27
5.2 – Viabilidade de <i>P. lutzii</i> em propionato29
5.3 Crescimento de <i>P. lutzii</i> em propionato
5.4 – O propionato induz a expessão dos genes mcs, mcd, mcl e pcl
5.5 – O propionato induz o aumento de atividade da metilcitrato sintase
5.6 – Produção, purificação e atividade enzimática da MCS de <i>P. lutzii</i>
5.7 - O perfil proteômico da levedura de P. lutzii em propionato apresentou aumento
da quantidade de enzimas do CMC39
DISCUSSÃO51
CONCLUSÕES
PERSPECTIVAS60
REFERÊNCIAS61

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1	Número de acesso do GenBank das enzimas utilizadas neste estudo19
Tabela 2	Meio quimicamente definido MMcM20
Tabela 3	Oligonucleotídeos usados na qPCR22
Tabela 4	Análise de identidade das enzimas do CMC do complexo <i>Paracoccidioides</i> com outros fungos 27
Tabela 5	Identidade das enzimas PCL, MCS, MCD e MCL entre <i>P. lutzii</i> e <i>P. brasiliensis</i> isolado 03 e 18
Tabela 6	Atividade de metilcitrato sintase em extrato citoplasmático e secretado de micélio e levedura de <i>P. lutzii</i> incubado em glicose, glicose com propionato ou propionato 37
Tabela 7	Parâmetros bioquímicos da MCS de P. lutzii
Tabela 8	Relação de proteínas induzidas em Propionato e classificação funcional41
Tabela 9	Relação de proteínas reprimidas em Propionato e classificação funcional
Figura 1	Distribuição geográfica da paracoccidioidomicose5
Figura 2	Pacientes com paracoccidioidomicose aguda6
Figura 3	Os ciclos do ácido cítrico, glioxilato e metilcitrato9
Figura 4	Fluxograma representativo das atividades desenvolvidas durante o trabalho
Figura 5	Organização genômica (A) e esquema representativo (B) das sequências codificantes para as proteínas MCS (<i>mcs</i>), MCD (<i>mcd</i>) e MCL (<i>mcl</i>) de <i>P. lutzii</i>
Figura 6	Análise de viabilidade do fungo em diferentes fontes de carbono
Figura 7	Análise do crescimento do fungo em meio líquido em diferentes fontes de carbono
Figura 8	Análise de crescimento de <i>P. lutzii</i> em MMcM sólido33
Figura 9	Quantificação dos transcritos <i>mcs</i> , <i>mcd</i> , <i>mcl</i> e <i>pcl</i> durante incubação em diferentes fontes de carbono 35
Figura 10	Indução e purificação da MCS recombinante com resina Ni- NTA

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection "Coleção de Cultura de Tipo Americano" (tradução nossa)
ATP	Adenosina trifosfato
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> "Ferramenta de Busca e Alinhamento Local Básico" (tradução nossa)
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CoA	Coenzima A
COBALT	<i>Constraint-based Multiple Protein Alignment Tool</i> "Ferramenta de Alinhamento Proteico Múltiplo Baseado em Restrição" (tradução nossa)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
GFP	Proteína verde fluorescente
IFN	Intérferon
11	Interleucina
kDo	Quiledalten
	Constante de Michaelie, Monton
	Maio sintático de sulture Mol/sigh Morton
	Disuelectídes de significación adenina factata
INI-IN I A	
μν Db	Peso por volume
PD Dh04	
PDUI Dh01 liles	
PD01-like	Especie filogenetica <i>Pb</i> 01-like
PD02	Isolado 2 de Paracoccidioides brasiliensis
PD03	Isolado 3 de Paracoccidioides brasiliensis
PD18	Isolado 18 de Paracoccidioides prasiliensis
PD339	Isolado 339 de Paracoccidioides brasiliensis
PDEpm83	Isolado Epm83 de Paracoccidioides brasiliensis
PCR	Reação em cadela da polímerase
рн	Potencial hidrogenionico
р <i>і</i>	
P52	Especie filogenetica 2 do genero Paracoccidioides
P53	Especie illogenetica 3 do genero <i>Paracoccidioldes</i>
	Ácido ribonucloico
	Espésis filogenétics 1 de gênere Beressesidioides
	Col do Dodopil cultoto do pódio o poliporilomido
SDS-FAGE	Ser de Douecil-Sullato de Soulo e pollacilianida
sp.	Espécie
зрр. тыс	Especies Estar de nocrose tumoral
Ll ma protoína ⁻¹	Laidade de atividade por miligrama de proteína por minute
	High Derformance/Prossure Liquide Chromotography
	"Cromatografia líquida de alta performance"
V/K.	Ficiância catalítica
v/rm v/v	
V/V	

RESUMO

Micro-organismos patogênicos podem encontrar em nichos do hospedeiro diferentes fontes de carbono geradoras de propionil-CoA, dentre elas, o propionato. Este composto é tóxico para a célula se acumulado no seu interior, e pode ser gerado nos tecidos do hospedeiro pelo metabolismo dos aminoácidos isoleucina, valina e metionina, ou pelo metabolismo de ácidos graxos de cadeia ímpar. Portanto, durante a infecção, o metabolismo de propionil-CoA a um nutriente não tóxico e aproveitável energeticamente se faz de grande relevância. Contudo, não há estudos sobre a via de metabolização de propionil-CoA em fungo do gênero Paracoccidioides, causador da paracoccidioidomicose, uma micose sistêmica de alta incidência na América Latina. Sendo assim, para caracterização de qual via metabólica este organismo utiliza para metabolização de propionil-CoA, foi feita uma busca dos genes codificantes para enzimas do ciclo do metilcitrato no genoma de Paracoccidioides spp. e foram identificados genes codificantes para as três enzimas exclusivas desse ciclo, as quais são metilcitrato sintase, metilcitrato desidrogenase e metilcitrato liase. Após análise de crescimento e viabilidade, a qual demonstrou que Paracoccidioides lutzii utiliza propionato como fonte de carbono, foi feita a análise de expressão gênica das enzimas do ciclo do metilcitrato e observou-se que são reguladas em resposta ao propionato. Adicionalmente, a atividade enzimática da MCS demonstrou que essa enzima é ativa no interior da célula fúngica ou mesmo quando é secretada. Além disso, foi demostrada sua capacidade de atuar também como uma citrato sintase. Por fim, o perfil proteômico de *P. lutzii* em propionato mostrou a indução do ciclo do metilcitrato, ciclo do glioxilato, metabolismo de aminoácidos e gliconeogênese, e a repressão de vias como glicólise, fermentação e síntese de ácidos graxos, os quais demonstram o rearranjo metabólico para suprir a demanda energética celular metabolizando propionato. Neste sentido, entender os mecanismos pelo qual P. lutzii lança mão para metabolizar propionil-CoA permite a compreensão dos mecanismos de adaptação metabólica que esse fungo lança mão em diferentes nichos de colonização.

Palavras-chave: *Paracoccidioides lutzii*, paracoccidioidomicose, ciclo do metilcitrato.

ABSTRACT

Pathogens can find different carbon sources in host niches generating propionyl-CoA, among them propionate. This compound is toxic to the organism if accumulated within the cell, and can be generated in the host tissue by the metabolism of amino acids isoleucine, valine and methionine, or by the metabolism of odd-chain fatty acids. Therefore, during infection, the propionyl-CoA metabolism to nontoxic nutrient and usable energetically is of great relevance. Nonetheless, there are no studies about the propionyl-CoA metabolization pathway in fungi of the genus Paracoccidioides, causer of paracoccidioidomycosis, a systemic mycosis of high incidence in Latin America. Thus, to characterize of which metabolic pathway this fungus utilizes to propionyl-CoA metabolization, it was made a search the genes coding to enzymes of methylcitrate cycle in genome of *Paracoccidioides* spp. and were identified genes coding to the three exclusive enzymes of this cycle, which are methylcitrate synthase, methylcitrate dehydrogenase and methylcitrate lyase. After analysis of growth and viability, which demonstrated that Paracoccidioides lutzii utilizes propionate as carbon source, it was made gene expression analysis of enzymes of methylcitrate cycle and was observed that are regulated in response to propionate. Additionally, the enzymatic activity of the MCS showed that this enzyme is active inside of fungal cells and also when is secreted, as well as its dual capacity of to act with a citrate synthase and metylcitrate synthase. Finally, the proteomic profile of P. lutzii in propionate showed enzymes induction of methylcitrate cycle, glyoxylate cycle, amino acid metabolism and gluconeogenesis, and the repression of glycolytic pathway, fermentation and fatty acid synthesis, which demonstrated of metabolic rearrangement to supply the cellular energetic demand, metabolizing propionate. In this sense, to understand the mechanism of propionyl-CoA metabolism in P. lutzii provides data for visualization of metabolic adaptation that this fungus makes use in different colonization of niches.

Keywords: Paracoccidioides lutzii, paracoccidioimycosis, methylcitrate cycle.

1.1 – Aspectos gerais

Paracoccidioides inclui as Ο gênero espécies Paracoccidioides brasiliensis e Paracoccidioides lutzii (TEIXEIRA et al., 2009), ambos agentes etiológicos da paracoccidioidomicose (PCM) (RESTREPO-MORENO, 1970), uma importante micose sistêmica endêmica na América Latina (RESTREPO et al., 2005). Paracoccidioides spp. são fungos com dimorfismo térmico, o que é importante para a sobrevivência desses organismos em diferentes nichos (CONTI-DIAZ, 2007). Estes organismos apresentam-se como micélio, forma infectiva e saprobiótica, no ambiente a temperaturas entre 15 e 28 °C, e como levedura quando cultivado in vitro a 36 ºC ou nos tecidos do hospedeiro (BAGAGLI et al., 2006; BARROZO et al., 2009). A forma miceliana desses fungos pode ser caracterizada por filamentos septados com conídios terminais ou intercalares. Já as leveduras são distinguidas por apresentarem brotamentos múltiplos originados por evaginações da célula mãe. Portanto, há uma célula central circundada por várias células periféricas, microscopicamente similar à roda de leme de navio (QUEIROZ-TELLES, 1994; RESTREPO-MORENO, 2003).

1.2 – Classificação Taxonômica

O fungo Paracoccidioides spp. foi descrito pela primeira vez em São Paulo, no ano de 1908, por Adolpho Lutz, que isolou esse microrganismo, o qual foi previamente denominado de Zymonema brasiliensis por Splendore, em 1912, a partir de pacientes que apresentavam granulomas ganglionares e lesões na mucosa. No ano de 1930, Almeida caracterizou o fungo como do gênero Paracoccidioides e da espécie brasiliensis, após comparações com Coccidioides immitis. Em 1991 o fungo Paracoccidioides brasiliensis foi classificado como pertencente ao reino Fungi, divisão Eumycota, subdivisão Deuteromycotina, ordem Moniliales, Moniliaceae, Hyphomycetes, família classe gênero Paracoccidioides, espécie brasiliensis (LACAZ et al., 1991). A inserção do fungo no filo Ascomycota, ordem Onygenales e família Onygenaceae, juntamente com outros fungos dimórficos, tais como *Blastomyces dermatitidis* e *Histoplasma capsulatum*, foi realizada por Leclerc e colaboradores (1994). Essa classificação de *Paracoccidioides* spp. proposta por Leclerc foi realizada através de comparações entre sequências de DNA da subunidade ribossomal maior 25S de dermatófitos e fungos dimórficos. Apesar de ainda não ser identificada a fase teleomórfica ou sexuada do fungo, dados moleculares evolutivos revelaram a possibilidade de haver um ciclo sexual no gênero *Paracoccidioides* (TEIXEIRA et al., 2013b).

Matute e colaboradores (2006) realizaram estudos filogenéticos baseados na análise de oito regiões de cinco genes nucleares em 65 isolados de *P. brasiliensis* classificando-os, assim, em três diferentes espécies filogenéticas, são elas a S1, PS2 e PS3. Contendo 38 isolados, a S1 é composta de amostras endêmicas do Brasil, Argentina, Paraguai, Peru e Venezuela. A PS2 localizada-se no Brasil (5 isolados) e Venezuela (1 isolado). A PS3, contendo 21 isolados, é endêmica da Colômbia. Todas as três espécies são capazes de produzir doença em animais infectados, mas a PS2 apresenta menor virulência. Eventos vicariantes, provavelmente, foram os responsáveis pela divergência entre as espécies filogenéticas S1/PS2 e *P. lutzii* e o isolamento geográfico, em PS3 (THEODORO et al., 2012).

Carrero e colaboradores (2008) analisaram as relações filogenéticas de 21 isolados pertencentes às espécies filogenéticas S1 e PS3 por meio da comparação de sequências de regiões codificadoras e ITS (sequência espaçadora interna – "*internally transcribed sequence*") e observaram que um dos isolados, o *Pb*01, se diferenciava claramente dos demais e poderia ser uma nova espécie do gênero *Paracoccidioides*.

Posteriormente, Teixeira e colaboradores (2009), usando o GCPSR (método de concordância genealógica de reconhecimento de espécies filogenéticas – "genealogic concordance method of phylogenetic species recognition"), identificaram um clado de 17 isolados genotipicamente similares, incluindo o *Pb*01, os quais são distinguidos a partir dos clados S1, PS2 e PS3. Posteriormente, agruparam os 17 isolados em um grupo chamado "*Pb*01-like" e propuseram uma nova espécie chamada *P. lutzii* como um tributo a Adolpho Lutz. Adicionalmente, foram identificados alguns outros aspectos que marcam a

diferença entre as espécies do gênero *Paracoccidioides*, por exemplo: a falta de fluxo gênico entre *P. brasiliensis* e *P. lutzii* (THEODORO et al., 2012), características genômicas únicas como tamanho do genoma e conteúdo gênico, expansão/contração de família de proteínas, diferentes disposições de elementos transponíveis (MARINI et al., 2010; DESJARDINS et al., 2011), diferentes morfologias dos conídeos (TEIXEIRA et al., 2009; THEODORO et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2013a). Além disso, é possível observar uma clara diferença metabólica entre isolados pertencentes aos grupos filogenéticos, definidas por análise proteômica comparativa entre representantes das espécies do gênero *Paracoccidioides* (PIGOSSO et al., 2013)

Atualmente, com base em análises filogenéticas moleculares, Paracoccidioides spp. é classificado como pertencendo ao reino Fungi, filo Ascomycota, subdivisão Euascomycotina, classe Plectomyceto, subclasse família Euascomycetidae, ordem Onygenales, Onygenaceae, subfamília Onygenaceae Anamórficos, gênero Paracoccidioides, espécies brasiliensis (SAN-BLAS et al., 2002) e lutzii (TEIXEIRA et al., 2009).

1.3 – Aspectos ecológicos de Paracoccidioides spp.

Os fungos podem ser encontrados em boa parte do planeta (TRABULSI et al., 2008). No caso de *Paracoccidioides* spp., discute-se que ocorra normalmente em ambientes úmidos (TERCARIOLI et al., 2007). Este fungo foi isolado a partir da água, de plantas (RESTREPO et al., 2001) e de solo, das regiões de Botucatu, São Paulo (MONTENEGRO et al., 1996) e Venezuela (DE ALBORNOZ, 1971). Tercarioli e colaboradores (2007) demonstraram que o fungo tem melhor desenvolvimento em solos úmidos arenosos e argilosos. Por outro lado, em solos ácidos com alta quantidade de alumínio observou-se inibição de seu crescimento. Além disso, o fungo tem maior crescimento em solos que estão de alguma forma protegidos, em geral, por vegetação ou ao abrigo subterrâneo, o que justifica o isolamento desse organismo a partir de aerossois no interior de tocas de tatus (ARANTES et al., 2013).

Estudos da ocorrência de casos de PCM aguda e subaguda na região de Botucatu - SP, mostraram uma relação diretamente proporcional da doença com a umidade do ar. A umidade favorece o desenvolvimento do fungo e, consequentemente, da doença (BARROZO et al., 2009; BARROZO et al., 2010). Outros nichos em que foram identificados o Paracoccidioides spp. incluem animais silvestres e domésticos. Pela amplificação de seguências de nucleotídeos do fungo por Nested-PCR utilizando tecidos de animais silvestres, permitiu-se a detecção de Paracoccidioides spp. a partir das espécies de tatus Dasypus novemcinctus, Dasypus septemcinctus, Cabassous centralis (CORREDOR et al., 2005; BAGAGLI et al., 2006), morcego frugívoro Artibeus lituratus (GREER et al., 1977), pinguim da Antártida Uruguaiana Pygoscelis adeliae (GARCIA et al., 1993), porco-da-índia Cavia aperea, porco-espinho Sphingurrus spinosus, guaxinim Procyon cancrivorus, furão Gallictis vittata (DA COSTA et al., 1978; RICHINI-PEREIRA et al., 2008) e macacos (COSTA et al., 1995). Portanto, a infecção de animais silvestres é comum em áreas endêmicas (BAGAGLI et al., 2003). Além disso, animais domesticados também são potenciais alvos de infecção por Paracoccidioides spp. O fungo já foi isolado a partir de cachorros (RICCI et al., 2004), gatos (GONZALEZ et al., 2010) e cavalos (CONTI-DIAZ et al., 1972), sendo que em cachorros e gatos a manifestação clínica da PCM foi diagnosticada. Entretanto, os organismos acima descritos devem ser considerados hospedeiros acidentais e não reservas naturais do fungo, pois podem desenvolver a doença (CONTI-DIAZ, 2007).

1.4 – Paracoccidioidomicose

A distribuição geográfica da PCM se estende desde o México à Argentina (Figura 1). Contudo, as áreas de maior prevalência estão incluídas na América do Sul e Central, sendo que o Brasil, Colômbia, Venezuela, Equador e Argentina são os países com o maior número de casos da doença (RESTREPO-MORENO, 1994; RAMOS et al., 2008). Nestas áreas, a incidência estimada de casos clínicos é de 1 a 3 para cada 100.000 habitantes (COUTINHO et al., 2002).



Figura 1 – Distribuição geográfica da paracoccidioidomicose (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

Esta doença já foi apontada como causadora de aproximadamente metade dos óbitos por micose sistêmica no Brasil e as maiores taxas de mortalidade se concentram em São Paulo e Paraná (PRADO et al., 2009). Também foram diagnosticados casos de PCM fora das áreas endêmicas como Europa, Estados Unidos da América e Ásia (JOSEPH et al., 1966; CHIKAMORI et al., 1984; AJELLO et al., 1985).

A PCM é uma micose sistêmica granulomatosa (MARQUES, 1998). Seu espectro de manifestação vai desde a forma assintomática até à forma disseminada e, em alguns casos, chegando a ser fatal. Dados experimentais e clínicos suportam que a principal forma de infecção do hospedeiro se faz pela inalação de propágulos do micélio de *Paracoccidioides* spp. Ao atingirem os alvéolos pulmonares, os propágulos diferenciam-se em levedura, a forma parasitária (MCEWEN et al., 1987; SAN-BLAS et al., 2002; TEIXEIRA et al., 2013a). As leveduras induzem uma reação inflamatória inicial que poderá progredir, dependendo do sistema imune, estado nutricional e sexo do hospedeiro (FRANCO, 1987), e da virulência dos diferentes isolados do patógeno (SAN-BLAS et al., 2001; PANUNTO-CASTELO et al., 2003). Esses fatores podem contribuir para a manifestação dos sinais clínicos da PCM, ou para regreção da doença, com a destruição dos fungos (MCEWEN et al., 1995; CAMARGO et al., 2000; VALERA et al., 2008). Portanto, a primeira interação entre patógeno e hospedeiro

ocorre nos alvéolos pulmonares. A partir dos pulmões, o fungo pode disseminarse através das vias hematogênica e/ou linfática, chegando a outras diferentes regiões do organismo, como fígado, baço, ossos e sistema nervoso central (SAN-BLAS, 1993; DE CAMARGO et al., 2000; VALERA et al., 2008).

As formas clínicas aguda e subaguda da PCM foram classificadas no Colóquio Internacional de PCM, realizado no ano de 1986 em Medellín, Colômbia. A forma aguda, também denominada de forma juvenil, pode ser classificada como moderada ou severa. Acomete, principalmente, crianças e jovens (abaixo de 30 anos de idade), e afeta homens e mulheres igualmente (Figura 2). Representa de 3 a 5% dos relatos descritos da doença e é caracterizada pelo envolvimento do sistema fagocítico mononuclear. Os sintomas incluem febre, perda de peso e anemia média a moderada. Os sinais e sintomas de icterícia obstrutiva podem surgir quando os linfonodos hepáticos são afetados. O fígado e o baço são frequentemente aumentados e a medula óssea pode ser afetada. Múltiplas lesões na pele e mucosa podem ocorrer. Em aproximadamente 50% dos casos o trato digestivo é afetado, como determinado por análises radiológicas (MARTINEZ, 1992).



Figura 2 – Pacientes com paracoccidioidomicose aguda. A – massas ganglionares na região submandibular, cervical e supraclavicular; B – linfoadenomegalia; C – lesões de aspecto verruciforme e ulceradas na face e pavilhão auricular; D – lesões pápulo-nodular ulceradas (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

A forma subaguda, também denominada adulta ou crônica, representa mais de 90% dos casos e pode ser classificada em uni- e multifocais baseado-se nos tipos de lesões. Essa forma da doença afeta em torno de dez vezes mais homens do que mulheres, com idade entre 30 e 60 anos, e progride lentamente (MONTENEGRO, 1986; FRANCO et al., 1987; BRUMMER et al., 1993). A maior incidência da doença entre indivíduos do sexo masculino pode ser justificada pelo fato de que os homens que vivem em áreas rurais e trabalham na agricultura estão em maior contato com o solo (BRUMMER et al., 1993). Também foram descritos focos em regiões urbanas, o que pode estar relacionado à migração da população rural para essas áreas (BLOTTA et al., 1999).

Outra causa para o aumento da doença em indivíduos do sexo masculino é proposta por Restrepo e colaboradores (1984). Neste trabalho, foi analisada a transição morfológica de 3 isolados de Paracoccidioides spp. na presença do 17β-estradiol, hormônio presente em mulheres em idade reprodutiva, e observou-se que a transição de micélio para levedura havia diminuído. Portanto, as mulheres em idade reprodutiva teriam maior resistência ao desenvolvimento da doença, uma vez que a transição de micélio para levedura é passo crucial para o estabelecimento da infecção. Aristizabal e colaboradores (1998) chegaram a resultados similares ao avaliar a transição do fungo durante a infecção em camundongos machos e fêmeas. Nas fêmeas, a transição não ocorreu. Além da proteção hormonal, Pinzan e colaboradores (2010) mostraram a maior produção das citocinas IL-12, IFN-γ e TNF-α por células do baço de camundongos fêmeas do que de machos, em resposta à glicoproteína paracoccina de Paracoccidioides spp. Por outro lado, células de camundongos machos apresentaram maior produção de IL-10, o que sugere uma resposta imunológica divergente entre os diferentes sexos. Além disso, os macrófagos provenientes de camundongos fêmeas apresentaram maior produção de óxido nítrico, o que pode estar relacionado com a maior mortalidade de leveduras internalizadas por macrófagos oriundos de camundongos desse sexo. Portanto, a proteção dos indivíduos fêmeas ao desenvolvimento da PCM estendem-se desde o nível hormonal até o imunológico.

1.5 – Origem e vias de degradação de Propionil-CoA

Os fungos são organismos ubíquos, não autótrofos e decompositores, podendo ser patogênicos ou não. Para sobreviverem, assimilam das mais variadas fontes de carbono como, por exemplo, celulose, amido, carboidratos e ácidos graxos, dependendo apenas de suas especificidades metabólicas e do nicho colonizado (TRABULSI et al., 2008).

Durante o processo infeccioso, organismos patogênicos destroem o tecido circundante e há, consequentemente, a liberação de proteínas. Por exemplo, o genoma de *Paracoccidioides* spp. e *A. fumigatus* contém vários genes codificantes para proteases (REMENTERIA et al., 2005; BAILÃO et al., 2006; TACCO et al., 2009; PARENTE et al., 2010), as quais são responsáveis por essa destruição/liberação permitindo, assim, a assimilação de nutrientes a partir da degradação tecidual e proteica do hospedeiro. Entretanto, os produtos da degradação ou metabolização de alguns nutrientes podem gerar metabólitos, como o propionil-CoA, que em altas concentrações intracelulares são tóxicos às células (BROCK et al., 2004).

Este metabólito é gerado pelo catabolismo de aminoácidos de cadeia ramificada, tais como isoleucina, valina e metionina, liberados pela ação das proteases durante o processo infeccioso, ou ácidos graxos de cadeia ímpar dos mais diversos, como o valerato ou propionato, conhecido também como ácido propiônico (BROCK et al., 2004; ZHANG et al., 2004; MAERKER et al., 2005).

Depois do acetato, o propionato é a segunda fonte de carbono mais abundante no solo, o qual é formado por processos fermentativos a partir de carboidratos e muitos aminoácidos (BUCKEL, 1999; CONRAD et al., 1999). Apesar da sua toxicidade, muitas bactérias e fungos são capazes de usar propionato como fonte de carbono e de energia sob condições aeróbias, uma vez que o ciclo do metil citrato (CMC) lhes conferem esta propriedade (BROCK et al., 2000).

Quando fungos ou bactérias são crescidos em ácidos graxos como principal fonte de carbono, a β-oxidação de ácidos graxos é intensificada para ajudar a suprir a demanda energética celular. A β-oxidação de ácidos graxos de cadeia par gera, exclusivamente, unidades de acetil-CoA, derivadas da quebra da

cadeia carbônica a cada dois carbonos. Já a β-oxidação de ácidos graxos de cadeia ímpar gera acetil-CoA (KORNBERG et al., 1957; CRONAN et al., 1996) e, os últimos três carbonos da cadeia geram propionil-CoA. As moléculas de acetil-CoA servirão de intermediário no ciclo ácido cítrico (Figura 3-A) e, em caso de anaplerose, no ciclo do glioxilato (Figura 3-B). Por outro lado, as moléculas de propionil-CoA serão convertidas a piruvato pelo CMC (Figura 3-C).



Figura 3 – Os ciclos do ácido cítrico, glioxilato e metilcitrato. As unidades de acetil-CoA e propionil-CoA podem ser metabolizadas pelos ciclos do ácido cítrico (A) e metilcitrato (C), respectivamente. A anaplerose durante o crescimento em ácidos graxos como substrato é ativada pelo metabolismo de acetil-CoA via ciclo do glioxilato (B). Em vermelho estão as enzimas exclusivas do ciclo do metilcitrato. CS – citrato sintase, MCS – metilcitrato sintase, MCD – metilcitrato desidrogenase, MCL – metilisocitrato liase, ACN – aconitase, ICD – isocitrato desidrogenase, ICL1 – isocitrato liase isoforma 1, ICL2 – isocitrato liase isoforma 2, CGD – complexo α -cetoglutarato desidrogenase, SCS – succinil-CoA sintetase, SCD – succinato desidrogenase, FUM – fumarase, MLS – malato sintase, MLD – malato desidrogenase. Adaptado de Muñoz-Elias e colaboradores (2006).

O CMC foi primeiro descoberto em micro-organismos eucarióticos por Tabuchi e colaboradores, os quais reportaram a produção do metilisocitrato a partir de *n*-alcanos de cadeia ímpar em *Candida lipolytica* resistente a ácido fluoroacético (TABUCHI et al., 1974a; TABUCHI et al., 1974b). Evidências posteriores da existência do CMC foram obtidas pela detecção de enzimas necessárias e exclusivas a este ciclo, as quais são a metilcitrato sintase (EC 2.3.3.5; MCS), metilcitrato desidratase (EC 4.2.1.79; MCD) e a metilisocitrato liase (EC 4.1.3.30; MCL) (TABUCHI et al., 1975; TABUCHI et al., 1995). Outras são compartilhadas com os ciclos do ácido cítrico e glioxilato, como malato desidrogenase (MLD) e aconitases (ACN).

Embora a propionil-CoA ligase (PCL), não integre o CMC, essa enzima pode estar participando do metabolismo de propionil-CoA. Essa participação se faz pela adição do grupo CoASH ao propionato após ser internalizado pela célula do organismo que for utilizar dessa fonte de carbono. Portanto, mesmo não integrando o CMC, a PCL também poderia estar participando do metabolismo de propionato juntamente com o CMC.

A MCS é a enzima chave do CMC e é essencial para a degradação do propionil-CoA. Esta enzima é responsável pela condensação de propionil-CoA com oxaloacetato produzindo, portanto, o metilcitrato. Por sua vez, o metilcitrato sofre uma desidratação pela MCD gerando metil-*cis*-aconitato que, posteriormente, é reidratado a metilisocitrato pela ACN. A clivagem do metilisocitrato é via MCL, gerando os produtos piruvato e succinato, intermediários do ciclo do ácido cítrico (Figura 3-C). Em alguns organismos, a MCS mostrou atividade de CS e MCS, atuando na condensação de acetil-CoA e oxaloacetato a citrato, no ciclo do ácido cítrico, além de sua função no CMC (UCHIYAMA et al., 1976; BROCK et al., 2000; MUNOZ-ELIAS et al., 2006; KOBAYASHI et al., 2013). Dentre alguns exemplos, encontram-se espécies do gênero Aspergillus, os quais são A. nidulans (BROCK et al., 2000; ZHANG et al., 2004), A. fumigatus (MAERKER et al., 2005) e A. niger (KOBAYASHI et al., 2013).

Em *A. nidulans*, a deleção do gene codificante para a enzima chave MCS levou à relação inversamente proporcional entre a quantidade de propionil-CoA e a síntese de policetídeos, além do retardo do crescimento celular (ZHANG et al., 2004). Adicionalmente, a alta concentração intracelular de propionil-CoA estaria

inibindo, por inibição competitiva, as enzimas piruvato desidrogenase, succinil-CoA sintetase, a ATP-citrato liase e o metabolismo da glicose. Além disso, o metabolismo secundário também foi afetado pelo acúmulo de propionil-CoA, sendo que a formação de precursores de melanina foi inibida em altas concentrações deste metabólito (MAERKER et al., 2005). O metilisocitrato, um dos intermediários do CMC, também mostrou potencial toxicidade, especialmente por inibir a isocitrato-desidrogenase-NADP-dependente, também por inibição competitiva (BROCK, 2005).

Tem sido reportado que a supressão de genes das enzimas exclusivas do ciclo do metilcitrato impede o crescimento dos mutantes no hospedeiro. Em *M. tuberculosis*, o nocaute dos genes *prpDC*, codificantes para MCD e MCS, respectivamente, fez com que essa bactéria fosse incapaz de crescer em meio com propionato ou em macrófagos primários de murinos, mas não houve a alteração de virulência em camundongos (MUNOZ-ELIAS et al., 2006). Por outro lado, a inabilidade de *A. fumigatus* remover o propionil-CoA reduz, consideravelmente, a capacidade de o fungo estabelecer aspergilose invasiva em camundongos. Adicionalmente, durante a infecção pulmonar de camundongos, foi observado o aumento da expressão do gene para a MCS, o que sugere a participação do CMC na metabolização de propionil-CoA durante o crescimento invasivo (IBRAHIM-GRANET et al., 2007).

Além do CMC, outras vias bioquímicas que contribuem no metabolismo do propionil-CoA têm sido propostas. Os mamíferos, por exemplo, convertem propionil-CoA a metilmalonil-CoA e, finalmente, a succinil-CoA via metilmalonil-CoA mutase (LEDLEY et al., 1991; TEXTOR et al., 1997; HORSWILL et al., 1999; LONDON et al., 1999; BROCK et al., 2000; BRAMER et al., 2001; BRAMER et al., 2002; CLAES et al., 2002; CHANDLER et al., 2005). Nesta via, a metilmalonil-CoA mutase é a enzima chave e depende da coenzima B₁₂. Como esta via não opera em fungos, justifica-se, desse modo, a utilização do CMC nestes organismos para metabolizar propionil-CoA (LEDLEY et al., 1991). Em mamíferos, desordens no metabolismo de propionil-CoA podem levar a doenças severas como acidemia propiônica e metilmalônica. Os sintomas das doenças incluem desde complicações neurológicas até falência grave de órgãos (DEODATO et al., 2006).

Outra via proposta, diferentemente do que classicamente tem sido descrito para a maioria dos fungos e bactérias, é a β-oxidação modificada. Otzen e colaboradores (2014) demonstraram que propionil-CoA, em Candida albicans, é tendo 3-hidroxipropionato metabolizado por essa via. como um dos intermediários, o qual tem sido identificado também em plântulas incubadas na presença de propionato marcado com ¹³C (LUCAS et al., 2007), em insetos (HALARNKAR et al., 1989), em algumas bactérias tais como Rhodococcus erythropolis (LEE et al., 2009) e, notavelmente, em leveduras de Candida rugosa (HASEGAWA et al., 1982; MIYAKOSHI et al., 1987). No estudo de Otzen e colaboradores (2014), foram pesquisados genes codificantes para as enzimas do CMC em C. albicans através de busca por homólogos de genes de A. fumigatus e Saccharomyces cerevisae. Não foram encontrados genes codificantes para MCS, MCD ou MCL em C. albicans, bem como não apresentou atividade de MCS. Ademais, a busca no genoma de C. albicans pelo gene da enzima metilmalonil-CoA mutase foi realizada mas este não foi encontrado, demonstrando que neste organismo a via da metilmalonil-CoA mutase dependente da coenzima B12 também não é utilizada para metabolizar propionil-CoA. Contudo, o fungo foi capaz de metabolizar propionato e crescer nessa condição de incubação, o que demonstra que, embora não possua o CMC nem a via da metilmalonil-CoA mutase dependente da coenzima B₁₂ para metabolização de fontes geradoras de propionil-CoA, pode utilizar este metabólito por alguma outra via. Com isso, após análise proteômica e deleção de genes, foi constatado que enzimas como enoil-CoA hidratase/desidrogenase, 3-hidroxipropionil-CoA hidrolase, 3hidroxipropionato desidrogenase malonato semialdeído е desidrogenase essencialmente contribuiem para a degradação de propionil-CoA e sua conversão a acetil-CoA. Inclusive, a deleção do gene da 3-hidroxipropionato desidrogenase revelou atenuação da virulência de C. albicans em camundongos murinos, sugerindo que este organismo utiliza nutrientes do hospedeiro que geram propionil-CoA, o qual requer a via da β-oxidação modificada para sua posterior utilização.

Em *Paracoccidioides* spp., embora ainda não hajam estudos de caracterização de qual via metaboliza propionil-CoA, aparentemente é o CMC que opera nesse processamento. O que justifica essa afirmativa é o fato de enzimas

putativas do CMC terem sido identificadas em trabalhos que fizeram análise proteômica de *Paracoccidioides* spp. (REZENDE et al., 2011; WEBER et al., 2012; PIGOSSO et al., 2013).

Análises proteômicas comparativas das fases de desenvolvimento de *P. lutzii*, incluindo micélio, transição de micélio para levedura e levedura, identificaram 81 proteínas diferencialmente expressas. Dentre estas, as enzimas dos ciclos do glioxilato (ICL) e do metilcitrato (MCD) foram mais abundantes na forma de levedura do fungo, enquanto que a MCS foi mais abundante durante a transição de micélio para levedura, sugerindo que estas vias metabólicas podem ser importantes para o estabelecimento do fungo e desenvolvimento da infecção (REZENDE et al., 2011).

Pigosso e colaboradores (2013) realizaram o proteoma comparativo entre as quatro espécies do gênero *Paracoccidioides*, são eles: o *P. lutzii* (*Pb*01) e *P. brasiliensis*; *Pb*339 (S1), *Pb*2 (PS2) e *Pb*Epm83 (PS3). Foram identificadas 193 proteínas diferencialmente expressas entre os isolados. Dentre elas, a MCS foi mais abundante em *P. lutzii*, a MCL mais abundante em *Pb*2 e a MCD foi mais abundante em *Pb*Epm83. A diferença de abundância das proteínas identificadas, dentre as quais encontram-se as específicas do CMC, revela que o fungo utiliza diferentes estratégias metabólicas notavelmente presentes nos diferentes grupos filogenéticos de *Paracoccidioides* spp.

Adicionalmente, embora o fungo *P. lutzii* apresente apenas 1 gene codificante para a MCS, em análise do p*I* e massa por gel bi-dimensional das proteínas secretadas pelas formas micélio e levedura do fungo, Weber e colaboradores (2012) identificaram 9 isoformas da MCS secretadas, sendo 4 por levedura, 1 por micélio e 4 comuns às 2 formas. Além disso, essa enzima foi significativamente mais abundante na fase de levedura de *P. lutzii*. Neste mesmo trabalho, foi realizada infecção de macrófagos *in vitro* com leveduras de *P. lutzii* e identificadas proteínas secretadas pelo fungo durante a fagocitose. Dentre as 18 proteínas identificadas, a MCD estava inclusa, comparativamente ao já exposto por Albuquerque e colaboradores (2008) que também identificaram as enzimas MCS e MCD em vesículas secretadas por *Histoplasma capsulatum* (ALBUQUERQUE et al., 2008).

Além disso, em estudo sobre a expressão diferencial de transcritos em condições de interação com o hospedeiro, observou-se que o teor de RNA mensageiro da MCD de Paracoccidioides sp. aumentou. Neste estudo, o fungo foi incubado com plasma humano e, posteriormente, recuperado a partir de fígado de camundongos infectados. Nestas duas condições que mimetizam o processo infeccioso houve aumento da expressão do gene codificante para MCD. A alteração da expressão desse gene sugere que o CMC pode contribuir para a patogênese de Paracoccidioides spp. em condições que mimetizam o processo infeccioso (BAILÃO et al., 2006; BAILÃO et al., 2007). Portanto, tendo em vista a participação do CMC no estabelecimento do processo infeccioso do hospedeiro por fungos e bactérias (BROCK et al., 2000; BROCK et al., 2001; BROCK, 2005; MAERKER et al., 2005; MUNOZ-ELIAS et al., 2006), a identificação das enzimas desse ciclo em análises proteômicas (PIGOSSO et al., 2013) e a alteração da expressão de genes codificantes para enzimas deste ciclo em condições que mimetizam a infecção (BAILÃO et al., 2006; BAILÃO et al., 2007), pode-se inferir que em Paracoccidioides spp. o CMC pode contribuir para o estabelecimento da paracoccidioidomicose.

JUSTIFICATIVA

Propionil-CoA é um metabólito secundário gerado pelo metabolismo de fontes de carbono como ácidos graxos de cadeia ímpar, propionato e os aminoácidos de cadeia ramificada isoleucina, valina e metionina. Estas fontes estão largamente distribuídas no solo, onde o fungo *Paracoccidioides* encontra-se saprobioticamente na forma de micélio, e nos tecidos do hospedeiro, disponíveis como consequência do processo invasivo do parasito. Entretanto, é demostrado que propionil-CoA, quando acumulado no interior das células, pode inibir o crescimento celular por competir com sítios de ligação de acetil-CoA. Sendo assim, as diferentes vias de metabolização de propionil-CoA são importantes para a conversão deste metabólito em fontes de energia utilizáveis pela célula.

Em estudos desenvolvidos com o gênero *Paracoccidioides*, dados trancricionais (BAILÃO et al., 2006) e proteômicos (PIGOSSO et al., 2013) demonstram que o ciclo do metilcitrato é uma via metabólica que pode estar sendo utilizada pelo fungo durante o processo infeccioso. Contudo, ainda não há estudos em *Paracoccidioides* que esclareçam a resposta metabólica desse organismo às fontes de carbono geradoras de propionil-CoA. Neste sentido, o detalhamento do ciclo do metilcitrato em *Paracoccidioides* pode fornecer dados que vão ajudar a compreender os mecanismos adaptativos deste fungo a seus diferentes nichos de colonização.

3.1 – Geral

Compreender o metabolismo de propionato em Paracoccidioides sp.

3.2 – Específicos

- Rastrear bancos de dados buscando genes relacionados com metabolismo de propionato nos genomas de *Paracoccidioides* spp.;
- Identificar via de metabolização de propionil-CoA em Paracoccidioides spp.;
- Analisar o crescimento e a viabilidade de *Paracoccidioides* em fontes de carbono geradoras de propionil-CoA;
- Analizar a expressão dos genes codificantes para as enzimas exclusivas do ciclo do metilcitrato em diferentes fontes de carbono;
- Purificar e realizar a atividade enzimática da MCS;
- Obter o perfil proteômico de Paracoccidioides na presença de propionato;
- Descrever as estratégias adaptativas do fungo na presença de propionato como fonte de carbono.

4.1 – Fluxograma

O fluxograma representativo das atividades desenvolvidas durante o trabalho é apresentado na Figura 4.



Figura 4 – Fluxograma representativo das atividades desenvolvidas durante o trabalho

4.2 – Isolado do fungo e condições de cultivo

A espécie do fungo utilizada nos ensaios experimentais foi o *P. lutzii*, anteriormente nomeado *Paracoccidioides brasiliensis*, isolado 01 (ATCC-MYA-826). O fungo foi cultivado e mantido em meio de cultura Fava-Netto sólido (FAVA-NETTO, 1995) na temperatura de 36 °C para a forma de levedura e utilizado após 7 dias de crescimento. A forma de micélio foi cultivada a 22 °C e utilizado após 15 dias de crescimento. Após crescidos, os fungos foram raspados do meio Fava-Netto sólido, inoculados no meio de cultura Fava-Neto líquido e crescidos sob agitação a 150 rpm por 72 horas a 36 °C para levedura e 5 dias a 22 °C para micélio. Os componentes do meio sólido são: 1% (g/mL) peptona;

0,5% (g/mL) extrato de levedura; 0,3% (g/mL) peptona proteose; 0,5% (g/mL) de extrato de carne; 0,5% (g/mL) NaCI; 4% (g/mL) glicose; 1% (g/mL) ágar; e pH 7,2. Ao meio líquido não foi adicionado ágar. Posteriormente, as células leveduriformes e micelianas foram lavadas com tampão fosfato salina (PBS 1X - 0,14 mM NaCI; 2,7 mM KCI; 1,8 mM KH₂HPO₄; 10 mM Na₂HPO₄; pH 7,3), centrifugadas a 1500 g por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. Este passo foi realizado duas vezes. As células leveduriformes foram ressuspendidas em 2 volumes de PBS 1X para 1 de fungo e submetidas à contagem com azul de tripan em câmera de *Neubauer*. O micélio foi quantificado em peso-úmido.

4.3 – Análises de bioinformática das enzimas do ciclo do metilcitrato de *Paracoccidioides* spp.

As sequências de aminoácidos no GenBank das enzimas de *A. fumigatus* e *A. nidulans* - metilcitrato sintase, metilcitrato desidratase, metilisocitrato liase e propionil-CoA ligase (PCL) - foram utilizadas para pesquisa de ortólogos codificados pelos genomas de *Paraccocidioides* spp. por já serem bem descritas na literatura (BROCK et al., 2000; BROCK et al., 2001; MAERKER et al., 2005). A pesquisa dessas sequências ortólogas e identidade entre as sequências de aminoácidos desses organismos foram determinadas usando a ferramenta online BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/) e COBALT (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/cobalt.cgi).

A predição da localização subcelular das enzimas foi realizada utilizando banco de dados online WoLF PSORT (http://wolfpsort.org/). A estrutura gênica e a sequência de aminoácidos das enzimas do CMC de *P. lutzii* foram obtidas no banco de dados BROAD *Institute*: (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/Paracoccidioides_brasiliensis/M ultiHome.html). Os números de acesso das enzimas utilizadas neste estudo estão listados na Tabela 1.

Descrição	An	Af	PI	<i>Pb</i> 03	<i>Pb</i> 18
Metilcitrato sintase	CBF71174	XP_747718	XP_002793640	EEH22113	EEH48631
Metilcitrato desidratase	CBF71152	XP_747704	XP_002793649	EEH22120	EEH48639
Metilcitrato liase	CBF78090	CAW40752	XP_002793639	EEH22112	EEH48630
Propionil-CoA ligase	CBF70755	EDP54326	XP_002789592	EEH22449	EEH49202
An - A nidulans: $Af - A$ fumigatus: $Pl - P$ lutzii: $Pb03 = Pb18 - P$ brasiliensis isolado 03 e 18					

Tabela 1 - Número de acesso do GenBank das enzimas utilizadas neste estudo

An - A. nidulans; Af - A. fumigatus; PI - P. lutzii; $Pb03 \in Pb18 - P$. brasiliensis isolado 03 e 18, respectivamente.

4.4 – Viabilidade e crescimento de P. lutzii em glicose e propionato

Após contagem, as células leveduriformes de *P. lutzii* foram inoculadas em meio líquido quimicamente definido MMcM (Tabela 2), em triplicata biológica, (RESTREPO et al., 1980). A concentração final de fungo utilizada foi de 1,0x10⁶ cel/mL contendo como fonte de carbono glicose, glicose e propionato ou somente propionato nas concentrações de 10 mM, 20 mM ou 50 mM, a 36 °C sob agitação de 150 rpm. A viabilidade das células fúngicas foi analisada nos tempos de 6, 24, 48 e 72 horas por contagem com azul de tripan na câmera de *Neubauer*. O cálculo de viabilidade foi feito levando em consideração a proporção de células viáveis, ou seja, metabolicamente ativas, em relação às células inviáveis ou metabolicamente inativas. O crescimento foi analisado sob as mesmas condições de incubação da análise de viabilidade de *P. lutzii*. O cálculo do crescimento foi feito levando em consideração o valor absoluto de células viáveis presentes no momento da contagem.

Меіо ММсМ		Solução de Vitaminas [*]		Solução de elementos traços ^{**}	
Componentes	Quantidade para 1000mL	Componentes	Quantidade para 100mL	Componentes	Quantidade para 100mL
KH ₂ PO ₄	1,5 g	Tiamina	6,0 mg	H ₃ BO ₃	5,7 mg
MgSO ₄ + 7 H ₂ O	0,5 g	Niacina B₃	6,0 mg	CuSO4.5H2O	15,7 mg
CaCl ₂ + 2 H ₂ O	0,15 g	Pantotenato de Ca ⁺² ou Na ⁺²	6,0 mg	Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ .6H ₂ O	140,4 mg
NH4SO4	2,0 g	Inositol B7	1,0 mg	MnSO4.14H2O	8,1 mg
L – asparagina	2,0 g	Biotina B ₈	0,1 mg	(NH4)6M07O24.4 H2O	3,6 mg
L – cistina	0,2 g	Riboflavina	1,0 mg	ZnSO4.7H2O	79,2 mg
Solução de vitaminas	10,0 mL	Ácido fólico B₀	10,0 mg	H₂O destilada (qsp)	100 mL
Solução de elementos traço	1,0 mL	Cloreto de colina	10,0 mg		
H₂O destilada (qsp)	1.000 mL	Piridoxina	10,0 mg		
		H₂O destilada (qsp)	100 mL		

 Tabela 2 - Meio quimicamente definido MMcM

4.5 – Crescimento em placa de *P. lutzii* em meio quimicamente definido MMcM

A análise de crescimento em meio sólido foi feita por plaqueamento do fungo em MMcM solidificado com ágar 1%, em triplicata biológica, sem ou com fonte de carbono. As condições com fonte de carbono são três: somente com glicose ou somente com propionato, ou contendo glicose e propionato na mesma incubação. As concentrações das fontes utilizadas foram 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM e 50 mM. Quando da incubação de glicose com propionato, foram utilizadas quantidades equimolares para cada concentração. O inóculo foi feito

sob diluição seriada de 10⁶, 10⁵, 10⁴ e 10³ células fúngicas de levedura e analisado após 10 dias de incubação a 36 °C.

4.6 – Extração de RNA, síntese de cDNA e ensaio de qPCR

Para extração de RNA total, as células leveduriformes e micelianas de P. *lutzii* foram inoculadas em meio líquido quimicamente definido MMcM (Tabela 2), em triplicata biológica (RESTREPO et al., 1980). A concentração final de levedura do fungo utilizada foi de 1,0x10⁶ cel/mL e a de micélio foi aproximadamente 1 g de peso úmido para 100 mL. As fontes de carbono utilizadas foram glicose, glicose e propionato ou somente propionato nas concentrações de 10 mM, 20 mM ou 50 mM a 36 °C para levedura e 22 °C para micélio sob agitação de 150 rpm. Posteriormente, as células foram centrifugadas a 1.500 g por 10 minutos a 4 °C e agitadas vigorosamente em tubos com micro pérolas de vidro, em aparelho Mini-Beadbeater (BioSpec, Oklahoma, USA), na presença do reagente trizol (GIBCO™ Invitrogen Corporation), conforme instruções do fabricante. Os cDNAs foram preparados usando high capacity RNA-to-cDNA kit (Apllied Biosystems, Foster City, CA, USA). O ensaio de PCR quantitativa (qPCR) foi realizado no aparelho Step One Plus[™] (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A ciclagem térmica da PCR foi realizada em 40 ciclos de 95 °C a 15 segundos, seguido por 60 °C a 1 minuto. Em cada grupo de experimentos de PCR quantitativa, os dados foram normalizados com os transcritos codificantes para α-tubulina. Um controle sem cDNA foi também incluído para eliminar possíveis contaminações ou reações não específicas. O mesmo volume foi agrupado e serialmente diluído 1:5 para gerar uma curva padrão relativa com 4 pontos. Os níveis de expressão relativa dos genes de interesse foram calculados usando o método de curva padrão para quantificação relativa (BOOKOUT et al., 2006). A especificidade de cada par de oligonucleotídeo foi analisada por meio da curva de aquecimento da reação. Os oligonucleotídeos usados no ensaio de PCR quantitativa estão listados na tabela 3.

Oligonucleotídeos	Sequência	Tamanho do amplicon (nt)	Número de acesso ^a
Tubulina senso	5' ACAGTGCTTGGGAACTATACC 3'	05	
Tubulina anti-senso	5' GGGACATATTTGCCACTGCC 3'	95	FAAG_01047.1
MCS senso	5' CATCTCAGTCTGCCGCTTG 3'	102	
MCS anti-senso	5' CTCGTTGGCATCCAGGACA 3'	192	FAAG_04550.1
MCD senso	5' CAACTCTGACCTTGCATTTGAT 3'	150	
MCD anti-senso	5' GATGTTGAAAGCACCGTTGAC 3'	150	FAAG_04559.1
MCL senso	5' CTTGTTACTTTCGATGAAGCGG 3'	121	DAAG 04540 1
MCL anti-senso	5' GATGTCCCAGGACCAGAACAC 3'	131	FAAG_04549.1
PCL senso	5' GATGTTGTCTTGATTTACATGCC 3'	145	DAAC 08517
PCL anti-senso	5' GTGGTTTCGATGCCTCGATG 3'	140	FAAG_00017

Tabela 3: Oligonucleotídeos usados na qPCR

^aNúmero de acesso – número de acesso das proteínas no banco de dados *Broad Institute*: (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/*Paracoccidioides_*brasiliensis/MultiHome.html).

4.7 – Extração proteica

As células leveduriformes de P. lutzii foram inoculadas em meio MMcM líquido com 10 mM de glicose, glicose e propionato ou somente com propionato na concentração final de 1,0x10⁶ cel/mL e as micelianas em aproximadamente 10 g de peso úmido para 100 mL. Tanto levedura quanto micélio foi incubado em triplicata biológica. Posteriormente, foram centrifugadas a 1.500 g por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi armazenado, liofilizado e ressuspendido em tampão (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl) para ensaio de atividade enzimática. As células foram ressuspendidas no mesmo tampão e submetidas à extração de proteínas citoplasmáticas por agitação vigorosa em tubos de extração com micro pérolas de vidro. A lise foi realizada em aparelho Mini-Beadbeater (BioSpec, Oklahoma, USA) durante 6 ciclos de 30 segundos, com intervalos de 1 minuto em gelo. Após lise mecânica, o extrato proteico foi centrifugado cinco vezes a 10.000 g para separação dos restos celulares insolúveis. O sobrenadante foi coletado e a sua concentração proteica foi determinada usando o reagente de Bradford (Sigma Aldrich, Co., St. Louis, MO). A proteína albumina bovina sérica foi usada como amostra padrão (BRADFORD, 1976). Quinze microgramas de extrato solúvel foram aplicados em gel SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970) para análise de integridade do extrato.

4.8 - Atividade enzimática da metilcitrato sintase
Após a extração proteica, os extratos foram utilizados para determinar a atividade da metilcitrato sintase. O método utilizado, como descrito previamente por (BROCK et al., 2004), foi baseado na formação de nitrotiofenolato (2durante a reação de 5,5'-ditiobis-(2mercapto-5-nitrobenzoato diânion) nitrobenzoato) (DTNB) com CoASH, o qual foi liberado durante a condensação de oxaloacetato com propionil-CoA. Foi utilizado como controle uma curva padrão de DTT (Ditiotreitol) por exercer função análoga ao grupo CoASH durante reação com DTNB. A curva foi realizada variando a concentração de 1 mM a 25 mM de DTT, contendo concentração fixa de DTNB a 1 mM. O volume final da reação foi ajustado para 150 µL com Tris/HCl pH 8,0 a 50 mM e o monitoramento realizado a 412 nm. Posteriormente, foram selecionados três pontos da curva para determinação da equação da reta. Para o ensaio, foram utilizados 3 µg de extrato proteico bruto; 1 mM de DTNB; 0,2 mM de propionil-CoA; e o volume final da reação ajustado para 150 µL com Tris/HCl pH 8,0 a 50 mM. O ensaio foi iniciado pela adição de 1 mM de oxaloacetato e monitorado a 412 nm. Uma unidade de atividade (U) foi definida como a liberação de 1 µmol de CoASH por miligrama de proteína por minuto.

4.9 – Produção, purificação e atividade específica da proteína recombinante MCS de *P. lutzii*

4.9.1 – Clonagem do gene codificante para metilcitrato sintase

Para amplificação do gene codificante para MCS por PCR, foi utilizado cDNA de *P. lutzii* como molde. Os oligonucleotídeos específicos foram desenhados de acordo com a sequência do gene codificante para MCS reportada para *Paracoccidioides brasiliensis* isolado 01 no banco de dados online BROAD, número de acesso PAAG_04550. Estes continham os sítios das enzimas de restrição compatíveis para clonagem no vetor de expressão pET43.1a.

4.9.2 – Produção e purificação da MCS recombinante

As células de *E. coli*, transformadas por eletroporação, foram cultivadas em 20 mL de meio de autoindução *Instant express* (Novagen) com ampicilina e cloranfenicol a 30 °C por 18 horas a 150 rpm. Após a incubação, as células foram coletadas por centrifugação, lavadas duas vezes com tampão Tris/HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 150 mM e então ressuspendidas no mesmo tampão. Após sonicação, o extrato celular livre foi aplicado à coluna de 1 mL de fluxo por gravidade *Ni-NTA* (Invitrogen). A coluna foi lavada com tampão Tris/HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, imidazol 30 mM. Então, a MCS foi eluída em 50 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, imidazol 200 mM. A concentração proteica do purificado foi determinada usando o reagente de Bradford (Sigma Aldrich, Co., St. Louis, MO). A proteína albumina bovina sérica foi usada na preparação da curva padrão da quantificação (BRADFORD, 1976). A amostra foi analisada em gel SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970). A MCS purificada foi utilizada para determinação dos parâmetros bioquímicos da enzima conforme previamente descrito (BROCK et al., 2000).

4.10 – Preparação da amostra, análise por NanoUPLC-MS^E e análises de bioinformática

As digestões proteicas foram realizadas como descrito previamente por (MURAD et al., 2011; MURAD et al., 2012), com algumas modificações. Após extração proteica do fungo incubado com glicose ou propionato a 10 mM e quantificação, como previamente descrito no tópico 4.7, procedeu-se concentração por ultrafiltração em equipamento Stirred Cell (Amicon) utilizando membrana de porosidade controlada de 3 kDa. Foram utilizados 150 µg dos extratos proteicos para digestão oriundos da mistura equimolar das triplicatas biológicas dos tratamentos. Após concentradas, as proteínas foram lavadas em tampão NH₄HCO₃ 50 mM, pH 8,5. As amostras foram coletadas em tupos de 1,5 mL e submetidas à ação do surfactante RapiGest SF[™] adicionando-se 100 µL da solução a 0.2% (v/v) (Waters Corp, Milford, MA). A solução foi submetida à breve agitação e incubada a 80°C por 15 minutos. Foram adicionados 2,5 µL de solução de agente redutor ditiotreitol (DTT) (GE Healthcare) a 100 mM e incubada a 60°C por 30 minutos. Em seguida, adicionou-se 2,5 µL da solução de iodoacetamina (GE Healthcare) a 300 mM com incubação ao abrigo da luz, por 30 minutos, à temperatura ambiente. A protease tripsina foi adicionada num volume de 25 µL a 50 ng/µL (Promega, Madison, WI, USA) e as amostras foram submetidas à vórtex e incubadas overnight a 37°C. Após a digestão tríptica, 10 µL de ácido trifluoroacético (TFA) (Sigma-Aldrich) a 5% (v/v) foi adicionado para hidrolisar o RapiGestTM com incubação a 37 °C por 90 minutos. As amostras foram centrifugadas a 18.000 g a 6 °C por 30 minutos. Os peptídeos digeridos foram secos à vácuo em speed vaccum e ressuspendidos em 80 µL de Formiato de Amônio a 20 mM e 20 µL MassPREP[™] Digestion Standard [rabbit phosphorilase B (PHB)] a 1.000 fmol/µL, utilizado como padrão de concentração. A concentração final de PHB foi de 200 fmol/µL. As amostras foram separadas por cromatografia líquida de ultra desempenho pelo sistema *nanoACQUITY*TM (Waters Corporation, Manchester, UK) que possui duas colunas de fase reversa em tandem usando as concentrações graduais crescentes (10, 14, 16, 20 e 65%) de acetonitrila (ACN) (Sigma-Aldrich) para a liberação dos peptídeos. Para a obtenção dos espectros de massas, foi utilizado o espectrômetro de massas modelo Synapt G1 HDMSTM mass spectrometer (Waters, Manchester, UK), utilizando nanoeletrospray como fonte de ionização e dois analisadores quadrupolo e tempo de voo (nanoESI-Q-TOF, Waters). O [Glu1]-Fibrinopeptide B (GFB) foi utilizado como padrão de massa para calibração sendo mensurada a cada 30 segundos. Quantidades iguais de peptídeos foram fracionados (1.900 ng) e três réplicas experimentais foram obtidas para cada amostra.

Os espectros de massas obtidos por NanoUPLC-MS^E foram processados usando *ProteinLynx Global Server* (PLGS) versão 2.4 (Waters Corp, Milford, MA). Os dados foram processados e utilizados na busca contra o banco de dados de *Paracoccidioides lutzii* (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/

paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html) utilizando algoritmos previamente descritos (GEROMANOS et al., 2009; LI et al., 2009). O banco foi carregado no PLGS utilizando sequências corretas e reversas. Os parâmetros para identificação incluem: a) número mínimo de íons fragmentados por peptídeos (2); b) número mínimo de íons fragmentados por proteína (5); c) número mínimo de peptídeos por proteína (1); d) massa máxima para proteína (600 kDa); e) enzima escolhida para digestão: tripsina; f) modificação fixa: carbamidometilação de resíduos de cisteína; g) modificações variáveis: oxidação da metionina e foforil

STY; h) máximo de falso-positivo de 4%. Para maior confiabilidade dos dados foram admitidas proteínas encontradas em duas das 2 de 3 réplicas (OEHRING et al., 2012).

Os dados obtidos por NanoUPLC-MS^E e processados pelo PLGS foram submetidos a análises *in silico*. Para determinação dos processos biológicos, foram utilizados o *Functional Catalogue* (Funcat2) e o *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) (http://www.genome.jp/kegg/). Para melhorar a anotação de proteínas hipotéticas, foram utilizados os bancos de dados do NCBI e o UniProt (http://www.uniprot.org/).

RESULTADOS

5.1 – Identificação de enzimas do ciclo do metilcitrato codificadas por *Paracoccidioides* spp.

A presença das enzimas do ciclo do metilcitrato ou relacionadas ao metabolismo de propionil-CoA em *Paracoccidioides* spp. foi determinada por pesquisa de ortólogos utilizando as sequências de aminoácidos das proteínas PCL, MCS, MCD e MCL de *A. fumigatus* e *A. nidulans* (Tabela 4). A identidade das enzimas foi determinada para representantes do complexo *Paracoccidioides* spp., são eles *P. lutzii, P. brasiliensis* isolados 03 e 18. Foram identificadas três prováveis enzimas do ciclo do metilcitrato nos três isolados com identidade superior a 74% entre as sequências e uma propionil-CoA ligase, sendo que a MCS teve maior identidade com a sequência de *A. fumigatus*.

Tabela 4 – Análise de identidade das enzimas do CMC do complexo *Paracoccidioides* com outros fungos

		U				
Enzimas	An/Pl	An/Pb03	An/Pb18	Af/PI	Af/Pb03	Af/Pb18
PCL	74%	74%	74%	75%	74%	74%
MCS	78%	78%	78%	81%	81%	81%
MCD	78%	78%	79%	78%	78%	78%
MCL	77%	77%	74%	78%	78%	76%

A. nidulans (An) e A. fumigatus (Af) em P. lutzii (PI), P. brasiliensis isolado 03 (Pb03) e P. brasiliensis isolado 18 (Pb18). PCL - propionil-CoA ligase; MCS - metilcitrato sintase; MCD - metilcitrato desidratase; MCL - metilisocitrato liase. A percentagem refere-se à identidade entre as sequências.

A identidade das enzimas PCL, MCS, MCD e MCL entre os três isolados de *Paracoccidioides* foi determinada no software online de alinhamento múltiplo COBALT (Tabela 5). A identidade apresentou-se superior a 91% entre as enzimas analizadas, podendo-se observar que são enzimas bastante conservadas entre os isolados analisados desse fungo.

Enzimas	Identidade
PCL	97,46%
MCS	98,93%
MCD	94,65%
MCL	91,90%

Tabela 5 – Identidade das enzimas PCL, MCS, MCD e MCL entre *P. lutzii* e *P. brasiliensis* isolado 03 e 18

O alinhamento foi realizado no software online de alinhamento múltiplo COBALT (*Constraint-based Multiple Protein Alignment Tool*). A identidade foi determinada pela relação entre o número de aminoácidos conservados nos três isolados e o tamanho da maior sequência alinhada.

Tendo em vista a alta identidade das enzimas do CMC entre os três isolados de Paracoccidioides utilizados neste estudo, procedeu-se à pesquisa/caracterização dos genes das enzimas do CMC em P. lutzii. A espécie P. lutzii foi escolhida para que, posteriormente, a partir desse estudo, outras comparações possam ser realizadas com outros isolados do complexo Paracoccidioides. A sintenia dos genes e a quantidade de aminoácido da MCS, MCD e MCL desta espécie foram obtidas utilizando o banco de dados BROAD (Figura 5). A Figura 5A mostra a organização genômica dos genes *mcl* seguido pelo mcs, com 8 genes não relacionados ao CMC antecedendo mcd em P. lutzii. O gene mcs, Figura 5B, possui sequência genômica de 1.561 nucleotídeos com 2 íntrons, de 78 e 73 nucleotídeos, respectivamente, e codifica um polipeptídeo de 469 aminoácidos. O gene mcd possui sequência genômica de 1.924 nucleotídeos com 3 introns, de 101, 64 e 73 nucleotídeos, respectivamente, e a proteína possui 561 aminoácidos. Já a sequência genômica do mcl é composta por 2.101 nucleotídeos com 4 íntrons, de 57, 53, 72 e 110 nucleotídeos, respectivamente, enquanto que a cadeia polipeptídica da proteína aporta 602 aminoácidos.



Figura 5 – Organização genômica (A) e esquema representativo (B) das sequências codificantes para as proteínas MCS (*mcs*), MCD (*mcd*) e MCL (*mcl*) de *P. lutzii*. A. Representação da organização genômica dos genes *mcs*, *mcd* e *mcl*. B. Esquema representativos dos genes *mcs*, *mcd* e *mcl*. As caixas sem preenchimento indicam a posição dos íntrons. *genes codificantes para proteínas não relacionadas ao CMC. nt = nucleotídeo.

A localização subcelular das enzimas do CMC foi predita por meio da utilização do software online WoLF PSORT (http://wolfpsort.org/). As enzimas MCS, MCD e MCL apresentaram sequências peptídicas de direcionamento mitocondrial, já a PCL, responsável possivelmente por adicionar o grupo CoASH ao propionato em *P. lutzii*, foi predita na membrana plasmática.

5.2 – Viabilidade de *P. lutzii* em propionato

Com o objetivo de determinar as condições experimentais para os trabalhos de reposta do fungo ao propionato, foi feita incubação de células leveduriformes em meio contendo glicose, glicose e propionato ou somente propionato (Figura 6). A incubação procedeu-se até 72 horas pós-inóculo e em três diferentes concentrações: a 10 mM, 20 mM ou 50 mM. Nas concentrações de 10 a 20 mM, Figura 6A e B, respectivamente, a viabilidade permaneceu acima de 80%, até 24 horas, nas três fontes de carbono. A 50 mM, Figura 6C, propionato apresentou-se tóxico às células fúngicas, o que foi expresso pela acentuada diminuição de viabilidade das células.



Figura 6 – Análise de viabilidade do fungo em diferentes fontes de carbono. O fungo foi inoculado a 1x10⁶ cél/mL e incubado em meio MMcM líquido. As fontes de carbono utilizadas foram glicose, glicose com propionato (Glic/Prop) ou somente propionato, nas concentrações de 10, 20 ou 50 mM, paineis A, B e C, respectivamente. A viabilidade das células foi monitorada durante 72 horas de incubação utilizando-se azul de tripan para a análise. A cálculo de células viáveis foi feita por meio da divisão de células viáveis, ou seja, metabolicamente ativas, pela soma das células viáveis e inviáveis.

5.3 Crescimento de P. lutzii em propionato

O crescimento foi analisado sob as mesmas condições da análise de viabilidade de *P. lutzii* (Figura 7). Nas concentrações de 10 mM e 20 mM, o número de células viáveis se manteve constante em até 48 horas de incubação

em propionato. Diferentemente do que ocorreu em propionato com glicose, que dobrou o número de células nas primeiras 24 horas de incubação em 10 mM e cresceu mais do que o dobro após 48 horas de incubação a 20 mM. Com 50 mM de fonte de carbono, tanto em propionato quanto em glicose com propionato, o fungo não apresentou aumento no crescimento celular.



Figura 7 – Análise do crescimento do fungo em meio líquido em diferentes fontes de carbono. O fungo foi inoculado a 1x10⁶ cél/mL e incubado em meio MMcM líquido. As fontes de carbono utilizadas foram glicose, glicose com propionato (Glic/Prop) ou somente propionato, nas concentrações de 10, 20 ou 50 mM, paineis A, B e C, respectivamente. O crescimento das células foi monitorado durante 72 horas de incubação utilizando-se azul de tripan para a análise. O cálculo do crescimento foi feito levando-se em consideração o valor absoluto de células viáveis presentes no momento da contagem em 10µL de alíquota da incubação diluída 2.10⁶ vezes.

P. lutzii é capaz de se manter com viabilidade superior a 80% em meio líquido com propionato de sódio a 10 mM ou 20 mM em até 24 horas de incubação (Figura 6). Entretanto, ainda não se sabia se isso se dava pela utilização de propionato de sódio, por parte do fungo, como fonte de carbono ou somente por que, com a diminuição da concentração e, consequentemente, da toxicidade, o fungo permanecia viável por ser capaz de sobreviver no meio MMcM utilizando de sua própria reserva energética. Sendo assim, no intuito de confirmar se a manutenção da sua viabilidade se dá pelo fato do fungo ser capaz de utilizar propionato de sódio e não somente pela atenuação de sua toxicidade em baixa concentração, o ensaio de crescimento em placas foi realizado (Figura 8). O controle negativo do crescimento foi feito com uma condição sem fonte de carbono. A glicose foi utilizada como controle positivo. A glicose, glicose com propionato e propionato de sódio foram utilizadas nas concentrações de 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM e 50 mM. Após 10 dias de incubação, foi possível observar crescimento do fungo no meio suplementado com propionato de sódio. Por outro lado, no meio sem fonte de carbono, o fungo não cresceu. Em propionato de sódio, o fungo foi capaz de crescer nas concentrações de 5 a 15 mM, sendo que em 5 mM houve maior crescimento. Em concentrações superiores a 20 mM não houve crescimento.



Figura 8 – Análise de crescimento de *P. lutzii* em MMcM sólido. Os meios de cultivo foram preparados sem fonte de carbono, com glicose como única fonte de carbono, glicose com propionato ou somente propionato de sódio. As concentrações estão definidas ao lado esquerdo de cada painel, sendo 5mM, 10mM, 15mM, 20mM e 50mM. Foi feita diluição seriada e aplicado 10⁶, 10⁵, 10⁴ e 10³ células. O fungo foi incubado por 10 dias. *P. lutzii* só não foi capaz de crescer em propionato de sódio em concentrações superiores a 20 mM. O experimento foi realizado em triplicata biológica.

5.4 – O propionato induz a expessão dos genes mcs, mcd, mcl e pcl

Para analisar o perfil transcricional dos genes codificantes para as enzimas MCS e PCL nas formas de levedura e micélio, bem como da MCD e MCL em *P. lutzii* na forma de levedura, foi utilizado ensaio de PCR quantitativa (Figura 9). O perfil transcricional foi analisado em resposta às seguintes fontes de carbono: glicose, utilizada como controle por não produzir propionil-CoA, glicose e propionato de sódio ou somente em propionato. O nível de expressão da condição controle foi utilizado como referência.

Em levedura, os genes *mcs* e *mcl* (Figura 9-A e C, respectivamente) apresentaram pelo menos três vezes maior nível de expressão em propionato do que a condição controle, que é a glicose. O gene *mcd* e *pcl* (Figura 9-B e D, respectivamente), apresentou aumento de expressão na levedura após 48 horas de incubação em propionato. Já nas incubações em glicose suplementada com propionato, observou-se expressão dos genes *mcs*, *mcd*, *mcl* e *pcl* de até duas vezes maior do que o controle.

Em micélio (Figura 9-E e F), os níveis de expressão dos genes *mcs* e *pcl* apresentaram diferença significativa após 48 horas de incubação em glicose com propionato. Na incubação somente com propionato como fonte de carbono, *pcl* foi três vezes mais expressa após 48 horas.





Figura 9 – Quantificação dos transcritos *mcs*, *mcd*, *mcl* e *pcl* durante incubação em diferentes fontes de carbono. Em A, B C e D são mostrados os níveis de expressão destes genes na levedura de *P. lutzii*. Em E e F a análise foi realizada na forma miceliana do fungo. A incubação foi realizada em glicose, glicose com propionato ou somente em propionato, todos a 10 mM, durante 6, 24 e 48 horas. GLIC. = glicose; PROP. = propionato de sódio. Os dados foram normalizados pelo transcrito da proteína α -tubulina. As barras de erros se referem ao desvio padrão de triplicatas biológicas. * indica valor de P ≤ 0,05.

5.5 – O propionato induz o aumento de atividade da metilcitrato sintase

A atividade enzimática da metilcitrato sintase foi determinada a partir do extrato proteico bruto de micélio e levedura de *P. lutzii* em glicose, glicose com propionato ou em propionato (Tabela 6). Além disso, a atividade do sobrenadante de cultura dessas duas formas também foi realizada. A condição do ensaio foi definida utilizando-se extrato proteico total.

Considerando a atividade de MCS, observou-se que em propionato, tanto em micélio quando em levedura houve aumento em relação às outras condições. No citoplasma de micélio, a atividade da MCS em propionato foi de 73,55 U.mg proteína⁻¹, 27% maior do que em glicose. Em levedura, no citoplasma, foi de 54,35 U.mg proteína⁻¹, 66% maior do que em glicose. No citoplasma de micélio, a atividade da MCS se apresentou 35% maior do que em levedura. No sobrenadante das incubações, pode-se observar que a MCS foi secretada e permaneceu metabolicamente ativa tanto em levedura quanto micélio. A atividade do sobrenadante da levedura foi de 74,06 U.mg proteína⁻¹ e 135% maior do que quando comparado com o sobrenadante dessa mesma forma do fungo em glicose. Diferentemente do que ocorreu no sobrenadante do micélio, no qual a atividade de MCS foi de 50,18 U.mg proteína⁻¹, em torno de 50% menor do que em glicose. Em glicose suplementada com propionato não houve o aumento de atividade da MCS.

		MCS*	DP MCS*
0	Glicose	57,69	<u>+</u> 1,16
1 icélic	Glicose/Propionato	43,10	<u>+</u> 4,21
2	Propionato	73,55	<u>+</u> 6,57
o do)	Glicose	95,18	<u>+</u> 0,58
<i>A</i> icéli creta	Glicose/Propionato	48,39	<u>+</u> 3,51
A (se	Propionato	50,18	<u>+</u> 3,51
ā	Glicose	32,70	<u>+</u> 4,44
vedui	Glicose/Propionato	29,96	<u>+</u> 7,22
Le	Propionato	54,35	<u>+</u> 5,82
lra Ido)	Glicose	31,42	<u>+</u> 2,95
creta	Glicose/Propionato	55,66	<u>+</u> 0,40
Le (se	Propionato	74,06	<u>+</u> 1,79

Tabela 6 – Atividade de metilcitrato sintase em extrato citoplasmático e secretado de micélio e levedura de *P. lutzii* incubado em glicose, glicose com propionato ou propionato

*Os dados estão em U.mg proteína⁻¹. Uma unidade de atividade (U) foi definida como a liberação de 1 µmol de CoASH por mg de proteína por minuto. DP = desvio padrão; MCS = metilcitrato sintase.

5.6 – Produção, purificação e atividade enzimática da MCS de *P. lutzii*

A MCS recombinante foi obtida e purificada para caracterização e determinação dos seus parâmetros bioquímicos utilizando-se os substratos propionil-CoA e acetil-CoA. As frações resultantes da purificação proteica analisadas em SDS-PAGE (Figura 10) resultaram em uma proteína com massa molecular de aproximadamente 50 kDa.



Figura 10 – Indução e purificação da MCS recombinante com resina Ni-NTA. A indução foi realizada em bactéria *E. coli* BL21 em meio de autoindução (Novagen), com ampicilina e cloranfenicol, e crescida por 18 horas a 30 °C. Após indução, a proteína recombinante de aproximadamente 50 kDa foi purificada com resina Ni-NTA. A análise foi realizada em gel SDS-PAGE 12%. Linhas M = marcador de peso molecular; 1 = extrato celular induzido; 2 = sobrenadante da ligação; 3 = fração da lavagem; 4 – 7 = frações das eluições; 8 proteína concentrada (5 µg).

A proteína recombinante apresentou 455 aminoácidos (sem peptídeo de sinalização mitocondrial) com a cauda de histidina e p*I* teórico de 8,34. A atividade específica (Tabela 7) da MCS em extrato bruto foi de 8,21 U.mg proteína⁻¹ em acetil-CoA e 3,46 U.mg proteína⁻¹ em propionil-CoA, enquanto que, para comparação, no purificado concentrado foi de 37,97 U.mg proteína⁻¹ em acetil-CoA (número de *turnover* 31,6 s⁻¹) e 16,52 U.mg proteína⁻¹ em propionil-CoA (número de *turnover* 13,5 s⁻¹), com rendimento de 92% na purificação. Portanto, a taxa de atividade da enzima foi de aproximadamente 2,3:1 de citrato sintase e metilcitrato sintase, respectivamente. O *K*_m para propionil-CoA foi de 1,59 µM e para acetil-CoA foi de 1.57 µM. Na presença de 1 mM de oxaloacetato, o *K*_m para propionil-CoA foi de 6,4 µM enquanto que para acetil-CoA foi 9,5 µM. A eficiência catalítica com propionil-CoA foi estimada como *V*/*K*_m = 8,5 × 10⁶ s⁻¹ M⁻¹ e com acetil-CoA como *V*/*K*_m = 2,0 × 10⁷ s⁻¹ M⁻¹. Na presença de oxaloacetato, a eficiência catalítica com propionil-CoA foi estimada em *V*/*K*_m = 2,1 × 10⁶ s⁻¹ M⁻¹ e

atividade com acetil-CoA em relação à propionil-CoA, na presença de oxaloacetato, a afinidade por propionil-CoA aumentou, indicada pela diminuição do K_m . Já a eficiência catalítica mostrou semelhança entre os dois substratos na presença de oxaloacetato, embora tenha sido levemente maior com acetil-CoA. Os dados sugerem que a MCS pode atuar, também, como citrato sintase.

Parâmetros	MCS de <i>P. lutzii</i>
Atividade específica (Propionil-CoA)	16,52 U.mg proteína ⁻¹
Atividade específica (Acetil-CoA)	37,97 U.mg proteína ⁻¹
Número de turnover (Propionil-CoA)	13,5 s ⁻¹
Número de turnover (Acetil-CoA)	31,6 s ⁻¹
Valor de K _m (Propionil-CoA)	1,59 µM
Valor de K_m (Acetil-CoA)	1,57 µM
Valor de K_m (Oxaloacetato + Propionil-CoA)	6,4 µM
Valor de Km (Oxaloacetato + Acetil-CoA)	9,5 µM
Eficiência catalítica (Propionil-CoA)	$8,5 imes 10^6 \ s^{-1} \ M^{-1}$
Eficiência catalítica (Acetil-CoA)	$2,0 \times 10^7 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$
Eficiência catalítica (Oxaloacetato + Propionil-CoA)	$2,1 \times 10^6 s^{-1} M^{-1}$
Eficiência catalítica (Oxaloacetato + Acetil-CoA)	$3,3 imes 10^6 s^{1} M^{1}$

Tabela 7 – Parâmetros bioquímicos da MCS de P. lutzii

5.7 - O perfil proteômico da levedura de *P. lutzii* em propionato apresentou aumento da quantidade de enzimas do CMC

O perfil proteômico da levedura de *P. lutzii* foi analisado por NanoUPLC-MS^E. Após a análise quantitativa, foi obtida uma tabela com 433 proteínas com a sua taxa relativa de quantidade. Dentre essas, 176 foram induzidas (Tabela 8) e 155 foram reprimidas (Tabela 9) em propionato em relação à glicose. As outras 102 proteínas não apresentaram diferença significativa de regulação (dados não mostrados). Foram identificadas proteínas induzidas e reprimidas participantes do metabolismo de aminoácidos, carboidratos, compostos de carbono, metabolismo de ácidos graxos e lipídeos. Vias de produção de energia como glicólise e gliconeogênese, ciclo do ácido tricarboxílico e oxidação de ácidos graxos também foram reguladas, bem como vias de informação, transporte, percepção e resposta a estímulos. Proteínas pertencentes ao ciclo do metilcitrato, ciclo do glioxilato, via da pentose-fostato, conservação e produção de energia, como fosforilação oxidativa, foram encontradas induzidas quando comparadas com o controle. Enquanto que proteínas pertencentes à fermentação alcoólica e processos de desenvolvimento como biogênese de compostos celulares e diferenciação de tipo celular foram reprimidas.

Acesso*	Descrição	Score	Taxa de indução
METABOLISM	10		_
Metabolismo	de aminoácidos		
PAAG_08166	4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase	1101,35	3,22
PAAG_00221	Acetolactato sintase	570,44	2,20
PAAG_02170	Adenilosuccinato sintetase	801,09	1,86
PAAG_03045	Aminometiltransferase	4463,85	1,46
PAAG_06072	Aminotransferase de aminoácido de cadeia ramificada	1096,78	1,84
PAAG_01969	Arginase	714,62	1,93
PAAG_06407	Argininosuccinato liase	785,25	2,01
PAAG_08065	Aspartato-semialdeído desidrogenase	544,21	1,88
PAAG_04701	Cistationina gama-liase	741,98	1,58
PAAG_07626	Cobalamina-independente sintetase	6348,23	1,60
PAAG_01365	Colina desidrogenase	1615,39	1,26
PAAG_05253	Delta-1-pirrolino-5-carboxilato desidrogenase	4321,54	1,86
PAAG_07954	Gama-glutamil fosfato redutase	1001,58	1,75
PAAG_01568	Glicina desidrogenase	2206,60	1,65
 PAAG_07689	Glutamato desidrogenase NADP-específica	3292,79	2,12
PAAG 05984	Glutaril-CoA desidrogenase	980,34	1,21
PAAG 08164	Homogentisato 1 2-dioxigenase	6260,94	2,23
PAAG 08162	Maleilacetoacetato isomerase	2357,57	Propionato
PAAG 07036	Metilmalonato-semialdeído desidrogenase	4431.37	1.38
PAAG 08100	O-acetil-homoserina (tiol)-liase	14788.46	1.77
PAAG 01302	Proteína da família da fosforilase	1965.49	2.10
PAAG 02935	Proteína H do sistema de clivagem da glicina	2330.52	1.58
PAAG 06416	Proteína hipotética	1168.88	1.45
PAAG 02644	Ouinurenina-ovodutarato transaminase	1050.64	1.25
PAAG 02901	S-adenosilmetionina sintetase	3705 59	1 84
PAAG 04443	Síntese de espermidina	3761.83	1,57
PAAG 08718	Succipato-semialdeído desidrogenase	792 87	1 40
Metabolismo		102,01	1,40
PAAG 03333	Formomidaço	2995 07	1 84
Metabolismo		2000,01	1,04
		718.05	Propionato
PAAG 00/33	Ademinosuccinato nase	2009 47	Propionato
PAAC 00731	Adenosina quinase	0726.85	1 63
PAAG_00751	Proteina biruncional de biossintese de purina ADE17	9720,05	1,03
Motabolismo	Aantina tostorribosiitransterase 1	1771,30	1,42
	Dirofosfatase inorgânica	5002 15	1 25
Metabolismo	de carboidratos e compostos de carbono	5995,15	1,20
	2 motiloitrato desidratase	24029.00	1 46
	2-metiloitrato desidiatase	24938,22	1,40
PAAG_04550		21941,23	I,00 Draminus (
PAAG_04550 PAAG_07180	2-metilcitrato sintase Acetato guinase	21941,23 507,18	1,68 Propionat

Tabela 8 - Relação de proteínas induzidas em Propionato e classificação funcional

PAAG_04541	Álcool desidrogenase	911,62	1,68
PAAG_00685	Alfa-manosidase	736,83	1,70
PAAG_07804	D-lactato desidrogenase	1114,92	1,63
PAAG_02011	Fosfoglicomutase	2735,84	1,48
PAAG_03776	Inositol-3-fosfato sintase	421,26	Propionato
PAAG_01158	Proteína hipotética	501,49	1,42
PAAG_05093	Succinil-CoA:3-quetoácido-coenzima A transferase subunidade B	2247,27	1,67
PAAG_07150	UDP-galactopiranose mutase	629,09	1,82
Metabolismo	de lipídeos, ácidos graxos e isoprenoides		
PAAG_01833	2-succinilbenzoato-CoA ligase	477,98	1,25
PAAG_04526	3-beta-hidroxiesteroide desidrogenase	991,52	1,46
PAAG_06333	Acil-coenzima A tioesterase 13	1298,18	Propionato
PAAG_03960	Isopentenil-difosfato delta-isomerase	1316,90	1,60
PAAG_08277	Proteína da família da nitrorredutase	2936,51	1,51
Metabolismo	de vitaminas, cofatores e grupos prostéticos		
PAAG_00851	6,7-dimetil-8-ribitillumazina sintase	2363,65	11,82
PAAG_02859	Adenosil-homocisteinase	38694,04	2,08
PAAG_01934	Cadeia alfa da riboflavina sintase	3668,26	1,39
PAAG_07321	Proteína de biossíntese de piridoxina PDX1	5937,41	1,82
PAAG_00799	Uroporfirinogênio decarboxilase	635,83	Propionato
ENERGIA			
Glicólise e gli	coneogênese		
PAAG_07410	2,3-fosfoglicerato mutase bisfosfoglicerato-independente	2605,65	1,72
PAAG_01995	Aldolase frutose-bifostato	4273,31	1,46
PAAG_00771	Enolase	32950,20	1,39
PAAG_02682	Frutose-1,6-bifosfatase	3940,38	2,12
PAAG_06526	Glicose-6-fosfato isomerase	2193,66	1,65
Ciclo do Glioz	kilato		
PAAG_06951	Isocitrato liase	3316,87	1,90
Via das pento	ses-fosfato		
PAAG_04444	Transquetolase	3153,35	1,72
Via dos ácido	s tricarboxílicos (ciclo do citrato, ciclo de Krebs, ciclo T	CA)	
PAAG_02732	2-oxoglutarato desidrogenase E1	697,55	1,34
PAAG_08915	Diidrolipoamida succiniltransferase	6390,04	1,28
PAAG_03330	Diidrolipoil desidrogenase	8914,05	1,67
PAAG_00588	Famarato desidrogenase	510,63	2,59
PAAG_08449	Malato desidrogenase	18900,75	1,36
PAAG_04238	Succinato desidrogenase subunidade flavoproteína	175,94	1,30
PAAG_01725	Succinato desidrogenase subunidade flavoproteína	2243,57	1,43
Transporte de	e elétrons e conservação de energia membrana-associa	do	
PAAG_04820	ATPase subunidade alfa	16253,86	1,79
PAAG_01603	Citocromo b2	604,64	1,26
PAAG_01265	Citocromo b5	5726,58	1,36
PAAG_06268	Citocromo c	624,65	1,73
PAAG_06252	Citocromo c oxidase polipeptídeo Vlb	5355,13	Propionato
PAAG_08088	Citocromo complexo b-c1 subunidade 2	953,78	Propionato

PAAG_02382 Quinona oxidorredutase	572,51	1,42
PAAG_00293 Quinona oxidorredutase	1089,30	2,23
PAAG_07672 Uroporfirinogênio decarboxylase	1659,88	1,38
Oxidação de ácidos graxos		
PAAG_04811 2-hidroxiacil-CoA liase	929,92	Propionato
PAAG_06329 3-hidroxibutiril-CoA desidrogenase	1375,46	1,70
PAAG_03447 Acetil-CoA acetiltransferase	3085,39	1,75
PAAG_06224 Carnitina O-acetiltransferase	2358,38	1,22
PAAG_06309 Enoil-CoA hidratase	7969,74	1,70
PAAG_06462 Proteína de ligação ao acil-CoA	4634,73	1,62
Conversão de energia e regeneração		
PAAG_05605 ATP sintase cadeia delta	1073,51	1,38
PAAG_05576 ATP sintase cadeia gama	2291,77	1,70
PAAG_04570 ATP sintase mitocondrial cadeia D	771,63	1,73
PAAG_08037 ATP sintase subunidade beta	33148,54	2,66
PAAG_06155 ATP sintase vacuolar subunidade E	820,78	1,88
CICLO CELULAR E PROCESSAMENTO DE DNA		
Processamento de DNA		
PAAG_08917 Histona H2a	1004,73	3,42
PAAG_07099 Histona H3.3	17955,73	2,23
PAAG_07098 Histona H4.1	25537,33	2,25
Ciclo celular		
PAAG_02466 Proteína ativadora de GTPase ran-específica	16993,90	1,90
TRANSCRIÇÃO		
Síntese de RNA		
PAAG_05224 Complexo THO subunidade 4	1731,05	1,72
PAAG_08918 Histona tardia H2B.L4	5869,76	2,34
PAAG_04726 Pirin	716,08	Propionato
PAAG_04814 Proteína de ligação ao ácido nucleico	1529,81	1,23
SÍNTESE PROTEICA		
Biogênese ribossomal		
PAAG_02111 Proteína ribossomal 40S S0	1593,90	1,82
PAAG_05017 Proteína ribossomal 40S S10-A	1082,55	1,31
PAAG_05337 Proteína ribossomal 40S S22	2133,51	1,63
PAAG_09096 Proteína ribossomal 40S S28	10977,98	3,00
PAAG_07182 Proteína ribossomal 40S S7	3643,96	1,43
PAAG_00264 Proteína ribossomal 40S S8	3176,47	1,99
PAAG_00430 Proteína ribossomal 60S L2	1802,36	2,23
PAAG_00952 Proteína ribossomal 60S L20	1293 35	Propionato
PAAG_06743 Proteína ribossomal 60S L23	1200,00	
	2415,79	Propionato
PAAG_07385 Proteína ribossomal 60S L25	2415,79 1365,14	Propionato 1,46
PAAG_07385 Proteína ribossomal 60S L25 PAAG_00088 Proteína ribossomal 60S L3	2415,79 1365,14 685,31	Propionato 1,46 Propionato
PAAG_07385Proteína ribossomal 60S L25PAAG_00088Proteína ribossomal 60S L3PAAG_06569Proteína ribossomal 60S L43	2415,79 1365,14 685,31 800,34	Propionato 1,46 Propionato 2,53
PAAG_07385Proteína ribossomal 60S L25PAAG_00088Proteína ribossomal 60S L3PAAG_06569Proteína ribossomal 60S L43PAAG_00548Proteína ribossomal 60S L5	2415,79 1365,14 685,31 800,34 5193,57	Propionato 1,46 Propionato 2,53 1,26
PAAG_07385Proteína ribossomal 60S L25PAAG_00088Proteína ribossomal 60S L3PAAG_06569Proteína ribossomal 60S L43PAAG_00548Proteína ribossomal 60S L5PAAG_03019Proteína ribossomal 60S L6	2415,79 1365,14 685,31 800,34 5193,57 1401,16	Propionato 1,46 Propionato 2,53 1,26 1,86
PAAG_07385Proteína ribossomal 60S L25PAAG_00088Proteína ribossomal 60S L3PAAG_06569Proteína ribossomal 60S L43PAAG_00548Proteína ribossomal 60S L5PAAG_03019Proteína ribossomal 60S L6PAAG_04998Proteína ribossomal 60S L8	2415,79 1365,14 685,31 800,34 5193,57 1401,16 2589,42	Propionato 1,46 Propionato 2,53 1,26 1,86 Propionato

PAAG_	_07841	– Proteína ribossomal acídica 60S P1	21140,56	1,57
PAAG_	08285	Proteína ribossomal mitocondrial putativa 54S MNP1	1759,75	1,23
Traduç	;ão			
PAAG_	_00241	Fator de iniciação da traduçao eucariótico 5A	1841,49	Propionato
Amino	acil-tRI	NA-sintetase		
PAAG_	_01786	Fenilalanil-tRNA sintetase cadeia beta	1560,49	1,27
DESTI	NAÇÃO	DE PROTEÍNAS (enovelamento, modificação e destinaç	ção)	
Estabi	lização	e enovelamento de proteínas		
PAAG_	_01117	Proteína de ligação FK506	489,65	Propionato
Direcio	onamen	to de proteínas, triagem e translocação		
PAAG_	_05643	Proteína de membrana nuclear e retículo endoplasmático Npl4	13361,34	1,79
PAAG_	_00188	Proteina de montagem e importação para espaço intermembranar mitocondrial 40	1097,23	Propionato
PAAG_	_07386	Translocase de importação para membrana interna mitocondrial subunidade TIM8	3270,48	1,84
Modifie	cação p	proteica		
PAAG_	_03345	Fosfotirosina proteína fosfatase	3205,97	1,32
PAAG_	_04291	Nucleosídeo difosfato quinase	22701,92	1,82
PAAG_	_05417	Peptídeo de processamento mitocondrial subunidade beta	1276,32	2,80
Degrad	dação d	le proteínas/peptídeos		
PAAG_	_03279	Aminopeptidase	1168,57	1,21
PAAG_	_07319	Aminopeptidase Pro-xaa	736,58	Propionato
PAAG_	_09004	Aminopeptidase sensível a puromicina	1181,06	1,22
PAAG_	_04205	Aminopeptidase vacuolar	632,70	Propionato
PAAG_	_00664	Aspartil aminopeptidase	742,72	1,57
PAAG_	_07467	Dipeptidil-peptidase	505,98	1,92
PAAG_	_08931	Glutamato carboxipeptidase	2642,77	1,80
PAAG_	_00852	Proteassomo componente C1	1561,23	1,58
PAAG_	_00753	Proteassomo componente C11	5763,25	1,77
PAAG_	00866	Proteassomo componente C5	6075,84	1,36
PAAG_	_01941	Proteassomo componente C7-alfa	1180,89	1,54
PAAG_	_08418	Proteassomo componente PRE3	846,88	1,70
PAAG_	_00868	Proteassomo componente PRE4	965,44	1,58
PAAG_	_03536	Proteassomo componente PRE5	1152,97	1,58
PAAG_	07802	Proteassomo componente PRE6	4156,81	1,57
PAAG_	03687	Proteassomo componente PUP2	2891,66	1,46
PAAG_	_00763	Proteassomo componente PUP3	3067,50	3,82
PAAG_	_00071	Proteassomo componente Y7	1788,78	1,67
PAAG_	_02414	Proteassomo regulatório 26S subunidade rpn1	435,65	Propionato
PAAG_	_06740	Proteassomo regulatório 26S subunidade RPN11	636,91	Propionato
PAAG_	_01962	Proteassomo subunidade 26S	924,93	Propionato
PAAG_	08141	Proteassomo subunidade alfa tipo-4	2405,44	1,26
TRANS	SPORTI	E CELULAR, FACILITAÇÃO DE TRANSPORTE E ROTAS	DE TRANSP	ORTE
Compo	ostos tr	ansportados (substratos)		
PAAG_	_04276	Transportador fosfatidilinositol	3210,86	1,79
Rotas	de tran	sporte		
PAAG_	_05960	Proteína da família NIPSNAP	8340,10	1,40

MECANISMO DE TRANSDUÇÃO DE SINAL/COMUNICAÇÃO CELULAR			
Sinalização celular			
PAAG_06996 Complexo beta da proteína G subunidade CpcB	12877,75	1,86	
RESGATE CELULAR, DEFESA E VIRULÊNCIA			
Resposta ao estresse			
PAAG_08059 Proteína de choque térmico	61508,61	1,27	
PAAG_02130 Proteína de choque térmico HSP98	1267,72	1,36	
PAAG_01339 Proteína de choque térmico SSC1	21641,76	1,28	
PAAG_02364 Tiorredoxina	43867,17	1,23	
PAAG_07020 Tiorredoxina redutase	680,25	2,12	
Doença, virulência e defesa			
PAAG_06947 Glutamiltranspeptidase gama	447,78	2,39	
Detoxificação			
PAAG_04164 Superóxido dismutase	9172,24	1,36	
INTERAÇÃO COM O AMBIENTE			
Homeostase			
PAAG_02608 Proteína hipotética	581,01	Propionato	
PROTEÍNAS NÃO CLASSIFICADAS			
PAAG_03624 Complexo Arp2/3 subunidade Arc16	462,33	2,20	
PAAG_02217 Proteína contendo domínio isocorismatase	4319,76	1,65	
PAAG_05761 Proteína da família 4-carboximuconolactona decarboxilase	3047,01	Propionato	
PAAG_03537 Proteína da família decarboxilase	2547,11	1,51	
PAAG_06083 Proteína da família dienelactona hidrolase	1952,00	Propionato	
PAAG_08313 Proteína da família endorribonuclease L-PSP (Hmf1)	14903,47	1,21	
PAAG_02353 Proteína da família GMF	2288,98	1,38	
PAAG_07234 Proteína da família NAP	2339,51	1,26	
PAAG_07631 Proteína da família redutase/desidrogenase de cade	a 1396,44	Propionato	
PAAG_02068 Proteína de ligação ao RNA inibidor 1 do ativador do plasminogênio	746,10	1,34	
PAAG_08005 Proteína hipotética	1710,28	1,39	
PAAG_05550 Proteína hipotética	1845,16	1,46	
PAAG_07772 Proteína hipotética	6346,84	1,51	
PAAG_06365 Proteína hipotética	503,09	1,57	
PAAG_00335 Proteína hipotética	767,76	2,01	
PAAG_05856 Proteína hipotética	6307,37	Propionato	
PAAG_00579 Proteína hipotética	644,25	Propionato	
PAAG_03197 Proteína hipotética	478,26	Propionato	
PAAG_02985 Proteína hipotética	3634,93	Propionato	
PAAG_06955 Tiol metiltransferase	2341,54	1,58	

* Acesso no banco de dados BROAD.

Tabela 9 - Relação de proteínas reprimidas em Propionato e classifica	ação
funcional	-

Acesso*	Descrição	Score	Taxa de indução		
METABOLISM	NO		maayae		
Metabolismo de aminoácidos					
PAAG_03978	3-hidroxisobutirato desidrogenase	3545,50	0,57		
PAAG_00468	4-aminobutirato aminotransferase	11498,17	0,58		
PAAG_07114	Agininosuccinato sintase	4322,29	0,64		
PAAG_04401	Aminotransferase de aminoácido de cadeia ramificada	5292,64	0,77		
PAAG_08668	Antranilato sintase componente 2	940,93	Glicose		
PAAG_02603	Aspartato aminotransferase	2771,37	0,33		
PAAG_04686	Cabamoil-fostato sintase aginina-específica de cadeia grande	619,21	Glicose		
PAAG_00638	Cistationina beta-sintase	992,41	0,83		
PAAG_07659	Corismato sintase	891,45	Glicose		
PAAG_08701	D-3-fosfoglicerato desidrogenase	2043,18	0,80		
PAAG_01002	Glutamato desidrogenase NAD-específico	1327,68	Glicose		
PAAG_07089	Homocitrato sintase	3414,45	0,57		
PAAG_06431	Ornitina aminotransferase	657,82	Glicose		
PAAG_07102	Polipetídeo AROM pentafuncional	438,09	Glicose		
PAAG_02354	Serina 3-desidrogenase	16549,62	0,63		
Metabolismo	de nitrogênio, enxofre e selênio				
PAAG_06237	Proteína acessória urease ureG	585,44	0,59		
Metabolismo	de nucleotídeo/necleosídeo/nucleobase				
PAAG_02115	Pirofosfoquinase fosfato-ribose	1802,83	0,00		
PAAG_02633	Pirofosfoquinase fosfato-ribose	1061,37	0,79		
Metabolismo	de carboidratos e compostos de carbono				
PAAG_01194	2-oxoisovalerato desidrogenase subunidade beta	1199,31	0,73		
PAAG_00566	Aflatoxina B1 aldeído redutase membro 2	811,37	Glicose		
PAAG_05716	Anidrase carbônica	1081,60	0,79		
PAAG_05392	Betaína aldeído desidrogenase	2007,98	0,43		
PAAG_07821	NAD epimerase dependente/proteína da família das desidrogenases	563,48	Glicose		
Metabolismo	de lipídeos, ácidos graxos e isoprenoides				
PAAG_01525	Ácido graxo sintase subunidade alfa reductase	1166,92	0,58		
PAAG_01524	Ácido graxo sintase subunidade beta desidrogenase	1367,51	0,58		
PAAG_05150	ATP-citrato sintase subunidade 1	1450,96	Glicose		
PAAG_05151	ATP-citrato-liase	2508,63	0,49		
PAAG_08859	Enzima peroxissomal multifuncional	10064,02	0,47		
PAAG_02843	Proteína hipotética	890,72	Glicose		
PAAG_01536	Trans-2-enoil-CoA redutase	1624,84	0,81		
Metabolismo	secundário				
PAAG_04888	4-cumarato-CoA ligase	655,06	Glicose		
PAAG_07759	Haloácido desalogenase	558,13	Glicose		
PAAG_02016	Hidroximetilglutaril-CoA sintase	504,12	Glicose		
ENERGIA					
Glicólise e gl	iconeogênese				

PAAG_02869	Fosfoglicerato quinase	9244,94	0,68
PAAG_01015	Hexoquinase	1393,04	0,34
PAAG_06380	Piruvato quinase	8885,19	0,51
PAAG_02585	Triosefosfato isomerase	21257,87	0,80
Via dos ácido	s tricarboxílicos (ciclo do citrato, ciclo de Krebs, ciclo T	CA)	
PAAG_05048	3-isopropilmalato desidrogenase subunidade grande	5143,61	0,47
PAAG_00856	Isocitrato desidrogenase subunidade 1	1735,44	Glicose
PAAG_07729	Isocitrato desidrogenase subunidade 2	1897,22	0,75
PAAG_00050	Piruvato desidrogenase	2008,13	0,61
PAAG_08295	Piruvato desidrogenase componente E1 subunidade alva	1504,61	0,72
PAAG_01534	Piruvato desidrogenase componente E1 subunidade beta	15144,95	0,68
PAAG_01463	Succinil-CoA ligase subunidade beta	2956,40	0,55
PAAG_00417	Succinil-CoA ligase subunidade beta	1659,99	0,83
Transporte de	e elétrons e conservação de energia membrana-associa	do	
PAAG_00173	Flavoproteína transferidora de elétron subunidade alfa	1962,09	0,75
Fermentação			
PAAG_00403	Alcool desidrogenase	13667,70	0,78
Oxidação de a	ácidos graxos		
PAAG_03689	3-cetoacil-CoA tiolase B	1291,02	Glicose
CICLO CELUI	AR E PROCESSAMENTO DE DNA		
Processamen	to de DNA		
PAAG_00106	Histona acetiltransferase subunidade catalítica tipo B	456,1	Glicose
PAAG_02055	Histona chaperona asf1	1675,05	Glicose
PAAG_00126	Histona H4.2	22410,58	Glicose
PAAG_01539	Proteína corporal multivesicular carregada 1	3830,15	Glicose
Ciclo celular			
PAAG_07339	Proteína associada quinase S-fase 1A	10845,24	0,57
TRANSCRIÇÃ	.0		
Síntese de RM	IA		
PAAG_01558	Fator de transcrição família CBF/NF-Y	615,9	Glicose
PAAG_04161	Nuclease estafilocócica domínio contendo proteína 1	741	Glicose
PAAG_06891	Regulador pós-transcricional de ligação ao mRNA (Csx1)	588,88	Glicose
Processamen	to de RNA		
PAAG_07785	Componente de ribonucleoproteina nuclear pequena 116 kDa U5	642,05	0,72
PAAG_00244	Proteína de ligação ao poliadenilato	2584,50	0,70
PAAG_01097	Proteína de ligação Poli(rC)	1155,15	0,53
PAAG_01630	Ribonucleoproteína nuclear pequena LSM2	2040,03	Glicose
SÍNTESE PRO	DTEICA		
Biogênese rik	ossomal		
PAAG_03513	Proteína ribossomal 40S L18	2101,58	Glicose
PAAG_06320	Proteína ribossomal 60S L13	1670,96	0,70
PAAG_07955	Proteína ribossomal 60S L18	3521,09	0,58
PAAG_01050	Proteína ribossomal 60S L30	10306,18	0,75
Tradução			
PAAG_00815	Fator 3 de iniciação da tradução eucariótico 5A subunidade A	585,11	Glicose

PAAG_01330 Fator 3 de iniciação da tradução eucariótico 5A subunidade RNA-ligante	1201,08	Glicose
PAAG_02024 Fator de elongamento alfa 1	22962,59	0,44
PAAG_00594 Fator de elongamento alfa 2	16269,07	0,76
PAAG_03167 Fator de elongamento alfa G 1	671,20	Glicose
PAAG_02921 Fator de elongamento alfa Tu	15283,95	0,66
PAAG_00240 Fator de iniciação da tradução eucariótico 5A	1783,22	0,75
PAAG_00689 Helicase ATP-dependente de RNA elF4A	3544,21	Glicose
Aminoacil-tRNA-sintetase		
PAAG_01777 Alanil-tRNA sintetase	4087,87	0,58
PAAG_02071 Glutamil-tRNA sintetase	1128,7	Glicose
PAAG_07105 Isoleucil-tRNA sintetase	407,87	Glicose
PAAG_05015 Leucil-tRNA sintetase	447,64	Glicose
PAAG_08172 Lisil-tRNA sintetase	1317,68	0,83
PAAG_04742 Valil-tRNA sintetase	1343,22	Glicose
DESTINAÇÃO DE PROTEÍNAS (enovelamento, modificação e destina	ção)	
Estabilização e enovelamento de proteínas		
PAAG_02482 Dissulfeto isomerase tigA	902,13	Glicose
PAAG_07490 Monotiol glutarredoxina-5	2583,47	Glicose
PAAG_07509 Peptidil-prolil cis-trans isomerase ssp1	901,78	Glicose
PAAG_08184 Proteína 1 do complexo T subunidade epsilon	932,06	0,82
PAAG_07165 Proteína 1 do complexo T subunidade gama	765,45	Glicose
PAAG_08287 Proteína 1 do complexo T subunidade teta	686,01	0,71
Direcionamento de proteínas, triagem e translocação		
PAAG_03772 Translocase de importação para membrana interna mitocondrial subunidade tim9	3588,39	0,71
Modificação proteica		
PAAG_03932 Enzima ativadora de ubiquitina E1	1565,42	Glicose
PAAG_04901 Enzima de conjugação da ubiquitina	4974,23	0,59
PAAG_04327 Ubiquitina hidrolase caboxil-terminal	460,98	Glicose
PAAG_00202 Ubiquitina hidrolase caboxil-terminal	437,34	Glicose
PAAG_02773 Variante da enzima de conjugação da ubiquitina MMSE	2249,43	Glicose
Degradação de proteínas/peptídeos		
PAAG_01104 Componente de proteassoma PUP1	5182,94	0,62
PAAG_01926 Proteassoma regulatória 26S subunidade T5	3085,21	0,66
PAAG_05509 Proteassoma regulatória não-ATPase 26S subunidade 11	836,85	0,56
PAAG_08205 Proteassoma regulatória não-ATPase 26S subunidade 6	731,63	0,75
TRANSPORTE CELULAR, FACILITAÇÃO DE TRANSPORTE E ROTAS	DE TRANSF	ORTE
Compostos transportados (substratos)		
PAAG_07900 Proteína de transferência de fosfatidilinositol- fosfatidilcolina	2164,34	0,42
Facilitação de transporte		
PAAG_01947 ATPase GET3	1343,48	Glicose
Rotas de transporte		
PAAG_00932 Cadeia leve da dineína	4128,62	0,67
PAAG_06233 Proteína de fusão vesicular SEC17	1102,38	Glicose
PAAG_04374 Proteína inespecífica de transferência de lípidos	1796,23	Glicose
MECANISMO DE TRANSDUÇÃO DE SINAL/COMUNICAÇÃO CELULA	R	

Sinalização o	elular		
PAAG_07702	Fator de ribosilação do ADP	1846,01	0,70
PAAG_06344	Inibidor de dissociação de GDP rab	7031,10	0,50
PAAG_02377	Inibidor de dissociação de GDP rho	580,30	Glicose
PAAG_07634	Pequena GTPase RhoA	2899,91	Glicose
PAAG_00782	Pequeno COPII coat GTPase sar1	2085,29	Glicose
PAAG_08093	Proteína de ligação a GTP ypt3	4125,32	Glicose
PAAG_02458	Proteína de ligação a GTP ypt7	1904,57	Glicose
PAAG_02820	Proteína de ligação ao ácido nucleico dependente de GTP engD	3046,66	Glicose
PAAG_02973	Proteína de manutenão do estado diploide chpA	7015,08	0,83
PAAG_04651	Proteína nuclear de ligação a GTP GSP1/Ran	22914,23	0,18
RESGATE CE	ELULAR, DEFESA E VIRULÊNCIA		
Resposta ao	estresse		
PAAG_01454	Catalase	4344,10	0,39
PAAG_02686	Hsp90 co-chaperona AHA1	2282,75	0,77
PAAG_08260	Hsp90 co-chaperona Cdc37	5972,15	0,78
PAAG_05679	Proteína de choque térmico	25630,70	0,37
PAAG_00871	Proteína de choque térmico 30 kDa	21687,35	0,33
PAAG_07775	Proteína de choque térmico SSB1	7165,68	0,74
PAAG_06811	Proteína de choque térmico STI1	9682,48	0,71
PAAG_06175	Proteína de matriz peroxissomal	18573,71	0,67
Detoxificação)		
PAAG_04785	Família oxirredutase DSBA	1766,83	Glicose
PAAG_03774	S-(hidroximetil)glutationa desidrogenase	952,22	Glicose
PAAG_02725	Superóxido dismutase	7413,85	0,80
BIOGENESE	DE COMPONENTES CELULARES		
Parade celula		4005.00	
PAAG_00889	Fostomanomutase	1995,62	Glicose
PAAG_00850	Glicosamina-trutose-o-tostato aminotransterase	1212,92	Glicose
PAAG_06885	UDP-N-acetilglicosamina pirotostorilase	741,65	Glicose
Citoesqueiet	o/proteina estrutural	7040 70	0.00
PAAG_03532	Actina Alfa tubulina padaia 1	7949,79	0,29
PAAG_01647	Alla lubulina-cadela 1 Complexe ABB2/2 subunidade 24 kDs	4704,41	0,44
PAAG_00000	Minerine 2	1041,00	0,02 Clicopo
PAAG_00004	Protoína de ligação à actina	490,00	GIICOSE
		1077,10	0,03
Diferenciação	de tipo celular de micro-organismos/fungos		
	Fimbrina	1880.63	Glicose
PROTEÍNAS		1000,00	Olicose
PAAG 06851	Cadeja curta de desidrogenase/redutase	2504 45	0.53
PAAG_06017	Domínio KH de proteína de ligação ao RNA	1358 36	Glicose
PAAG 00772	Eator 3 de iniciação da tradução subunidade 1	2792.02	Glicose
PAAG 01935	Formil-coenzima A transferase	849 58	0.76
PAAG 032/3	Glicose-6-fosfato 1-enimerase	1073 02	0.84
PAAG 04274	Inibidor de proteína fosfatase 2	2630.20	0.83
1 770_04214	mibidor de protema rostatase z	2030,20	0,05

PAAG_03701	Proteína contendo domínio BAR	2774,65	0,64
PAAG_03152	Proteína contendo domínio CobW	6975,92	0,45
PAAG_00367	Proteína contendo domínio CUE	572,86	Glicose
PAAG_06515	Proteína contendo domínio DUF833	1214,31	0,58
PAAG_05087	Proteína contendo domínio RNP	943,65	Glicose
PAAG_04282	Proteína contendo domínio UBX	535,87	Glicose
PAAG_01399	Proteína da família desidrogenase/epimerase dependente de NAD	2219,57	0,68
PAAG_09083	Proteína da família TCTP	20407,76	0,43
PAAG_03106	Proteína da família ThiJ/Pfpl	2116,11	0,64
PAAG_04391	Proteína de ligação a progesterona	2772,92	0,64
PAAG_02026	Proteína de repetição da anquirina	1098,14	Glicose
PAAG_01695	Proteína de resistência do arsenito	894,65	Glicose
PAAG_07875	Proteína hipotética	20099,06	0,22
PAAG_00297	Proteína hipotética	5803,94	0,59
PAAG_00297	Proteína hipotética	15466,66	0,62
PAAG_00340	Proteína hipotética	3412,62	0,79
PAAG_00573	Proteína hipotética	1707,43	Glicose
PAAG_01045	Proteína hipotética	722,88	Glicose
PAAG_05168	Proteína hipotética conservada	1663,31	Glicose
PAAG_00503	Superfamília hidrolase HAD	1689,73	Glicose

* Acesso no banco de dados BROAD.

DISCUSSÃO

Tem sido demonstrado que propionil-CoA pode ser metabolizado pela via da metilmalonil-CoA mutase em mamíferos (HALARNKAR et al., 1989), pela β-oxidação modificada em plântulas (LUCAS et al., 2007), insetos (HALARNKAR et al., 1989), bactérias (LEE et al., 2009) e fungos (HASEGAWA et al., 1982; MIYAKOSHI et al., 1987; OTZEN et al., 2014) e pelo ciclo do metilcitrato em fungos (UCHIYAMA et al., 1976; BROCK et al., 2000; BROCK et al., 2004; KOBAYASHI et al., 2013; LIMENITAKIS et al., 2013) e bactérias (LONDON et al., 1999; PALACIOS et al., 2004; MUNOZ-ELIAS et al., 2006).

Neste sentido. procedeu-se o rastreamento dos genomas de Paracoccidioides spp. (P. lutzii, P. brasiliensis isolado 03 e 18) em busca ortólogos das enzimas do CMC utilizando como molde a seguência dessas proteínas de A. nidulans e A. fumigatus por já serem bem descritas na literatura. A pesquisa revelou que as três espécies de Paracoccidioides utilizadas neste estudo apresentam sequências com alta identidade entre estas enzimas (Tabela 4). A MCS e MCD apresentaram identidades superiores a 78% com as sequências de aminoácidos de A. nidulans e fumigatus, e a PCL e MCL superior a 74%. Portanto, por meio de predição por bioinformática, foram identificadas as prováveis enzimas exclusivas do CMC também em Paracoccidioides spp., o que sugere ser esta a via responsável pelo processamento de propionil-CoA neste fungo.

A identificação das enzimas do CMC de *Paracoccidioides* spp. corroboram para a afirmativa de que muitos fungos oxidam propionil-CoA a piruvato via ciclo do metilcitrato (MIYAKOSHI et al., 1987). Uma situação similar é achada no domínio bacteriano, no qual o ciclo do metilcitrato aparece para emergir como uma via geral de metabolismo aeróbico do propionato (BUCKEL, 1999). Este nutriente é uma fonte largamente disponível no solo, sendo superado apenas por acetato. Além disso, propionato é disponível também nos tecidos do hospedeiro como produto de degradação de aminoácidos e ácidos graxos. Portanto, as vias metabólicas que permitem o estabelecimento de microorganismos nestes meios são essenciais tanto para organismos que possuem

estilo de vida parasitário e saprobiótico, como o *Aspergillus* spp. e *Paracoccidioides* spp., quanto para os de estilo somente parasitário, como *Salmonella*, parasito do trato intestinal animal – ambiente rico em propionato (BROCK, 2005).

A partir da busca por ortólogos, foi feita a avaliação da identidade das quatro enzimas entre as três espécies de *Paracoccidioides* spp. A análise revelou identidade >97% para PCL, >98% para MCS, >94% para MCD e >91% para MCL (Tabela 5). Dessa forma, procedeu-se os estudos em apenas um dos isolados, em *P. lutzii*, uma vez que as enzimas se mostraram altamente conservadas no gênero *Paracoccidioides*, para que, em estudos posteriores, comparações possam ser realizadas entre representantes das espécies filogenéticas S1, PS2 e PS3 desse gênero.

A análise da posição dos genes codificantes para as enzimas do CMC revelou proximidade entre eles (Figura 5-A). Os genes *mcl* e *mcs* em *P. lutzii* estão seguidamente localizados, diferentemente de suas localizações em *A. fumigatus*, que estão separados por outros 72 genes. Entre o gene *mcd* e *mcs*, há 8 genes não relacionados com o ciclo do metilcitrato que os separam e codificam proteínas que não foram identificadas na análise proteômica (Tabelas 7 e 8). Em *A. fumigatus*, entre esses dois genes estão localizados outros 13 que os separam.

Já a sequência cromossomal dos genes *mcs*, *mcd* e *mcl* revelou que *P*. *lutzii* possui estruturas gênicas semelhantes à do gênero Aspergilus. O gene *mcs* contém sequência genômica de 1.561 nucleotídeos, com 2 íntrons e codifica uma proteína de 469 aminoácidos (Figura 5-B). Em *A. fumigatus*, o gene codificante para a enzima MCS possui gene de 1.520 nucleotídeos, 2 íntrons e a proteína codificada contém 465 aminoácidos. Em *A. niger*, a proteína codificada também contém 465 aminoácidos (KOBAYASHI et al., 2013). O gene *mcd* possui sequência genômica de 1.924 nucleotídeos contendo 3 íntrons. A sequência da proteína é composta por 561 aminoácidos. Em *A. fumigatus*, o gene *mcd* aporta 1.893 nucleotídeos também com 3 íntrons e proteína de 558 aminoácidos. Adicionalmente, o gene *mcl* de *P. lutzii*, com sequência genômica de 2.101 e 4 íntrons, codifica uma enzima com 602 aminoácidos. Este gene em *A. fumigatus* é composto por 2.173 nucleotídeos, 4 íntrons e 649 aminoácidos. Em *A. nidulans*, a enzima MCL apresenta 604 aminoácidos (BROCK, 2005). Quanto à localização sub-celular, em *Toxoplasma gondii*, as enzimas do ciclo do metilcitrato estão presentes tanto no citoplasma quanto no interior da mitocôndria (LIMENITAKIS et al., 2013). A localização sub-celular destas enzimas reflete mecanismos de pressão seletiva, uma vez que propionil-CoA é gerado também pela β-oxidação de ácidos graxos de cadeia ímpar no interior da mitocôndria. Por análises *in silico* e fusionamento à GFP, também em *T. gondii*, a enzima propionil-CoA sintetase e a MCS foram achadas exclusivamente no interior da mitocôndria, enquanto que a MCD foi identificada como proteína citosólica. Já a MCL foi encontrada no citosol e na região periférica da mitocôndria. Portanto, os dois primeiros passos da detoxificação de propionil-CoA devem ocorrer no interior da mitocôndria (LIMENITAKIS et al., 2013), e os demais, provavelmente, ocorram no citosol. Portanto, neste organismo, o CMC provavelmente inicia-se na mitocôndria e se reloca ao citosol após a geração de metilcitrato pela MCS (LIMENITAKIS et al., 2013).

Tem sido proposto que propionil-CoA é exportado ao citosol via transportador do ácido tricaboxílico presente na membrana da mitocôndria (CHEEMA-DHADLI et al., 1975). A MCD, no citoplasma, poderia, então, converter o metilcitrato a metil-*cis*-aconitato que, posteriormente, pode ser usado como substrato por uma aconitase na geração do metilisocitrato. A MCL, por fim, atua na quebra do metilisocitrato a piruvato e succinato que podem ser usados para diferentes reações dentro e fora da mitocôndria. O piruvato e succinato podem entrar novamente na mitocôndria via transportadores de ácido dicarboxílico e monocarboxílico, respectivamente, para integrarem o ciclo do ácido cítrico. Semelhantemente à localização descrita para *T. gondii*, análises *in silico* das sequências de aminoácido da MCS e MCL de *P. lutzii* revelaram a presença de sequência de peptídeo para direcionamento mitocondrial. A MCD apresentou localização mitocondrial e citosólica, enquanto que a PCL apresentou predição de localização na membrana plasmática e no citosol.

A PCL é uma enzima responsável por adicionar o grupo CoASH ao propionato. Em nossa análise de expressão gênica por qPCR, o gene dessa enzima foi em torno de três vezes mais induzido na presença de propionato do que em glicose, tanto na levedura quanto no micélio de *P. lutzii*, embora não tenha sido identificada pela análise proteômica. Nós sugerimos que o propionato,

ao ser convertido a propionil-CoA logo na membrana plasmática pela propionil-CoA ligase, pode requerer a carnitina acetiltransferase para transporte deste metabólito para o interior da mitocôndria, pois essa enzima apresentou-se induzida na presença de propionato (Tabela 8). Assim, propionil-CoA, no interior da mitocôndria, seria metabolizado pelo CMC. Resultados similares também foram reportados em *A. niger* (KOBAYASHI et al., 2013) e *C. lipolytica* (UCHIYAMA et al., 1982).

Embora tenha tido um lento crescimento sob condições *in vitro*, pode-se observar que *P. lutzii* é capaz de usar o propionato como única fonte de carbono (Figuras 7 e 8) sob concentração de até 15 mM. Acima de 20 mM, propionato apresentou-se tóxico, pois mesmo suplementado com glicose o fungo não foi capaz de crescer. Contudo, ensaios de ruptura gênica das enzimas do CMC são necessários para avaliar se este ciclo é essencial para o crescimento de *Paracoccidioides* spp. tendo como única fonte de carbono propionato de sódio ou outra fonte geradora de propionil-CoA.

A capacidade dos patógenos infectarem e se estabelecerem no hospedeiro está relacionada com a interação entre ambos os organismos. E um dos meios pelos quais os micro-organismos utilizam para se estabelecerem aos diferentes nichos parasitários é a adaptação por meio da alteração de expressão gênica, como demonstrado em Cryptococcus neoformans em condições in vivo (STEEN et al., 2003). O perfil transcriptômico da levedura de P. lutzii, determinado a partir de células de fígado de camundongo infectado, demonstrou a expressão elevada das seguintes vias: glicólise, biossíntese de aminoácido, lipídeos e metabolismo de esterol, sugerindo uma expressão gênica diferencial em resposta ao ambiente hospedado (COSTA et al., 2007). O ensaio de qPCR mostrou que os genes codificantes para o ciclo do metilcitrato sofreram indução em propionato, nas formas de levedura e micélio, e em concordância com nossos dados proteômicos, em que conseguimos identificar as enzimas MCS e MCD induzidas também em propionato. Portanto, somados os dados de que P. lutzii pode utilizar propionato como fonte de carbono, com a resposta metabólica do fungo tanto no nível transcricional quanto no nível proteômico, nós sugerimos que o CMC é utilizado para metabolismo dessa fonte de carbono em P. lutzii.

Estudos tem demonstrado que a atividade enzimática da metilcitrato sintase é aumentada em resposta metabólica a fontes geradoras de propionil-CoA (BROCK et al., 2000; KOBAYASHI et al., 2013). Em nossas análises, a atividade enzimática dessa enzima a partir do extrato proteico bruto do micélio e da levedura também foi aumentada com o fungo incubado em propionato. Esta ocorrência também está de acordo com nossa análise proteômica, em que o teor da MCS foi induzido. Além disso, interessantemente a atividade em micélio foi 35% maior do que em levedura, o que sugere plasticidade metabólica do fungo pois, se essa atividade é mais eficiente, o fungo tem maior sucesso de colonização saprobiótica, ou seja, em locais onde propionato é largamente encontrado, como no solo e matéria orgânica em decomposição. Também foi detectada atividade da MCS no sobrenadante da incubação de levedura e de micélio de P. luzii. Weber e colaboradores (2012) identificaram 9 isoformas dessa enzima secretadas, sendo 4 por levedura, 1 por micélio e 4 comuns às 2 formas. O fato da MCS de *P. lutzii* ser secretada e se achar enzimaticamente ativa sugere que esta enzima pode estar desempenhando outra função extracelularmente. Contudo, outros estudos são necessários para o esclarecimento dessa constatação.

Já atividade enzimática da metilcitrato sintase em propionato suplementado com glicose não foi aumentada em levedura, chegando a ser inferior do que em glicose no micélio. Isso pode ser em decorrência do fungo captar glicose como fonte de carbono preferencial, mostrado também por nossa análise de crescimento da levedura de *P. lutzii* em glicose com propionato (Figura 7), que nas primeiras 24 horas dobrou de quantidade, estabilizando a sua taxa de crescimento após esse tempo. Otzen e colaboradores (2014) analisaram o crescimento de *C. albicans* também em glicose com propionato e observaram resultados semelhantes. Enquanto havia glicose o crescimento era intenso, mas após o completo consumo da glicose o crescimento apresentou-se estável.

Tem sido demonstrado também que a MCS pode exercer função tanto de citrato sintase quanto de metilcitrato sintase no gênero *Aspergillus* (BROCK et al., 2000; MAERKER et al., 2005; KOBAYASHI et al., 2013). A citrato sintase catalisa a formação do citrato pela condensação de oxaloacetato com acetil-CoA, enquanto que a metilcitrato sintase catalisa a formação do metilcitrato pela

condensação de propionil-CoA com oxaloacetato. Sendo assim, para analisar o duplo papel dessa enzima em *P. lutzii*, foi feita a purificação e determinação das propriedades bioquímicas da MCS recombinante. A atividade específica da MCS foi em torno de 2,3 vezes maior em acetil-CoA quando comparado à propionil-CoA. Contudo, o K_m nos dois substratos foram similares sem oxaloacetato (1,59 para propionil-CoA; 1,57 para acetil-CoA) mas, na presença de oxaloacetato, o K_m da enzima em propionil-CoA foi 30% menor do que em acetil-CoA. Essa dupla atividade e diminuição do K_m aponta para a dupla função da MCS, mas essa enzima atuaria preferencialmente no metabolismo de propionil-CoA, já que em condições fisiológicas o oxaloacetato está presente no meio intracelular. Similar padrão bioquímico é observado para a eficiência catalítica da enzima, sendo, portanto, possível observar que, em propionil-CoA, foi cerca de 57% menor quando comparado a acetil-CoA mas, com a adição de oxaloacetato, a diferença cai para 36%. Portanto, estes resultados apontam para o duplo papel da MCS de *P. lutzii*, podendo atuar no CMC e, possivelmente, no ciclo do ácido cítrico.

Em nossa análise proteômica, identificamos muitas vias metabólicas que sofreram regulação em resposta ao propionato. E ao que indica, essas alterações carregam dois traços marcantes. Um é para o rearranjo metabólico do fungo para reciclagem proteica e metabolismo dos aminoácidos. O outro e, por extensão do primeiro, é para que propionato seja utilizado como fonte de carbono. Observa-se que há intensa degradação de proteínas, por uma série de proteínas relacionadas a essa via terem sido identificadas, como aminopeptidases e proteassomas. A degradação proteica pode ocorrer em função da utilização dos aminoácidos proveniente das proteínas como fontes de carbono para produção energética e produção de intermediários para biossíntese de moléculas essenciais (SALUSKY et al., 1983)

A degradação proteica gera vários aminoácidos que podem ser utilizados como combustíveis celulares. Consequente à degradação proteica, várias proteínas relacionadas às vias de degradação de aminoácidos foram induzidas em propionato. Portanto, os esqueletos carbônicos gerados pela degradação de aminoácidos poderiam ser utilizados como fonte de energia no TCA, na geração de componentes estruturais pelo ciclo do glioxilato, na gliconeogênese ou mesmo no CMC. O TCA, juntamente com a glicólise, foi reprimido comparado ao controle. Somente as enzimas succinato desidrogenase, fumarato desidrogenase e malato desidrogenase do TCA foram induzidas. Contudo, estas enzimas são também comuns aos ciclos do glioxilato e CMC. No ciclo do glioxilato, identificamos também a isocitrato liase induzida. Portanto, o ciclo do glioxilato pode estar induzido juntamente com o CMC. O ciclo do glioxilato para geração de componentes estruturais, a partir do acetil-CoA oriundo da degradação de aminoácidos e o CMC na metabolização de propionil-CoA, proveniente do propionato. Apesar do CMC gerar piruvato que tem como um dos principais destinos o TCA, esta conversão é lenta como sugerido pelo baixo crescimento do do fungo em propionato. O succinato gerado no ciclo do glioxilato serve para propósitos biossintéticos como a síntese de glicose via gliconeogênese (CRUZ et al., 2011).

A enzima frutose-1,6-bifosfatase, exclusiva da gliconeogênese, foi induzida na presença de propionato. Portanto, a glicose poderá ser gerada a partir dos esqueletos carbônicos para produção de energia ou de componentes estruturais. Quanto à glicólise, hexoguinase e piruvato guinase foram identificadas reprimidas. Essa constatação já era esperada, pois propionato é metabolizado via CMC como já demonstrado por outros estudos (BROCK et al., 2000; BROCK et al., 2004; ZHANG et al., 2004; OTZEN et al., 2014). Além disso, a piruvato desidrogenase (PDH) também foi inibida. Tem sido descrito que essa enzima pode ser inibida pelo aumento da concentração intracelular de propionil-CoA (BROCK et al., 2004) por competição entre grupos CoA. Em P. lutzii poderia estar ocorrendo o mesmo efeito, caso a internalização de propionato seja mais rápida do que a velocidade de metabolização de propionil-CoA. Contudo, ensaios complementares são necessários confirmação para dessa hipótese. Adicionalmente, a baixa eficiência na conversão de propionato em piruvato pode resultar na menor expressão da PDH guando em comparação com a glicose que induz alta produção de piruvato. A inibição da PDH também corrobora com alta degradação de aminoácidos que fonecem metabólitos para o TCA para produção de energia, e, neste contexto o piruvato do CMC seria direcionado para a gliconeogênese.

Na presença de propionato, a oxidação de ácidos graxos também foi induzida enquanto que a síntese foi reprimida, sugerindo que o fungo estaria utilizando ácidos graxos endógenos como fonte complementar de energia. Além disso, uma álcool-desidrogenase foi reprimida e vários componentes da cadeia de transporte de elétrons foram induzidos, sugerindo um metabolismo aeróbio correspondente com as repostas metabólicas observadas.

Por fim, como demonstrado, propionato é uma fonte que pode ser tóxico ao *P. lutzii* em altas concentrações, mas que também pode ser utilizada como fonte de energia celular em menores quantidades. Adicionalmente, apesar de *P. lutzii* ter apresentado modesto crescimento em propionato, ao sofrer readaptação metabólica, ativa vias do metabolismo no intuito de suprir a demanda energética, na qual se destaca a ativação do CMC no metabolismo de propionato neste patógeno. Identificar a forma pelo qual *P. lutzii* metaboliza propionil-CoA é importante pois o acúmulo desse metabólito em fungos e bactérias tem demonstrado toxicidade celular e atenuação da virulência (BROCK et al., 2004; MUNOZ-ELIAS et al., 2006; OTZEN et al., 2014). Com isso, a interrupção do metabolismo de propionil-CoA tem assumido papel de potencial alvo para ação de medicamentos.
CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, foi possível observar que:

- P. lutzii utiliza propionato como única fonte de carbono em baixas concentrações;
- Paracoccidioides spp. possui genes codificantes para enzimas do CMC e metaboliza propionato por este ciclo;
- Na presença de propionato, foi almentada a expressão dos genes mcs, mcd, mcl e pcl além de induzir o aumento de atividade da MCS em P. lutzii.
 A atividade foi aumentada tanto intra- quanto extracelularmente em micélio e levedura, demonstrando que a MCS secretada é enzimaticamente ativa;
- A MCS de *P. lutzii* apresentou potencial de metabolização de propionil-CoA e acetil-CoA, podendo atuar como uma metilcitrato sintase ou citrato sintase;
- O perfil proteômico de *P. lutzii* em propionato revelou regulação do metabolismo de aminoácidos, carboidratos, compostos de carbono, metabolismo de ácidos graxos e lipídeos. A glicólise e o TCA foram reprimidos, enquanto que a gliconeogênese, o ciclo do glioxilato e o CMC foram induzidos quando comparado com o fungo em glicose;
- A capacidade de *P. lutzii* de metabolizar e utilizar propionato como fonte de carbono lhe confere plasticidade metabólica para aumentar sua chance de sucesso ao colonizar tanto o ambiente saprobiótico quanto o ambiente hospedeiro.

- Silenciamento dos genes relacionados ao CMC;
- Análise de virulência do mutante;
- Obtenção de aticorpo contra MCS (etapa em andamento);
- Produção de anticorpos contra MCD e MCL;
- Localização celular das enzimas do CMC.
- Comparação entre representantes das espécies filogenéticas S1, PS2 e PS3 do gênero *Paracoccidioides*.

AJELLO, L.; POLONELLI, L. Imported paracoccidioidomycosis: a public health problem in non-endemic areas. **Eur J Epidemiol** 1(3): 160-165, 1985.

ALBUQUERQUE, P. C.; NAKAYASU, E. S.; RODRIGUES, M. L.; FRASES, S.; CASADEVALL, A.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; ALMEIDA, I. C.; NOSANCHUK, J. D. Vesicular transport in *Histoplasma capsulatum*: an effective mechanism for trans-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes. **Cell Microbiol** 10(8): 1695-1710, 2008.

ARANTES, T. D.; THEODORO, R. C.; DA GRACA MACORIS, S. A.; BAGAGLI, E. Detection of *Paracoccidioides* spp. in environmental aerosol samples. **Med Mycol** 51(1): 83-92, 2013.

ARISTIZABAL, B. H.; CLEMONS, K. V.; STEVENS, D. A.; RESTREPO, A. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: in vivo inhibition in females. **Infect Immun** 66(11): 5587-5591, 1998.

BAGAGLI, E.; FRANCO, M.; BOSCO SDE, M.; HEBELER-BARBOSA, F.; TRINCA, L. A.; MONTENEGRO, M. R. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. **Med Mycol** 41(3): 217-223, 2003.

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

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

BAILÃO, A. M.; SHRANK, A.; BORGES, C. L.; PARENTE, J. A.; DUTRA, V.; FELIPE, M. S.; FIUZA, R. B.; PEREIRA, M.; DE ALMEIDA SOARES, C. M. The

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

BARROZO, L. V.; MENDES, R. P.; MARQUES, S. A.; BENARD, G.; SILVA, M. E.; BAGAGLI, E. Climate and acute/subacute paracoccidioidomycosis in a hyperendemic area in Brazil. **Int J Epidemiol** 38(6): 1642-1649, 2009.

BARROZO, L. V.; BENARD, G.; SILVA, M. E.; BAGAGLI, E.; MARQUES, S. A.; MENDES, R. P. First description of a cluster of acute/subacute paracoccidioidomycosis cases and its association with a climatic anomaly. **PLoS Negl Trop Dis** 4(3): e643, 2010.

BLOTTA, M. H.; MAMONI, R. L.; OLIVEIRA, S. J.; NOUER, S. A.; PAPAIORDANOU, P. M.; GOVEIA, A.; CAMARGO, Z. P. Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. **Am J Trop Med Hyg** 61(3): 390-394, 1999.

BOOKOUT, A. L.; CUMMINS, C. L.; MANGELSDORF, D. J.; PESOLA, J. M.; KRAMER, M. F. High-throughput real-time quantitative reverse transcription PCR. **Curr Protoc Mol Biol** Chapter 15: Unit 15 18, 2006.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem** 72: 248-254, 1976.

BRAMER, C. O.; STEINBUCHEL, A. The methylcitric acid pathway in *Ralstonia eutropha*: new genes identified involved in propionate metabolism. **Microbiology** 147(Pt 8): 2203-2214, 2001.

BRAMER, C. O.; SILVA, L. F.; GOMEZ, J. G.; PRIEFERT, H.; STEINBUCHEL, A. Identification of the 2-methylcitrate pathway involved in the catabolism of propionate in the polyhydroxyalkanoate-producing strain *Burkholderia sacchari* IPT101(T) and analysis of a mutant accumulating a copolyester with higher 3-hydroxyvalerate content. **Appl Environ Microbiol** 68(1): 271-279, 2002.

BROCK, M.; FISCHER, R.; LINDER, D.; BUCKEL, W. Methylcitrate synthase from *Aspergillus nidulans*: implications for propionate as an antifungal agent. **Mol Microbiol** 35(5): 961-973, 2000.

BROCK, M.; DARLEY, D.; TEXTOR, S.; BUCKEL, W. 2-Methylisocitrate lyases from the bacterium *Escherichia coli* and the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*: characterization and comparison of both enzymes. **Eur J Biochem** 268(12): 3577-3586, 2001.

BROCK, M.; BUCKEL, W. On the mechanism of action of the antifungal agent propionate. **Eur J Biochem** 271(15): 3227-3241, 2004.

BROCK, M. Generation and phenotypic characterization of *Aspergillus nidulans* methylisocitrate lyase deletion mutants: methylisocitrate inhibits growth and conidiation. **Appl Environ Microbiol** 71(9): 5465-5475, 2005.

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin Microbiol Rev** 6(2): 89-117, 1993.

BUCKEL, W. Anaerobic energy metabolism. In: _____. **Biology of the Procaryotes**. J. W. Lengeler, G. Drews and H. G. Schelegel. Stuttgart: Thieme, 1999. 278-326.

CAMARGO, Z. P.; FRANCO, M. F. Current Knowledge on Pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Rev Iberoam Micol** 17: 41-48 2000.

CARRERO, L. L.; NINO-VEGA, G.; TEIXEIRA, M. M.; CARVALHO, M. J.; SOARES, C. M.; PEREIRA, M.; JESUINO, R. S.; MCEWEN, J. G.; MENDOZA, L.; TAYLOR, J. W.; FELIPE, M. S.; SAN-BLAS, G. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. **Fungal Genet Biol** 45(5): 605-612, 2008.

CHANDLER, R. J.; VENDITTI, C. P. Genetic and genomic systems to study methylmalonic acidemia. **Mol Genet Metab** 86(1-2): 34-43, 2005.

CHEEMA-DHADLI, S.; LEZNOFF, C. C.; HALPERIN, M. L. Effect of 2methylcitrate on citrate metabolism: implications for the management of patients with propionic acidemia and methylmalonic aciduria. **Pediatr Res** 9(12): 905-908, 1975.

CHIKAMORI, T.; SAKA, S.; NAGANO, H.; SAEKI, S.; LACAZ CDA, S.; RODRIGUES, M. C.; CASSAGUERRA, C. M.; BRACCIALLI, M. L. Paracoccidioidomycosis in Japan. Report of a case. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** 26(5): 267-271, 1984.

CLAES, W. A.; PUHLER, A.; KALINOWSKI, J. Identification of two prpDBC gene clusters in *Corynebacterium glutamicum* and their involvement in propionate degradation via the 2-methylcitrate cycle. **J Bacteriol** 184(10): 2728-2739, 2002.

CONRAD, R.; KLOSE, M. Anaerobic conversion of carbon dioxide to methane, acetate and propionate on washed rice roots. **FEMS Microbiol Ecol** 30(2): 147-155, 1999.

CONTI-DIAZ, I. A.; ALVAREZ, B. J.; GEZUELE, E. Encuesta mediante intradermoreacciones con paracoccidioidina e histoplasmina en caballos. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** 14: 5, 1972.

CONTI-DIAZ, I. A. On the unknown ecological niche of *Paracoccidioides brasiliensis*: our hypothesis of 1989: present status and perspectives. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** 49(2): 131-134, 2007.

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. The naked-tailed armadillo *Cabassous centralis* (Miller 1899): a new host to *Paracoccidioides brasiliensis*. Molecular identification of the isolate. **Med Mycol** 43(3): 275-280, 2005.

COSTA, E. O.; DINIZ, L. S.; NETTO, C. F.; ARRUDA, C.; DAGLI, M. L. Delayed hypersensitivity test with paracoccidioidin in captive Latin American wild mammals. **J Med Vet Mycol** 33(1): 39-42, 1995.

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

COUTINHO, Z. F.; SILVA, D.; LAZERA, M.; PETRI, V.; OLIVEIRA, R. M.; SABROZA, P. C.; WANKE, B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). Cad Saude Publica 18(5): 1441-1454, 2002.

CRONAN, J. E. J.; LAPORTE, D. Tricarboxylic acid cycle and glyoxylate bypass. In: _____. *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. F. C. Neidhardt, R. Curtiss, I. III, J. L.et al. Washington, DC: ASM Press, 1996. 206-216.

CRUZ, A. H.; BROCK, M.; ZAMBUZZI-CARVALHO, P. F.; SANTOS-SILVA, L. K.; TROIAN, R. F.; GOES, A. M.; SOARES, C. M.; PEREIRA, M. Phosphorylation is the major mechanism regulating isocitrate lyase activity in Paracoccidioides brasiliensis yeast cells. **FEBS J** 278(13): 2318-2332, 2011.

DA COSTA, E. O.; FAVA NETTO, C. Contribution to the epidemiology of paracoccidioidomycosis and histoplasmosis in the state of Sao Paulo, Brazil. Paracoccidioidin and histoplasmin intradermic tests in domestic animals. **Sabouraudia** 16(2): 93-101, 1978.

DE ALBORNOZ, M. B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. **Sabouraudia** 9(3): 248-253, 1971.

DE CAMARGO, Z. P.; DE FRANCO, M. F. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Rev Iberoam Micol** 17(2): 41-48, 2000.

DEODATO, F.; BOENZI, S.; SANTORELLI, F. M.; DIONISI-VICI, C. Methylmalonic and propionic aciduria. **Am J Med Genet C Semin Med Genet** 142C(2): 104-112, 2006.

DESJARDINS, C. A.; CHAMPION, M. D.; HOLDER, J. W.; MUSZEWSKA, A.; GOLDBERG, J.; BAILAO, A. M.; BRIGIDO, M. M.; FERREIRA, M. E.; GARCIA, A. M.; GRYNBERG, M.; GUJJA, S.; HEIMAN, D. I.; HENN, M. R.; KODIRA, C. D.; LEON-NARVAEZ, H.; LONGO, L. V.; MA, L. J.; MALAVAZI, I.; MATSUO, A. L.; MORAIS, F. V.; PEREIRA, M.; RODRIGUEZ-BRITO, S.; SAKTHIKUMAR, S.; SALEM-IZACC, S. M.; SYKES, S. M.; TEIXEIRA, M. M.; VALLEJO, M. C.; WALTER, M. E.; YANDAVA, C.; YOUNG, S.; ZENG, Q.; ZUCKER, J.; FELIPE, M. S.; GOLDMAN, G. H.; HAAS, B. J.; MCEWEN, J. G.; NINO-VEGA, G.; PUCCIA, R.; SAN-BLAS, G.; SOARES, C. M.; BIRREN, B. W.; CUOMO, C. A. Comparative genomic analysis of human fungal pathogens causing paracoccidioidomycosis. **PLoS Genet** 7(10): e1002345, 2011.

FAVA-NETTO, C. Estudos quantitativos sobre a fixação de complemento na blatomicose sul-americana, com antígeno polissacarídico. **Arq Cir Clin Exp** 18: 197-254, 1995.

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

FRANCO, M.; MONTENEGRO, M. R.; MENDES, R. P.; MARQUES, S. A.; DILLON, N. L.; MOTA, N. G. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. **Rev Soc Bras Med Trop** 20(2): 129-132, 1987.

GARCIA, N. M.; DEL NEGRO, G. M.; HEINS-VACCARI, E. M.; DE MELO, N. T.; DE ASSIS, C. M.; LACAZ CDA, S. [*Paracoccidioides brasiliensis*, a new sample isolated from feces of a penguin (*Pygoscelis adeliae*)]. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** 35(3): 227-235, 1993.

GEROMANOS, S. J.; VISSERS, J. P.; SILVA, J. C.; DORSCHEL, C. A.; LI, G. Z.; GORENSTEIN, M. V.; BATEMAN, R. H.; LANGRIDGE, J. I. The detection, correlation, and comparison of peptide precursor and product ions from data independent LC-MS with data dependent LC-MS/MS. **Proteomics** 9(6): 1683-1695, 2009.

GONZALEZ, J. F.; MONTIEL, N. A.; MAASS, R. L. First report on the diagnosis and treatment of encephalic and urinary paracoccidioidomycosis in a cat. **J Feline Med Surg** 12(8): 659-662, 2010.

GREER, D. L.; BOLANOS, B. Role of bats in the ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: the survival of *Paracoccidioides brasiliensis* in the intestinal tract of frugivorous bat, *Artibeus lituratus*. **Sabouraudia** 15(3): 273-282, 1977.

HALARNKAR, P. P.; BLOMQUIST, G. J. Comparative aspects of propionate metabolism. **Comp Biochem Physiol B** 92(2): 227-231, 1989.

HASEGAWA, J.; OGURA, M.; KANEMA, H.; WATANABE, K. Production of 3hydroxypropionic acid from propionic acid by a *Candida rugosa* mutant unable to assimilate propionic acid. **Journal of Fermentation Technology** 60: 591-594, 1982.

HORSWILL, A. R.; ESCALANTE-SEMERENA, J. C. Salmonella typhimurium LT2 catabolizes propionate via the 2-methylcitric acid cycle. **J Bacteriol** 181(18): 5615-5623, 1999.

IBRAHIM-GRANET, O.; DUBOURDEAU, M.; LATGE, J. P.; AVE, P.; HUERRE, M.; BRAKHAGE, A. A.; BROCK, M. Methylcitrate synthase from *Aspergillus fumigatus* is essential for manifestation of invasive aspergillosis. **Cell Microbiol** 10(1): 134-148, 2007.

JOSEPH, E. A.; MARE, A.; IRVING, W. R., JR. Oral South American blastomycosis in the United States of America. Report of a case. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol** 21(6): 732-737, 1966.

KOBAYASHI, K.; HATTORI, T.; HONDA, Y.; KIRIMURA, K. Gene identification and functional analysis of methylcitrate synthase in citric acid-producing *Aspergillus niger* WU-2223L. **Biosci Biotechnol Biochem** 77(7): 1492-1498, 2013.

KORNBERG, H. L.; KREBS, H. A. Synthesis of cell constituents from C2-units by a modified tricarboxylic acid cycle. **Nature** 179(4568): 988-991, 1957.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. Paracoccidioidomicosis. In: _____. Micologia Médica. São Paulo: Sarvier Editora, 1991. 248-261.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227(5259): 680-685, 1970.

LECLERC, M. C.; PHILIPPE, H.; GUEHO, E. Phylogeny of dermatophytes and dimorphic fungi based on large subunit ribosomal RNA sequence comparisons. **J Med Vet Mycol** 32(5): 331-341, 1994.

LEDLEY, F. D.; CRANE, A. M.; KLISH, K. T.; MAY, G. S. Is there methylmalonyl CoA mutase in *Aspergillus nidulans*? **Biochem Biophys Res Commun** 177(3): 1076-1081, 1991.

LEE, S. H.; PARK, S. J.; PARK, O. J.; CHO, J.; RHEE, J. W. Production of 3hydroxypropionic acid from acrylic acid by newly isolated *Rhodococcus erythropolis* LG12. J Microbiol Biotechnol 19(5): 474-481, 2009.

LI, G. Z.; VISSERS, J. P.; SILVA, J. C.; GOLICK, D.; GORENSTEIN, M. V.; GEROMANOS, S. J. Database searching and accounting of multiplexed precursor and product ion spectra from the data independent analysis of simple and complex peptide mixtures. **Proteomics** 9(6): 1696-1719, 2009.

LIMENITAKIS, J.; OPPENHEIM, R. D.; CREEK, D. J.; FOTH, B. J.; BARRETT, M. P.; SOLDATI-FAVRE, D. The 2-methylcitrate cycle is implicated in the detoxification of propionate in *Toxoplasma gondii*. **Mol Microbiol** 87(4): 15, 2013.

LONDON, R. E.; ALLEN, D. L.; GABEL, S. A.; DEROSE, E. F. Carbon-13 nuclear magnetic resonance study of metabolism of propionate by *Escherichia coli*. **J Bacteriol** 181(11): 3562-3570, 1999.

LUCAS, K. A.; FILLEY, J. R.; ERB, J. M.; GRAYBILL, E. R.; HAWES, J. W. Peroxisomal metabolism of propionic acid and isobutyric acid in plants. **J Biol Chem** 282(34): 24980-24989, 2007.

MAERKER, C.; ROHDE, M.; BRAKHAGE, A. A.; BROCK, M. Methylcitrate synthase from *Aspergillus fumigatus*. Propionyl-CoA affects polyketide synthesis, growth and morphology of conidia. **FEBS J** 272(14): 3615-3630, 2005.

MARINI, M. M.; ZANFORLIN, T.; SANTOS, P. C.; BARROS, R. R.; GUERRA, A. C.; PUCCIA, R.; FELIPE, M. S.; BRIGIDO, M.; SOARES, C. M.; RUIZ, J. C.; SILVEIRA, J. F.; CISALPINO, P. S. Identification and characterization of Tc1/mariner-like DNA transposons in genomes of the pathogenic fungi of the *Paracoccidioides* species complex. **BMC Genomics** 11: 130, 2010.

MARQUES, S. A. Paracoccidioidomicose. An Bras Dermatol 73: 455-469, 1998.

MARTINEZ, R. Digestive disorders. In: _____. **Paracoccidioidomicose: Blatomicose Sul-Americana**. G. D. Negro, C. S. Lacaz and A. Fiorillo. Sarvier-EDUSP: Brazil, 1992. 61-170.

MATUTE, D. R.; SEPULVEDA, V. E.; QUESADA, L. M.; GOLDMAN, G. H.; TAYLOR, J. W.; RESTREPO, A.; MCEWEN, J. G. Microsatellite analysis of three phylogenetic species of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Clin Microbiol** 44(6): 2153-2157, 2006.

MCEWEN, J. G.; BEDOYA, V.; PATINO, M. M.; SALAZAR, M. E.; RESTREPO, A. Experimental murine paracoccidiodomycosis induced by the inhalation of conidia. **J Med Vet Mycol** 25(3): 165-175, 1987.

MCEWEN, J. G.; GARCIA, A. M.; ORTIZ, B. L.; BOTERO, S.; RESTREPO, A. In search of the natural habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Arch Med Res** 26(3): 305-306, 1995.

MIYAKOSHI, S.; UCHIYAMA, H.; SOMEYA, T.; SATOH, T.; TABUCHI, T. Distribution of the Methylcitric Acid Cycle and beta-Oxidation Pathway for Propionate Catabolism in Fungi. **Agr. Biol. Chem.** 51(9): 2381-2387, 1987.

MONTENEGRO, M. R. [Clinical forms of paracoccidioidomycosis]. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** 28(3): 203-204, 1986.

MONTENEGRO, M. R.; MIYAJI, M.; FRANCO, M.; NISHIMURA, K.; COELHO, K. I.; HORIE, Y.; MENDES, R. P.; SANO, A.; FUKUSHIMA, K.; FECCHIO, D. Isolation of fungi from nature in the region of Botucatu, state of Sao Paulo, Brazil, an endemic area of paracoccidioidomycosis. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 91(6): 665-670, 1996.

MUNOZ-ELIAS, E. J.; UPTON, A. M.; CHERIAN, J.; MCKINNEY, J. D. Role of the methylcitrate cycle in *Mycobacterium tuberculosis* metabolism, intracellular growth, and virulence. **Mol Microbiol** 60(5): 1109-1122, 2006.

MURAD, A. M.; SOUZA, G. H.; GARCIA, J. S.; RECH, E. L. Detection and expression analysis of recombinant proteins in plant-derived complex mixtures using nanoUPLC-MS(E). **J Sep Sci** 34(19): 2618-2630, 2011.

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

OEHRING, S. C.; WOODCROFT, B. J.; MOES, S.; WETZEL, J.; DIETZ, O.; PULFER, A.; DEKIWADIA, C.; MAESER, P.; FLUECK, C.; WITMER, K.; BRANCUCCI, N. M.; NIEDERWIESER, I.; JENOE, P.; RALPH, S. A.; VOSS, T. S. Organellar proteomics reveals hundreds of novel nuclear proteins in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Genome Biol** 13(11): R108, 2012.

OTZEN, C.; BARDL, B.; JACOBSEN, I. D.; NETT, M.; BROCK, M. Candida albicans utilizes a modified beta-oxidation pathway for the degradation of toxic propionyl-CoA. **J Biol Chem** 289(12): 8151-8169, 2014.

PALACIOS, S.; ESCALANTE-SEMERENA, J. C. 2-Methylcitrate-dependent activation of the propionate catabolic operon (prpBCDE) of Salmonella enterica by the PrpR protein. **Microbiology** 150(Pt 11): 3877-3887, 2004.

PANUNTO-CASTELO, A.; FREITAS-DA-SILVA, G.; BRAGHETO, I. C.; MARTINEZ, R.; ROQUE-BARREIRA, M. C. *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens: recognition by IgG from patients with different clinical forms of paracoccidioidomycosis. **Microbes Infect** 5(13): 1205-1211, 2003.

PARENTE, J. A.; SALEM-IZACC, S. M.; SANTANA, J. M.; PEREIRA, M.; BORGES, C. L.; BAILAO, A. M.; SOARES, C. M. A secreted serine protease of *Paracoccidioides brasiliensis* and its interactions with fungal proteins. **BMC Microbiol** 10: 292, 2010.

PIGOSSO, L. L.; PARENTE, A. F.; COELHO, A. S.; SILVA, L. P.; BORGES, C. L.; BAILAO, A. M.; SOARES, C. M. Comparative proteomics in the genus *Paracoccidioides*. **Fungal Genet Biol** 60: 87-100, 2013.

PINZAN, C. F.; RUAS, L. P.; CASABONA-FORTUNATO, A. S.; CARVALHO, F. C.; ROQUE-BARREIRA, M. C. Immunological basis for the gender differences in murine *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **PLoS One** 5(5): e10757, 2010.

PRADO, M.; DA SILVA, M. B.; LAURENTI, R.; TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 104(3): 513-521, 2009.

QUEIROZ-TELLES, F. *Paracoccidioides brasiliensis* ultrastructural Wndings. In: _____. **Paracoccidioidomycosis**. M. Franco, C. S. Lacaz, A. Restrepo-Moreno and G. Del Negro. London: CRC Press, 1994. 27–44.

RAMOS, E. S. M.; SARAIVA LDO, E. Paracoccidioidomycosis. **Dermatol Clin** 26(2): 257-269, vii, 2008.

REMENTERIA, A.; LOPEZ-MOLINA, N.; LUDWIG, A.; VIVANCO, A. B.; BIKANDI, J.; PONTON, J.; GARAIZAR, J. Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. **Rev Iberoam Micol** 22(1): 1-23, 2005.

RESTREPO-MORENO, A. Serological Comparison of the Two Morphological Phases of Paracoccidioides brasiliensis. **Infect Immun** 2(3): 268-273, 1970.

RESTREPO-MORENO, A. Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*. In: _____. **Paracoccidioidomycosis**. M. Franco, C. S. Lacaz, A. Restrepo-Moreno and G. Del Negro. Boca Ratton: CRC Press

1994. 121-130.

RESTREPO-MORENO, A. Paracoccidioidomycosis. In: _____. Clinical Mycology. W. E. Dismukes, P. G. Pappas and J. Sobel. New York: Oxford University Press, 2003. 328–345.

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

RESTREPO, A.; SALAZAR, M. E.; CANO, L. E.; STOVER, E. P.; FELDMAN, D.; STEVENS, D. A. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. **Infect Immun** 46(2): 346-353, 1984.

RESTREPO, A.; MCEWEN, J. G.; CASTANEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Med Mycol** 39(3): 233-241, 2001.

RESTREPO, A.; TOBON, A. *Paracoccdidioides brasiliensis*. In: _____. **Principles and Practice of infectious diseases**. G. L. Mandell, J. E. Bennet and R. Dollin. Philadelphia, 2005. 3062-3068.

REZENDE, T. C.; BORGES, C. L.; MAGALHAES, A. D.; DE SOUSA, M. V.; RICART, C. A.; BAILAO, A. M.; SOARES, C. M. A quantitative view of the morphological phases of *Paracoccidioides brasiliensis* using proteomics. **J Proteomics** 75(2): 572-587, 2011.

RICCI, G.; MOTA, F. T.; WAKAMATSU, A.; SERAFIM, R. C.; BORRA, R. C.; FRANCO, M. Canine paracoccidioidomycosis. **Med Mycol** 42(4): 379-383, 2004.

RICHINI-PEREIRA, V. B.; BOSCO SDE, M.; GRIESE, J.; THEODORO, R. C.; MACORIS, S. A.; DA SILVA, R. J.; BARROZO, L.; TAVARES, P. M.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; BAGAGLI, E. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed wild animals. **Med Mycol** 46(1): 35-40, 2008.

SALUSKY, I. B.; FLUGEL-LINK, R. M.; JONES, M. R.; KOPPLE, J. D. Effect of acute uremia on protein degradation and amino acid release in the rat hemicorpus. **Kidney Int Suppl** 16: S43-47, 1983.

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

SAN-BLAS, G.; NINO-VEGA, G. *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and host response. In: _____. Fungal pathogenesis: principles and clinical applications. R. L. Cihlar and R. A. Calderone. New York: Marcel Dekker, 2001. 205-242.

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

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; TELLES FILHO FDE, Q.; MENDES, R. P.; COLOMBO, A. L.; MORETTI, M. L. [Guidelines in paracoccidioidomycosis]. **Rev Soc Bras Med Trop** 39(3): 297-310, 2006.

STEEN, B. R.; ZUYDERDUYN, S.; TOFFALETTI, D. L.; MARRA, M.; JONES, S. J.; PERFECT, J. R.; KRONSTAD, J. *Cryptococcus neoformans* gene expression during experimental cryptococcal meningitis. **Eukaryot Cell** 2(6): 1336-1349, 2003.

TABUCHI, T.; SERIZAWA, N.; OHMOMO, S. Isolation and Identification of (-)-Methylcitric Acid and 2-Methyl-*cis*-aconitic Acid from the Culture of *Candida lipolytica*. **Agr. Biol. Chem.** 38(12): 2565-2566, 1974a.

TABUCHI, T.; SERIZAWA, N.; UCHIYAMA, H. A Novel Pathway for the Partial Oxidation of Propionyl-CoA to Pyruvate via Seven-carbon Tri-carboxylic Acids in Yeasts. **Agr. Biol. Chem.** 38(12): 2571-2572, 1974b.

TABUCHI, T.; UCHIYAMA, H. Methylcitrate Condensing and Methylisocitrate Cleaving Enzymes; Evidence for the Pathway of Oxidation of Propionyl-CoA to Pyruvate via C₇-Tricarboxylic Acids. **Agr. Biol. Chem.** 39(10): 2035-2042, 1975.

TABUCHI, T.; UMETSU, H.; AOKI, H.; UCHIYAMA, H. Characteristics of 2-Methylisocitrate Dehydratase, Isolated from *Yallowia lipolytica*, in Comparison with Aconitase. **Biosci. Biotech. Biochem.** 59(11): 2013-2017, 1995.

TACCO, B. A.; PARENTE, J. A.; BARBOSA, M. S.; BAO, S. N.; GOES, T. D.; PEREIRA, M.; SOARES, C. M. Characterization of a secreted aspartyl protease of the fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med Mycol**: 1-11, 2009.

TEIXEIRA, M. D.; THEODORO, R. C.; OLIVEIRA, F. F.; MACHADO, G. C.; HAHN, R. C.; BAGAGLI, E.; SAN-BLAS, G.; FELIPE, M. S. *Paracoccidioides lutzii sp.* nov.: biological and clinical implications. **Med Mycol** 2013a.

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

TEIXEIRA, M. M.; THEODORO, R. C.; DERENGOWSKI, L. S.; MICOLA, N. A.; BAGAGLI, E.; FELIPEA, M. S. Molecular and morphological data support the existence of a sexual cycle in species of the genus *Paracoccidioides*. **Eukaryot Cell** 12(3): 10, 2013b.

TERCARIOLI, G. R.; BAGAGLI, E.; REIS, G. M.; THEODORO, R. C.; BOSCO SDE, M.; MACORIS, S. A.; RICHINI-PEREIRA, V. B. Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. **BMC Microbiol** 7: 92, 2007.

TEXTOR, S.; WENDISCH, V. F.; DE GRAAF, A. A.; MULLER, U.; LINDER, M. I.; LINDER, D.; BUCKEL, W. Propionate oxidation in *Escherichia coli*: evidence for operation of a methylcitrate cycle in bacteria. **Arch Microbiol** 168(5): 428-436, 1997.

THEODORO, R. C.; TEIXEIRA MDE, M.; FELIPE, M. S.; PADUAN KDOS, S.; RIBOLLA, P. M.; SAN-BLAS, G.; BAGAGLI, E. Genus *Paracoccidioides*: Species recognition and biogeographic aspects. **PLoS One** 7(5): e37694, 2012.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHYM, F. (2008). Microbiologia. São Paulo, Atheneu.

UCHIYAMA, H.; TABUCHI, T. Properties of Methylcitrate Synthase from *Candida lipolytica*. **Agr. Biol. Chem.** 40(7): 1411-1418, 1976.

UCHIYAMA, H.; ANDO, M.; TOYONAKA, Y.; TABUCHI, T. Subcellular Localization of the Methylcitric-Acid-Cycle Enzymes in Propionate Metabolism of *Yarrowia lipolytica*. **Eur. J. Biochem.** 125: 523-527, 1982.

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

WEBER, S. S.; PARENTE, A. F.; BORGES, C. L.; PARENTE, J. A.; BAILAO, A. M.; DE ALMEIDA SOARES, C. M. Analysis of the secretomes of *Paracoccidioides* mycelia and yeast cells. **PLoS One** 7(12): e52470, 2012.

ZHANG, Y. Q.; BROCK, M.; KELLER, N. P. Connection of propionyl-CoA metabolism to polyketide biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. **Genetics** 168(2): 785-794, 2004.