



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: 74.605-050
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 LEANDRO NASCIMENTO DA SILVA RODRIGUES - Aos vinte e oito dias do mês de novembro do ano de 2014 (28/11/2014), às 14 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. CÉLIA MARIA DE ALMEIDA SOARES, ALEXANDRE MELO BAILÃO, ANDRÉ CORRÊA AMARAL, LUCIANA CASALETTI e ROSELY MARIA ZANCOPÉ OLIVEIRA, para, sob a presidência da primeira, e em sessão pública realizada no INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, procederem à avaliação da defesa de tese intitulada: “ANÁLISE PROTEÔMICA DE *Paracoccidioides* sp. EM CONDIÇÕES DE ESTRESSE OSMÓTICO”, em nível de DOUTORADO, área de concentração em MICROBIOLOGIA, de autoria de LEANDRO NASCIMENTO DA SILVA RODRIGUES, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela Orientadora Profa. Dra. CÉLIA MARIA DE ALMEIDA SOARES, 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 tese que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu o Candidato, tendo-se adotado o sistema de diálogo seqüencial. Terminada a fase de arguição, 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

- Profa. Dra. Célia Maria de Almeida Soares
- Prof. Dr. Alexandre Melo Bailão
- Prof. Dr. André Corrêa Amaral
- Profa. Dra. Luciana Casaletti
- Profa. Dra. Rosely Maria Zancopé Oliveira

Aprovado / Reprovado

APROVADA
Aprovado
APROVADO
Aprovado
APROVADO

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidato habilitado (**Habilitado ou não Habilitado**), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **DOUTOR EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**, na área de concentração em **MICROBIOLOGIA**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 14 h 30 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de tese e para constar eu, KARINY VIEIRA SOARES E SILVA, secretária 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:

Profa. Dra. Célia Maria de Almeida Soares (ICB/UFG): Célia Maria de Almeida Soares
Prof. Dr. Alexandre Melo Bailão (ICB/UFG): Alexandre Melo Bailão
Prof. Dr. André Corrêa Amaral (IPTSP/UFG): André Corrêa Amaral
Profa. Dra. Luciana Casaletti (ICB/UFG): Luciana Casaletti
Profa. Dra. Rosely Maria Zancopé Oliveira (FIOCRUZ/RJ): Rosely Maria Zancopé Oliveira
Secretário da Pós-Graduação: Kariny Vieira Soares e Silva

CONFERECI / ORIGINAL
José Clementino de Oliveira Neto
Assistente em Administração do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública
SECRETARIO
IPTSP/UEG



UFG

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

Leandro Nascimento da Silva Rodrigues

**ANÁLISE PROTEÔMICA de *Paracoccidioides* sp. EM
CONDIÇÕES DE ESTRESSE OSMÓTICO.**

**Goiânia
2014**

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS 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: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

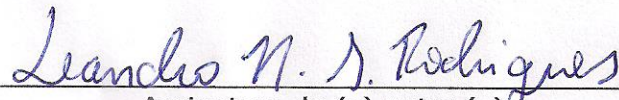
Nome completo do autor: Leandro Nascimento da Silva Rodrigues.

Título do trabalho: Análise Proteômica de *Paracoccidioides* sp. em Condições de Estresse Osmótico.

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento 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)

Data: ___/___/___

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.

Leandro Nascimento da Silva Rodrigues

**ANÁLISE PROTEÔMICA de *Paracoccidioides* sp. EM
CONDIÇÕES DE ESTRESSE OSMÓTICO.**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Doutor em Medicina Tropical e Saúde Pública.

Orientadora: Dr^a. Célia Maria de Almeida Soares

**Goiânia
2014**

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

Rodrigues, Leandro Nascimento da Silva
Análise Proteômica de Paracoccidioides sp. em condições de estresse osmótico. [manuscrito] / Leandro Nascimento da Silva Rodrigues. - 2014.
f.

Orientador: Profa. Dra. Célia Maria de Almeida Soares.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, Goiânia, 2014.

1. Osmoadaptação. 2. estresse osmótico. 3. remodelamento de parede. 4. metabolismo de aminoácidos. 5. produção de glicerol. I. Soares, Célia Maria de Almeida, orient. II. Título.

CDU 579

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

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluno (a): Leandro Nascimento da Silva Rodrigues

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Célia Maria de Almeida Soares

Membros:

1. Prof^a. Dr^a. Célia Maria de Almeida Soares

2. Prof^a. Dr^a. Rosely Maria Zancopé-Oliveira

3. Dr^a. Luciana Casaletti

4. Prof.Dr. Alexandre Melo Bailão

5. Prof.Dr. André Corrêa Amaral

Data:28/11/2014

Dedico este trabalho aos meus pais: Francisco e Maria Emília. Pois me deram a vida e os ensinamentos adequados que me proporcionaram a buscar, lutar, persistir, e principalmente a trilhar o meu caminho, não sem dificuldade, mas sempre em sinceridade e honestidade.

Dedico também à minha esposa Jéssica Rodrigues, pois esteve sempre ao meu lado em todo tempo, e teve um papel essencial ao longo do desenvolvimento deste trabalho. Sempre me impulsionou a continuar e sempre me fortaleceu quando o cansaço tendia a me dominar. Seu amor sempre me fez sentir melhor e concomitantemente me impulsou a ser melhor ao longo dessa jornada científica.

Dedico também ao meu irmão Leonardo, grande amigo e companheiro, que sofreu junto e também se alegrou junto em toda minha trajetória.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Célia, pela oportunidade, pela confiança, pelo exemplo de profissionalismo e dedicação. Pelo primor em empenhar-se para formar pesquisadores, tendo como requisitos para a formação destes o conhecimento e o entendimento da ciência, de forma que se consolidem o saber o pensar científico. Por empenhar e dedicar-se com excelência, buscando recursos, visando fornecer as melhores condições para a formação de todos os alunos. Por me ensinar que pesquisa não é meramente a aquisição de um título, mas sim uma transformação de entendimento.

Aos professores do LBM (Clayton, Alexandre, Juliana, Sílvia e Maristela), pela dedicação, pelo empenho e pela disposição em fornecer um ambiente adequado de trabalho e pela competência em ajudar os alunos a serem formadores de ideias.

Aos pós-docs (Wesley, Luciana Casaletti, Patrícia Lima, Lilian, Elisa e Mirelle) pela dedicação, pelo exemplo de responsabilidade e por estarem sempre presentes e dispostos a sanarem todas as minhas dúvidas. Muito obrigado a todos.

À prof^a. Dr^a. Ana Flávia Parente, pela prontidão em sempre me atender, por toda ajuda e pela participação eficaz para que esse trabalho fosse desenvolvido.

À grande amiga, praticamente irmã Dayane, pelas palavras precisas que me direcionavam para capacidade quando eu tendia a correr para incapacidade. Pelas trocas de conhecimentos, pelo exemplo de superação, pela prontidão em ajudar, por ser presente mesmo distante.

Aos amigos Rodrigo Santos e Mônica Santiago, sou muito grato a vocês, pois foi por intermédio de vocês que conheci e fui inserido no mundo da ciência. Sou eternamente grato a vocês.

A todos amigos e companheiros do LBM que fizeram parte desta jornada de estudo e trabalho, seja os que hoje compõem o grupo, seja os que já concluíram sua jornada no grupo. Todos contribuíram de forma eficaz, seja ajudando com experimentos ou trocando conhecimentos, bem como tomando um café trocando experiências. Sou muito grato a todos. Priscila (Naves), Lívia, Sheyla, Felipe, Joyce, Neto, Renata, Dacie, Cristina, Symone Vitoriano, Lucas Oliveira, Patrícia Zambuzzi, Amanda Gregorim, Laura, Mariana, Edilânia, Kelly, Ronney, Sabrina, Karine, Keila, Alessandro, Amanda, Daniele, Paulo Henrique, Patricia Kotch, Simone Weber, Karla, Carla Pelosi, Hanna, Leandro, Luiz Paulo, André, Gabriel, Lucas Nojosa, Luciane, Fabiana, Vanessa, Laurine, Igor, Mariele, Juliana Decúrcio, Hellen, Sarah, Miriam, Marta, Paula, Diandra, Arthur, Kleber, Janaina e todos os alunos de iniciação científica. Todos são grandes exemplos, grandes referências e tiveram uma participação especial na minha vida, na caminhada, no dia a dia na pesquisa.

" Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós." ANTOINE DE SAINT- EXUPÉRY

SUMÁRIO

	Página
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS.....	VI
RESUMO.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
1 – INTRODUÇÃO.....	10
1.1 – <i>Paracoccidioides</i>	10
1.2 – Análises proteômicas de fungos patogênicos humanos.....	14
1.3 – Respostas adaptativas ao estresse osmótico.....	18
2 – JUSTIFICATIVA.....	24
3 – OBJETIVOS.....	25
4 – ARTIGO.....	26
5 – DISCUSSÃO.....	62
6 – CONCLUSÃO.....	65
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

4HPPD: 4 hidroxifenilpiruvate dioxigenase
AADC: L- aminoácido aromático descarboxilase
AAT: aspartato aminotransferase
ADH: álcool desidrogenase
AGM: fosfoacetil glicosamina mutase
ALD: aldeído desidrogenase
ARG: arginase
BCKDE1B: 2-oxoisovalerato desidrogenase subunidade beta
CBS: cistationina beta sintase
CDO: cisteína dioxigenase
CFW: calcofluor white
CR: congo red
CS: cisteína sintase
DHCP: diidroxiacetona fosfato
ENO: enolase
EROs: espécies Reativas de Oxigênio
F-1,6-BP: frutose-1,6-bifosfato
F-6-P: frutose-6-fosfato
FAA: fumarilacetoacetato
FBA: frutose bifosfato aldolase
FBP: frutose-1,6-bifosfatase
G-1-P: glicose-1-fosfato
G-6-P: glicose-6-fosfato
GABA-AT: 4-aminobutirato aminotransferase
GAP: gliceraldeído-3-fosfato
GAPDH: gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase
GlcNac-1-p: N-acetilglicosamina-1-fosfato
GlcNac-6-P: N-acetilglicosamina-6-fosfato
GP: Glicogênio fosforilase
HGDO: homogentisato-1,2-dioxigenase
HMT: homocisteina metiltransferase

HOG: via de alta osmolaridade do glicerol

HPLC-MS: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrofotometria de massas

HSPs: proteínas de resposta ao choque térmico

IVD: isovaleril-CoA desidrogenase

LC: cromatografia líquida

MAPK: *proteína quinase ativada por mitógenos*

MMSDH: malonato-semialdeído desidrogenase

OAT: ornitine aminotransferase

OTC: ornitina carbamoiltransferase

PCK: fosfoenolpiruvato carboxicinase

PCM: paracoccidiodomicose

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

PCX: piruvato carboxilase

PDC: piruvato decarboxilase

PDH: piruvato desidrogenase

PGAM: fosfoglicerato mutase

PGI: glicose-6-fosfato isomerase

PGK: fosfoglicerato quinase

PGL: 6 – fosfoglicono lactonase

PGM: fosfoglicomutase

PYK: piruvato quinase

RI-5-P: ribose-5-fosfato isomerase

SHMT: serina hidroximetiltransferase

TKT: transcetolase

TPI: triose fosfato isomerase

UAP: UDP-N-acetilglicosamina pirofosforilase

UGP1: UTP -glicose-1-fosfato uridiltransferase

RESUMO

O fungo dimórfico *Paracoccidioides* é o agente etiológico da paracoccidioidomicose, uma micose sistêmica com grande relevância na saúde pública no Brasil e em outros países da América Latina, como Colômbia e Venezuela. Microrganismos, em geral, requerem respostas às condições de estresse para sobreviver às mudanças ambientais e patógenos, em particular, necessitam de uma resposta efetiva ainda maior para reagir às defesas do hospedeiro. O estresse osmótico é usado como um modelo para estudos de transdução de sinais e parece causar muitas adaptações celulares, as quais incluem alterações nas vias de transdução de sinais, expressão de proteínas e regulação do volume e tamanho celulares. Neste trabalho foi avaliado o perfil proteômico das células leveduriformes de *Paracoccidioides* sp. (*Pb01*) obtidas sob condições de estresse osmótico. Os dados evidenciam uma resposta osmoadaptativa deste fungo, quando submetido a este tipo de estresse. Proteínas envolvidas na biossíntese de componentes de parede celular foram moduladas, evidenciando um remodelamento de parede. Também foram observadas prováveis alterações no metabolismo de energia, tendo em vista que proteínas da via das pentoses fosfato mostraram-se abundantes, enquanto proteínas da via glicolítica mostraram-se em menor abundância frente às condições de estresse osmótico. Adicionalmente alterações no metabolismo de aminoácidos também foram observadas; de forma mais evidente a degradação de aminoácidos como leucina, valina e isoleucina foi induzida durante o estresse osmótico. Neste sentido, nosso estudo sugere que *Paracoccidioides* sp. (*Pb01*) possui um amplo repertório osmoadaptativo, composto por diferentes proteínas que atuam de maneira complementar e que devem atuar promovendo a minimização dos efeitos causados pelo estresse osmótico.

ABSTRACT

The dimorphic fungus *Paracoccidioides* is the etiological agent of paracoccidioidomycosis, a systemic mycosis with high relevance for the public health in Brazil and other Latin American countries such as Colombia and Venezuela. Generally, microorganisms require responses to stress conditions to survive in response to environmental changes and pathogenic organisms, particularly, require an effective response even higher to react against host defences. Osmotic stress has been used as a model to study signal transduction and seems to cause many cellular adaptations, which include signal transduction pathways modification, protein expression alteration and cellular volume and size regulation. In this work we have evaluated the proteomic profile of yeast cells of *Paracoccidioides* sp. (*Pb01*) obtained in osmotic stress condition. Data describe an osmoadaptative response of this fungus when subjected to this treatment. Proteins involved in the synthesis of the cell wall components were modulated, evidencing a remodelling of the cell wall. In addition, it was also observed alterations on the energy metabolism, given that proteins of the pentose phosphate pathway were abundant while proteins of the glycolysis were less abundant under osmotic stress condition. In addition changes in amino acid metabolism were also observed; more clearly the degradation of amino acids such as leucine, isoleucine and valine was induced during osmotic stress. Hereupon, our study suggests that *Paracoccidioides* sp. (*Pb01*) present a vast osmoadaptative repertoire; comprising different proteins which act complementarily and that this response could be able to minimize the effects caused by osmotic stress.

1 INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA

1.1 – *Paracoccidioides* e Paracoccidioidomicose.

O fungo *Paracoccidioides* é o agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), uma micose sistêmica prevalente na América Latina, ocorrendo principalmente no Brasil (San- Blas *et al.*, 2002). Este fungo foi originalmente descrito por Adolfo Lutz em 1908, no Instituto Biológico de São Paulo (Brasil), que o isolou em lesões orais e de linfonodo cervical de pacientes. Observando exames histológicos, Adolfo Lutz identificou que a ausência de esférulas com esporos diferenciava o fungo causador da PCM de outros espécimes característicos de coccidioidomicose, descritos previamente por Posadas na Argentina em 1892 (Posadas, 1892).

Paracoccidioides brasiliensis foi considerado a única espécie de seu gênero até se propor a existência de pelo menos quatro diferentes clados: S1 (espécie 1, com 38 isolados), PS2 (espécie filogenética 2, com 6 isolados), PS3 (espécie filogenética 3, com 21 isolados) (Matute *et al.*, 2006) e PS4 (espécie filogenética 4, com 5 isolados identificados até o momento) (Salgado-Salazar *et al.*, 2010). PS4 foi descrita recentemente e contém isolados clínicos provenientes da Venezuela, porém ainda é pouco caracterizada (Salgado-Salazar *et al.*, 2010). PS3 é um grupo geograficamente restrito a Colômbia; PS2 é encontrado predominantemente no Brasil, nos Estados de São Paulo e Minas Gerais e também na Venezuela; S1 está distribuída no Brasil, Argentina, Paraguai, Peru e Venezuela (Matute *et al.*, 2006). Análises das relações filogenéticas entre 21 isolados de *Paracoccidioides* possibilitaram a identificação como pertencentes aos três grupos filogenéticos já descritos, com exceção do isolado *Pb01* que se apresentou divergente dos outros grupos, sugerindo-se a possibilidade de uma nova espécie no gênero *Paracoccidioides* (Carrero *et al.*, 2008). Em 2009, Teixeira e colaboradores avaliaram a concordância genealógica entre 122 isolados de *Paracoccidioides*. Estes autores observaram que a divergência não se aplicava somente ao isolado *Pb01*, mas também a outros 16 isolados que foram agrupados em um quarto grupo filogenético, o qual foi denominado “*Pb01-like*”. Estes autores também sugeriram uma nova

espeiação filogenética para este grupo e propuseram a nomenclatura de *Paracoccidioides lutzii*, em homenagem a Adolfo Lutz (Teixeira *et al.*, 2009).

Pigozzo e colaboradores (2013), realizaram um estudo proteômico comparativo, o qual, apontou perfis metabólicos específicos entre membros do gênero *Paracoccidioides*. *Pb339*, representante do grupo S1 apresentou a β -oxidação bastante induzida, indicando um metabolismo cuja oxidação de ácidos graxos parece ser importante para fornecer acetil-CoA para o metabolismo central de carbono deste grupo filogenético. Por outro lado, a via das pentoses-fosfato e a degradação de aminoácidos foram mais evidentes em *Pb2*, representante de PS2. *PbEpm83*, representante de PS3, parece utilizar preferencialmente carboidratos para as rotas aeróbicas de produção de energia. Já o *Pb01*, representando *P. lutzii*, demonstrou alta produção de enzimas envolvidas com a glicólise e a fermentação alcoólica, bem como um alto nível de etanol em suas células, indicando que esta linhagem parece utilizar um metabolismo mais anaeróbico para a produção de energia a partir de carboidratos (Pigozzo *et al.*, 2013).

Na natureza, *Paracoccidioides* é encontrado na forma de micélio e algumas características relacionadas ao ecossistema favorecem a sua adaptação ao habitat; porém seu nicho ecológico ainda não está completamente esclarecido (Marques *et al.*, 1983; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006). As regiões consideradas endêmicas deste fungo apresentam características ambientais em comum (Mangiaterra *et al.*, 1999). Foi observado que o índice de exposição ao fungo é maior em locais que possuem altitude elevada, chuvas abundantes, vegetação rica e economia baseada principalmente na agricultura e pecuária (Blotta *et al.*, 1999). Adicionalmente foi relatado que condições diferentes de solos alteram a capacidade de crescimento e a produção de conídios por *Paracoccidioides*, influenciando a sua capacidade de sobrevivência (Theodoro *et al.*, 2005).

Em relação à morfologia, o fungo *Paracoccidioides* apresenta-se em duas formas devido ao seu caráter dimórfico. Este fungo cresce como levedura nos tecidos infectados ou quando cultivado *in vitro* a 36 °C. Por outro lado em temperaturas inferiores a 28 °C e em condições saprobióticas no meio ambiente, ele cresce em sua forma miceliana, considerada a forma infectiva (Bagagli *et*

al., 2006). As leveduras de *Paracoccidioides* são caracterizadas por apresentarem brotamentos múltiplos, formados pela evaginação da célula-mãe, onde uma célula central é circundada por várias células periféricas, conferindo ao fungo um aspecto de roda de leme de navio. A forma miceliana pode ser identificada por filamentos septados com conídios terminais ou intercalares (Queiroz-Telles, 1994; Restrepo-Moreno, 2003).

O contágio da PCM se dá usualmente por inalação de propágulos do micélio, como conídios, através da via respiratória (Bagagli *et al.*, 2006). O primeiro contato do patógeno com o hospedeiro ocorre nos alvéolos pulmonares; a partir dos pulmões, o fungo pode disseminar-se por vias hematogênica ou linfática parasitando diversos órgãos como fígado e baço (Camargo & Franco, 2000). O estabelecimento do fungo no tecido pulmonar induz uma resposta inflamatória que leva a formação do granuloma, que é definido como uma coleção compacta de células do sistema fagocitário mononuclear, podendo sofrer transformação para células epitelióides e gigantes. O macrófago é a principal célula integrante do granuloma, apresentando atividades microbicida e de apresentador de antígeno, além de, juntamente com linfócitos T, produzir as citocinas. O granuloma é a lesão fundamental na PCM e como em outras doenças infecciosas (tuberculose, hanseníase, histoplasmose) é o resultado de uma reação de hipersensibilidade tardia contra antígenos do agente infeccioso (De Brito & Franco, 1994). O desenvolvimento do granuloma permite a contenção do patógeno, impedindo sua disseminação pelo organismo (Romani, 1997)

Um dos aspectos da inter-relação entre o parasito e o hospedeiro é o efeito de hormônios no dimorfismo do fungo. A alta incidência de PCM em adultos masculinos sugere que fatores hormonais possam desempenhar algum papel na patogênese da doença (Sano *et al.*, 1999). O hormônio feminino 17- β -estradiol tem sido relacionado à diferenciação de *Paracoccidioides*, fato que confere proteção às mulheres contra a PCM. Estudos prévios mostraram que este hormônio inibe a transição de micélio para levedura de maneira dose-dependente, *in vitro* (Restrepo, 1985) e *in vivo* (Sano *et al.*, 1999). Adicionalmente, foi descoberto que a inibição da transição não é devida somente à presença do hormônio, mas sim, à sua interação com a proteína fúngica denominada EBP (*Estradiol Binding Protein*). Acredita-se que o

hormônio feminino 17- β -estradiol e a EBP do citoplasma fúngico se ligam e, como resultado desta interação, ocorra o bloqueio da transição da fase infectiva para a fase patogênica de *Paracoccidioides* (Shankar *et al.*, 2011). Além disso, a proteção de PCM também é relacionada ao tipo de resposta imunológica desencadeada por cada gênero sexual. Ao comparar a resposta imunológica de camundongos machos e fêmeas, infectados com células de *Paracoccidioides* foi possível verificar-se uma notável influência sobre o estabelecimento da PCM experimental sendo este fato atribuído, pelo menos em parte, aos hormônios sexuais que interferem na resposta imune desencadeada por estes animais. Foi observado que camundongos machos castrados, tratados com estradiol, produziram níveis mais elevados de IFN- γ e níveis mais baixos de IL-10 em comparação aos camundongos machos normais. Em contraste camundongos fêmeas castradas, tratadas com testosterona produziam mais IL-10 e menos IFN- γ do que camundongos fêmeas normais (Pinzan *et al.*, 2010). Desta maneira, os resultados observados confirmam que as mulheres são mais resistentes à PCM porque elas possuem o hormônio 17- β -estradiol e porque elas possivelmente apresentam uma resposta imunológica mais eficaz contra *Paracoccidioides*, motivo pelo qual o acometimento da PCM é predominante em indivíduos do sexo masculino.

O homem era considerado o único hospedeiro susceptível ao fungo; entretanto, alguns animais já foram encontrados infectados pelo *Paracoccidioides*, principalmente o tatu (Naiff *et al.*, 1986). Apesar de não ser regularmente isolado de outros animais, há evidências de infecções em animais domésticos como cães (Ricci *et al.*, 2004), galinhas (Oliveira *et al.*, 2011), gado leiteiro (Silveira *et al.*, 2008), cavalos (Corte *et al.*, 2009) e animais silvestres como pinguins (Garcia *et al.*, 1993) e macacos (Corte *et al.*, 2007).

A PCM é comumente manifestada como uma pneumopatia de curso crônico, frequentemente associada com lesões nas mucosas e pele, e eventualmente com lesões disseminadas extra-pulmonares (Martinez, 2010). Quase sempre, a doença é assintomática (Bonifaz *et al.*, 2011). A forma crônica é a mais prevalente, representando 90% dos pacientes com esta micose. Neste caso, acomete principalmente adultos homens entre os 30 e 60 anos de idade e sua progressão é lenta, principalmente com manifestações pulmonares, mas podendo ocorrer disseminação para mucosas e pele (Shikanai-Yasuda *et*

al., 2006). Já em crianças e adultos com menos de 30 anos a doença é menos incidente e apresenta-se na forma aguda ou subaguda, caracterizando-se por linfadenomegalia, manifestações digestivas, hepatoesplenomegalia, envolvimento ósseo-articular e lesões cutâneas (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006), representando apenas 5% dos casos. Caso a doença não diagnosticada e tratada adequadamente, as lesões podem tornar-se mais graves e letais, com rápido e progressivo envolvimento de pulmões, tegumento, gânglios, baço e fígado (Bonifaz *et al.*, 2011; Shikanai- Yasuda *et al.*, 2006).

A PCM é considerada a infecção sistêmica mais prevalente no Brasil e foi recentemente incluída na lista de doenças negligenciadas cujo impacto na saúde pública ainda não foi quantificado devido à falta de dados estatísticos (Martinez, 2010). Dados epidemiológicos baseados em resultados de testes intradérmicos de sensibilidade a paracoccidioidina no Brasil, Venezuela, Colômbia e Argentina, apontam que mais de 50% dos habitantes de zonas endêmicas tenham sido expostos ao agente desta micose (Martinez, 2010; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006), e no Brasil, estima-se que aproximadamente 10% da população esteja infectada (Martinez, 2010). Se essa estimativa é real, a prevalência da PCM seria similar à da Doença de Chagas na América Latina e superior à de outras doenças negligenciadas como esquistossomose e leishmaniose. No Brasil, o dado mais recente de mortalidade foi determinado no período de 1996 a 2006, sendo 1 a cada 1 milhão de habitantes. Dentre as mais relevantes micoses sistêmicas, a PCM foi responsável pela maior parte das mortes, com uma média anual de 168 mortes durante 1996 a 2006 (Martinez, 2010). Os estados das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste são, no Brasil, os locais onde a doença é mais frequentemente encontrada (Paniago *et al.*, 2003).

1.2 – ANÁLISES PROTEÔMICAS DE FUNGOS PATOGÊNICOS HUMANOS

O termo proteoma foi introduzido pela primeira vez em 1996 para se referir à totalidade de proteínas em uma célula, e assim veio o nome proteômica, designando o estudo do proteoma (Neidhardt, 2011). Portanto, proteômica é considerada uma tecnologia fundamental para estudar o proteoma celular de qualquer organismo, incluindo eucariontes e procariontes (Yahn *et al.*, 2012).

Proteômica pode ser definida como o estudo geral das proteínas e enzimas ou ainda, o estudo integrado da soma de todas as proteínas produzidas pelos organismos ou grupo de organismos (Jamesdaniel *et al.*, 2009).

Embora existam diversos genomas de fungos sequenciados, poucos estudos têm sido feitos comparando o perfil proteômico com análises transcricionais. No momento, o grande objetivo na biologia dos fungos é entender a expressão, função e regulação das proteínas codificadas pelo genoma (Bhadauria *et al.*, 2007). Os primeiros trabalhos pós-genômicos envolvendo estudos protéicos, foram, por exemplo, estudos de proteína do envelope em *Trichoderma reesei* (Lim *et al.*, 2001) e de proteínas ancoradas através de ancoras de GPI (glicosilfosfatidilinositol) em *Aspergillus fumigatus* (Bruneau *et al.*, 2001). Desde então, diversos trabalhos em proteomas têm sido publicados. Melin e colaboradores (2002) realizaram o primeiro trabalho de análise proteômica com o fungo patogênico *Aspergillus nidulans*, no qual analisaram os níveis de proteínas deste fungo na presença do antibiótico produzido por *Streptomyces*, concanamicina A. Adicionalmente em estudos com *A. fumigatus*, Strom e colaboradores (2005) detectaram alterações específicas na expressão de proteínas envolvidas com mudanças morfológicas causadas quando o fungo foi cultivado com uma bactéria produtora de ácido láctico. Num trabalho posterior realizado também em *A. fumigatus*, Kniemeyer e colaboradores (2006) identificaram que 52 proteínas da gliconeogênese, ciclo do glioxalato e enzimas de degradação do etanol estavam hiper-reguladas durante a repressão catabólica por carbono. Adicionalmente mais 28 proteínas foram acrescentadas ao mapa proteômico de *A. fumigatus* mostrando pela primeira vez que o fator de alongação 1B (f1B) exibe atividade de glutatona transferase (Carberry *et al.* 2006). Essas descrições ilustram que a análise proteômica abre novas perspectivas para se entender a fisiologia dos fungos, como observado com o fungo *A. nidulans* durante a osmo Adaptação. Nesse trabalho, os autores mostraram que enzimas direcionadas ao ciclo do ácido tricarbóxico estão reduzidas. Além disso, observaram um aumento no acúmulo de proteínas de choque térmico (Kim *et al.*, 2007).

Análises proteômicas da adaptação do fungo *A. fumigatus* a altas temperaturas revelaram novos alvos da regulação pelo fator transcricional de

choque térmico-1 (HSF-1), como síntese de manitol, tradução, organização do citoesqueleto e divisão celular (Albrecht *et al.*, 2010). Para elucidar as proteínas do fungo *A. fumigatus* que são mais expressas durante a aspergilose invasiva Asif e colaboradores (2010) utilizaram extratos de proteínas do fungo e inocularam animais em duas doses com extratos de proteínas de conídios do fungo *Aspergillus fumigatus*. O soro foi então utilizado como anticorpo primário para identificar antígenos de *A. fumigatus*, após fracionamento de proteínas por eletroforese bidimensional. As análises levaram à identificação de proteínas relacionadas à via glicolítica, ao estresse oxidativo bem como proteínas associadas à parede celular, representando valiosos marcadores da infecção bem como possíveis componentes da vacina contra a aspergilose.

A formação do biofilme é um dos maiores fatores de virulência de *Candida glabrata*, contribuindo para sua resistência a antifúngicos (Tumbarello *et al.*, 2007). Análises proteômicas do fungo *C. glabrata* crescido sob a forma de biofilme e sob a forma planctônica foram realizados para explorar os mecanismos que contribuem para a virulência desse organismo (Seneviratne *et al.*, 2010). As análises mostraram um aumento de proteínas relacionadas ao estresse e uma diminuição das enzimas da via glicolítica. Alterações na expressão das proteínas citoplasmáticas de *C. albicans* durante a transição dimórfica de levedura para hifa têm sido estudadas. Utilizando-se a técnica 2D-DIGE Monteoliva e colaboradores (2010) detectaram proteínas citoplasmáticas de diferentes vias metabólicas envolvidas no estabelecimento e na manutenção de cada morfologia celular.

Rezende e colaboradores, 2011 realizaram a primeira comparação proteômica entre as fases de desenvolvimento do fungo *Paracoccidioides*. Nesse trabalho, utilizaram a técnica de eletroforese bidimensional (2-DE) acoplada à identificação por espectrometria de massa MALDI-QTOF MS e MS/MS como ferramentas e analisaram os proteomas da forma miceliana, leveduriforme e da transição micélio-levedura, possibilitando a identificação de 100 proteínas/isoformas sendo que 81 apresentaram-se diferencialmente expressas nas três fases do fungo, enquanto que 19 proteínas/isoformas foram constitutivamente expressas. A expressão de superóxido dismutase e peroxiredoxina mitocondrial foram mais abundantes na fase miceliana. Nos estágios iniciais da transição (22 h) algumas enzimas envolvidas na glicólise,

como enolase e fosfoglicomutase, foram aumentadas. Proteínas de choque térmico e ATP sintase também foram significativamente aumentadas durante o evento de transição. Proteínas preferencialmente expressas na fase leveduriforme foram identificadas e relacionadas com a via glicolítica, ciclo do glioxalato e ao metabolismo de lipídeos. Os dados obtidos por estes autores demonstraram que o fungo promove um remodelamento do seu metabolismo durante a transição morfológica (Rezende *et al.*, 2011).

A utilização de ferro é essencial para o estabelecimento da infecção em microrganismos e, sugere-se que, o sequestro desse metal seja uma estratégia usada pelo hospedeiro para combater a infecção. Por meio de análise proteômica em condições de depleção de ferro no fungo *Histoplasma capsulatum*, Winters e colaboradores (2008) detectaram 35 proteínas que tiveram seus níveis diminuídos, dentre elas enolase, malato desidrogenase, sacaropina desidrogenase, HSP70, asparaginil-tRNA sintetase e uma proteína não caracterizada. Esses resultados sugerem uma necessidade do *H. capsulatum* por induzir funções metabólicas específicas para competir com alterações no ambiente do hospedeiro. A proteômica das proteínas citoplasmáticas de *Paracoccidioides* sob restrição do íon ferro foi avaliada por Parente e colaboradores (2011). Neste trabalho os autores observaram que enzimas da via glicolítica foram induzidas enquanto que várias enzimas do ciclo do ácido tricarboxílico, ciclo do metilcitrato e glioxalato e proteínas da cadeia transportadora de elétrons mostraram-se reprimidas. Em adição, os resultados mostraram também que proteínas de resposta ao choque térmico (HSPs) foram induzidas. Os dados sugerem que o fungo responda à restrição de ferro por meio do remodelamento do metabolismo onde as vias metabólicas não dependentes de ferro sejam priorizadas pelo fungo durante a limitação do micronutriente (Parente *et al.*, 2011).

Proteínas extracelulares representam os principais mediadores da interação parasito- hospedeiro. Weber e colaboradores (2012) analisaram o perfil de expressão das proteínas secretadas por *Paracoccidioides*, nas fases de micélio e levedura do isolado *Pb01*. Os autores identificaram 42 e 50 proteínas/isoformas preferencialmente secretadas por levedura e micélio, respectivamente. Análises *in silico* mostraram que 65% das proteínas extracelulares foram preditas serem secretadas por vias não convencionais

indicando ser esta a principal via de exportação de proteínas neste fungo. Adicionalmente, foi investigada a influência da inibição da secreção protéica em leveduras durante a fagocitose por macrófagos. A adição de Brefeldina A ao meio de cultura diminuiu significativamente a quantidade de proteínas secretadas e de leveduras internalizadas por macrófagos, indicando que a secreção de proteínas por *Paracoccidioides* pode facilitar aos estágios iniciais da invasão/colonização do fungo no hospedeiro (Weber *et al.*, 2012).

Macrófagos alveolares são a primeira linha de defesa contra *Paracoccidioides* e para conter a infecção essas células produzem várias substâncias nocivas como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) que desencadeia o estresse oxidativo. Grossklaus e colaboradores (2013) induziram o estresse oxidativo *in vitro* por meio da exposição de células leveduriformes de *Paracoccidioides* ao H₂O₂ e observaram o efeito deste composto sobre o proteoma deste fungo. O perfil proteômico do fungo foi avaliado nos tempos de 2h e 6h e foi observado a indução de várias enzimas antioxidantes, como catalase, superóxido dismutase, peroxidases e tioredoxinas, bem como outras oxidoreduções que estão provavelmente envolvidas na resposta contra o estresse oxidativo, sugerindo que *Paracoccidioides* possui um amplo repertório antioxidante, composto por diferentes proteínas que atuam de maneira complementar, que foram capazes de detoxificar as EROs (Espécies Reativas de Oxigênio) e de minimizar os efeitos causados pelo estresse oxidativo (Grossklaus *et al.*, 2013).

Neste sentido, a proteômica tem contribuído para um melhor conhecimento dos processos envolvidos na morfogênese, virulência, resposta ao hospedeiro em fungos patogênicos humanos, bem como para o desenvolvimento de alvos antifúngicos potenciais e abordagens terapêuticas (Pitarch *et al.*, 2003). Técnicas proteômicas podem identificar e caracterizar marcadores biológicos de um determinado patógeno, ajudando no diagnóstico precoce de doenças e no acompanhamento do tratamento (Cash *et al.*, 2002).

1.3 – RESPOSTAS ADAPTATIVAS AO ESTRESSE OSMÓTICO

Microrganismos devem ter condições internas balanceadas e específicas para um ótimo crescimento e função. O ambiente interno é mantido para

promover o funcionamento adequado da célula, porém flutuações no ambiente externo podem resultar em uma variedade de perturbações celulares que podem romper o ambiente interno. Essas perturbações podem inibir atividades enzimáticas, romper fluxos metabólicos, desestabilizar estruturas celulares, perturbar gradientes químicos, levando a instabilidade global. Assim, as células devem ser capazes de proteger e manter características críticas da homeostase interna frente a condições externas variáveis. *Saccharomyces cerevisiae*, por exemplo, tem se mostrado excepcionalmente eficiente em sobreviver a mudanças severas e inesperadas em seu ambiente externo. Assim, quando as condições ambientais mudam abruptamente, a célula deve ajustar rapidamente seu ambiente interno para aquele requerido para crescimento nas novas condições (Gasch, 2002). A capacidade de sobreviver a mudanças na homeostase da água deve ser uma propriedade intrínseca da célula. Mecanismos de sobrevivência precisam operar dentro dos primeiros segundos após uma mudança osmótica repentina porque a entrada ou perda passiva de água ocorre de forma muito rápida. A água celular segue sua concentração de gradiente por difusão passiva; assim quando as células perdem água e a concentração de biomoléculas e íons aumentam, o que eventualmente resulta em um impedimento da atividade celular, a célula sofre estresse osmótico (Hohmann, 2002).

Em geral, microrganismos requerem respostas às condições de estresse para sobreviver às mudanças ambientais, e microrganismos patogênicos, em particular, necessitam de uma resposta efetiva ainda maior para reagir às defesas do hospedeiro (Mager & Siderius, 2002). Tem sido sugerida a presença de um centro de resposta ao estresse (CER) em fungos, no qual grupos de genes são induzidos de maneira simultânea por diferentes tipos de injúrias celulares, incluindo choque térmico, estresse osmótico e estresse oxidativo. Esta observação sugere que um sistema conservado de sinalização e regulação transcricional permite as células adaptarem-se as diferentes condições de estresse (Chauhan *et al.*, 2006). Assim, tem sido observada uma alta expressão de moléculas antioxidantes em células sob condições de alta osmolaridade ou choque térmico; acredita-se que esta característica possa ser explicada pela existência de uma correção fundamental entre estas condições de estresse.

Neste sentido, sugere-se que esta característica poderia ser também combinada ao fato de que, sob condições de choque térmico e estresse osmótico, ocorra produção de ROS (espécies reativas de oxigênio) pela alteração do potencial redox intracelular (Krantz *et al.*, 2004). A exposição das células a condições de estresse desencadeia uma resposta celular adaptativa que envolve um grande número de moléculas, incluindo receptores e proteínas mensageiras, as quais otimizam a probabilidade de sobrevivência e proliferação (Duran *et al.*, 2010).

Estes sinais e condições extracelulares são frequentemente traduzidos pelos sistemas biológicos utilizando cascatas de fosforilação de proteínas que afetam a atividade de enzimas, a localização de proteínas e expressão de genes. A cascata de sinalização é desencadeada quando um receptor é ativado por um estímulo externo. Frequentemente, os sinais são transmitidos através da fosforilação dependente de quinase. A informação sobre o ambiente é então transmitida através da via, resultando em uma resposta da célula. A cascata de proteínas quinase ativadas por mitógenos mostra uma função crítica na adaptação ao estresse osmótico em todos os eucariotos (Gustin *et al.*, 1998; Yuzyuk *et al.*, 2002).

A via Hog de resposta à alta osmolaridade é uma das vias de proteínas quinase ativadas por mitógenos (MAPK) mais bem estudadas e serve como um protótipo para os sistemas de sinalização em eucariotos. Essa via é necessária e suficiente para a adaptação à osmolaridade externa. O componente-chave desta via é a proteína quinase ativada por estresse (SAPK) Hog1, a qual é rapidamente fosforilada pela quinase SAPK Pbs2 em condições de estresse osmótico. A proteína HOG é a quinase terminal de duas vias de sinalização paralelas, chamadas ramo Sho1 e ramo Sln1. Qualquer um desses ramos é necessário para a adaptação ao estresse osmótico e eles convergem no Pbs2 (Hohmann, 2002; Schaber *et al.*, 2012).

Visando descobrir genes possivelmente envolvidos na adaptação e sobrevivência de *Paracoccidioides* no hospedeiro durante a infecção, Bailão e colaboradores (2006) utilizaram a Análise de Diferença Representacional de cDNA (cDNA-RDA) para identificar genes de *Paracoccidioides* induzidos em células leveduríferas derivadas de fígado de camundongos infectados e em

condições que mimetizavam a via hematogênica de disseminação fúngica, assim como em sítios de infecção com inflamação (Bailão *et al.* 2007). Neste trabalho os autores observaram que o transcrito de *sho1* de *Paracoccidioides* apresentou-se induzido tanto no tratamento com sangue humano quanto durante a infecção sanguínea de camundongos, e no tratamento com plasma humano, o que sugere sua importância no processo de detecção de mudanças da osmolaridade pelo fungo durante essas condições, possivelmente controlando o remodelamento da parede celular (Bailão *et al.* 2006, 2007).

Células sujeitas a choque osmótico podem sofrer perda de água e alterações no turgor intracelular (Hohmann, 2002). As células de quase todos os organismos respondem ao aumento da osmolaridade externa pela produção e acumulação de metabólitos de baixo peso molecular os quais ajudam a restaurar o balanço osmótico (Burg & Ferraris, 2008). É geralmente aceito que o principal mecanismo de adaptação rápida ao estresse osmótico é através da acumulação do osmólito glicerol (Hohmann, 2002; Klipp *et al.*, 2005; Muzzey *et al.*, 2009), o qual balanceia a diferença de potencial de água interna e externa e assim reestabelece o volume pré-estresse (Schaber *et al.*, 2010; 2012). Estudos mostraram que em *S. cerevisiae* o choque hiperosmótico resulta na produção de glicerol com concomitante mudança na osmolaridade intracelular, contribuindo assim para a capacidade das células para resistir e se recuperar a essa condição de estresse (Blomberg & Adler, 1989). O choque hiperosmótico, especificamente, induz uma via a qual ativa a transcrição de Gpd1p que codifica para glicerol-3-fosfato desidrogenase, uma enzima necessária para a síntese de glicerol (Brewster *et al.*, 1993). Em *Neorospira crassa*, o sensor histidina quinase OS-1 junto com uma resposta associada ao regulador RRG-1 regulam a produção e acumulação de glicerol (Miller *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2007; Noguchi *et al.*, 2007) e a acumulação de íons (Lew *et al.*, 2006) durante a restauração do turgor após choque hiperosmótico (Lew & Nasserifar, 2009). A sensibilidade de várias espécies fúngicas a estresse osmótico foi avaliada por Nikolaou e colaboradores (2009). Neste estudo, o crescimento das espécies *Schizosaccharomyces pombe* e *Ashbya gossypii* foi completamente inibido em condições de estresse osmótico, enquanto que *C. albicans* e *Debaryomyces hansenii* mostraram maior resistência nestas condições, apresentado crescimento inibido apenas sob altas concentrações de sal. Os fungos

filamentosos *Fusarium graminearum* e *A. nidulans* também mostraram alta resistência a estresse osmótico, enquanto que *A. fumigatus* e *Ustilago maydis* foram mais sensíveis a condições de estresse osmótico.

A concentração intracelular de íons influencia a resposta ao estresse ambiental, assim como os sinais fisiológicos. Gao e colaboradores (2011) mostraram que a via de sinalização do cálcio participa da resposta ao estresse osmótico e que juntamente com o complexo quinase MobB/CotA coordena a regulação do crescimento em *A. nidulans*. Estudos em *S. cerevesiae* identificaram pelo menos dois sistemas carreadores diferentes – um sistema de influxo de cálcio de alta afinidade (HACS) e um sistema de influxo de cálcio de baixa afinidade (LACS) (Cunningham, 2011; Martin *et al.*, 2011). As duas subunidades de HACS foram caracterizadas em uma variedade de fungos, tais como os saprofíticos *S. pombe*, *N. crassa*; fungos patogênicos humanos como *C. albicans*, *Cryptococcus neoformans*, e fungos fitopatogênicos como *Gibberella zeae*, *Claviceps purpúrea* e *Uromyces appendiculatus* (Wang *et al.*, 2012). Em todos esses fungos, mutantes para as subunidades de HACS Cch1 e Mid1 causaram diminuição significativa na captação de cálcio (Wolfe & Pearce, 2006). Alguns trabalhos têm indicado que a rede de transporte de cálcio pode ser induzida por estresse osmótico (Gao *et al.*, 2011; Cunningham, 2011). Mecanismos de sinalização mediados por cálcio são bastante distribuídos em eucariotos e estão envolvidos na regulação de diversos processos biológicos incluindo expressão de genes, excitose, rearranjo do citoesqueleto e morfologia celular (Ambudkar, 2011; Patergnani *et al.*, 2011). Além disso, tem-se verificado que HACS apresentam funções importantes no influxo de cálcio a baixas concentrações e em respostas a estresse, incluindo estresse osmótico e outras perturbações na membrana plasmática em fungos (Cunningham, 2011; Hong *et al.*, 2010). Outros estudos mostraram que células leveduriformes controlam especificamente a proporção de íons Na^+ e K^+ , exportando ativamente o primeiro e acumulando o último. O transporte dos íons sódio e potássio é mediado por um transporte ativo dirigido por ATP ou via um anti-transporte H^+ , este último fazendo uso dos gradientes de prótons através das membranas vacuolar e citoplasmática, as quais são geralmente ATPases. Enquanto esses mecanismos são especificamente importantes para a

homeostase de íons em condições de estresse causado por sal, vários dos transportadores também estão implicados na adaptação ao estresse osmótico e/ou são regulados por sinais osmóticos (Hohmann, 2002).

O estresse osmótico é usado como um modelo para estudar a transdução de sinais e parece causar muitas adaptações celulares, as quais incluem mudanças na expressão de proteínas e regulação do volume e tamanho celular (Klipp *et al.*, 2005). Vários estudos têm sido focados na osmo Adaptação em fungos, no entanto, estes estudos normalmente provem de uma percepção gene-específica ao invés de uma perspectiva global ou sistemática de osmo Adaptação. Este fato ocorre no estudo de muitos fungos filamentosos, e estudos realizados por Nevalainen e colaboradores (2005) sugerem a necessidade de substituir os estudos gene-por-gene por um mais unificado, que possa abranger “o organismo como um todo”, para ajudar na identificação de novas proteínas envolvidas na adaptação fisiológica. Uma das ferramentas capazes de abordar “o organismo como um todo” é a análise proteômica, uma abordagem poderosa para a análise global do padrão de expressão de proteínas. Desta forma, é possível entender melhor as mudanças que ocorrem durante a adaptação de fungos a várias condições ambientais (Melin, 2004; Nevalainen *et al.*, 2005).

2 JUSTIFICATIVA

Microrganismos estão sujeitos a alterações no ambiente externo que podem resultar em uma variedade de perturbações celulares que podem prejudicar o ambiente interno. O estresse osmótico é caracterizado pela perda excessiva de água que resulta em alterações na concentração de íons e biomoléculas provocando o impedimento da atividade celular. Neste sentido, a capacidade de sobreviver a mudanças na homeostase da água deve ser uma propriedade intrínseca da célula e de extrema importância para o bom funcionamento da mesma.

Organismos patogênicos percebem e respondem a condições hostis impostas pelo hospedeiro ativando componentes de vias de sinalização que resultam na expressão de genes e proteínas responsáveis pela virulência e diferenciação do patógeno. Sendo assim, uma compreensão abrangente dos mecanismos adaptativos desenvolvidos por patógenos para poder sobreviver e proliferar mediante as condições impostas pelo ambiente, é uma estratégia importante para bloquear a ação de microrganismos patogênicos.

Muitos estudos já foram e estão sendo desenvolvidos em nosso laboratório no intuito de compreender as alterações metabólicas desenvolvidas pelo fungo *Paracoccidioides* que permitem que este patógeno sobreviva às condições impostas pelo hospedeiro. Apesar dos estudos de expressão gênica de *Paracoccidioides*, pouco se conhece a respeito das moléculas do fungo envolvidas na resposta ao estresse osmótico, uma condição possivelmente encontrada pelo fungo durante o processo infeccioso. Desta forma, análises proteômicas deste patógeno sob condições de estresse osmótico, destacam-se como estratégias interessantes para o entendimento de sua biologia, uma vez que o estresse osmótico parece iniciar uma série de respostas celulares que exigem a adaptação do fungo a mudanças no ambiente.

3 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi realizar estudos proteômicos do fungo *Paracoccidioides* sp. (Pb01) em condições de estresse osmótico, visando detectar e avaliar diferenças qualitativas e quantitativas nas proteínas citoplasmáticas nessa condição.

As estratégias utilizadas são:

- Obtenção dos extratos proteicos na condição de estresse osmótico bem como na condição controle do fungo *Paracoccidioides*.
- Digestão dos extratos proteicos com tripsina e aquisição dos espectros de massas por nano LC-MS/MS
- Descrever vias metabólicas que predominam durante o estado de estresse osmótico;
- Realizar experimentos de validação para proteínas identificadas.

4 ARTIGO

Accepted Manuscript

Osmotic Stress Adaptation of *Paracoccidioides lutzii*, Pb01, monitored by proteomics

Leandro Nascimento da Silva Rodrigues, Wesley de Almeida Brito, Ana Flávia Alves Parente, Simone Schneider Weber, Alexandre Melo Bailão, Luciana Casaletti, Clayton Luiz Borges, Célia Maria de Almeida Soares

PII: S1087-1845(16)30091-3

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2016.08.001>

Reference: YFGBI 2990

To appear in: Fungal Genetics and Biology

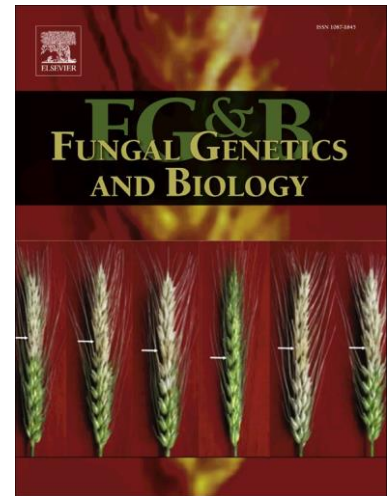
Received Date: 8 April 2016

Revised Date: 25 July 2016

Accepted Date: 1 August 2016

Please cite this article as: Rodrigues, L.N.d., Brito, W.d.A., Parente, A.F.A., Weber, S.S., Bailão, A.M., Casaletti, L., Borges, C.L., Soares, C.M.d., Osmotic Stress Adaptation of *Paracoccidioides lutzii*, Pb01, monitored by proteomics, Fungal Genetics and Biology (2016), doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2016.08.001>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.



Osmotic Stress Adaptation of *Paracoccidioides lutzii*, Pb01, monitored by proteomics

Running Head: *Paracoccidioides* sp. adaptations during osmotic stress

Leandro Nascimento da Silva Rodrigues^a, Wesley de Almeida Brito^{a, b, c}, Ana Flávia Alves Parente^d, Simone Schneider Weber^e, Alexandre Melo Bailão^a, Luciana Casaletti^{a, f}, Clayton Luiz Borges^a & Célia Maria de Almeida Soares^{a, 1}

^a Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, ICB-II s/n, Sala 206, Campus II, 74690-900, Goiânia, Goiás, Brazil. e-mail: cmasoares@gmail.com

^b Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Estadual de Goiás, BR153, 3105, Fazenda Barreiro do Meio, 75132-903, Anápolis, Goiás, Brazil. e-mail: wesleyfarmacia@uol.com.br

^c Centro Universitário de Anápolis, UniEvangélica, Avenida Universitária Km 3.5, Cidade Universitária, 75083-515, Anápolis, Goiás, Brazil. e-mail: wesleyfarmacia@uol.com.br

^d Instituto de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Amazonas, Avenida General Rodrigo Octávio, 6200, Coroado I, 69077-000, Manaus, Amazonas, Brazil. e-mail: afparente@yahoo.com.br

^e Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Rua Nossa Senhora do Rosário, 3863, 69103-128, Itacoatiara, Amazonas, Brazil. e-mail: weberblood@gmail.com

^f Escola de Engenharia, Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Avenida Universitária, 1440, Setor Universitário, 4605-010, Goiânia, Goiás, Brazil. e-mail: lcasalet@gmail.com

¹ Corresponding Author:

C.M.A. Soares, Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, ICB-II s/n, Sala 206, Campus II, Universidade Federal de Goiás, 74001-970, Goiânia, Goiás, Brazil. Telephone and FAX numbers: 55-62-3521-1110. e-mail: cmasoares@gmail.com

Abstract

The ability to respond to stressful conditions is essential for most living organisms. In pathogenic organisms, this response is required for effective transition from a saprophytic lifestyle to the establishment of pathogenic interactions within a susceptible host. Hyperosmotic stress has been used as a model to study signal transduction and seems to cause many cellular adaptations, including the alteration of protein expression and cellular volume as well as size regulation. In this work, we evaluated the proteomic profile of *Paracoccidioides lutzii* Pb01 yeast cells during osmotic stress induced by potassium chloride. We performed a high accuracy proteomic technique (NanoUPLC-MS^E) to identify differentially expressed proteins during osmotic shock. The data describe an osmoadaptative response of this fungus when subjected to this treatment. Proteins involved in the synthesis of cell wall components were modulated, which suggested cell wall remodeling. In addition, alterations in the energy metabolism were observed. Furthermore, proteins involved in amino acid metabolism and hydrogen peroxide detoxification were modulated during osmotic stress. Our study suggests that *P. lutzii* Pb01. presents a vast osmoadaptative response that is composed of different proteins that act together to minimize the effects caused by osmotic stress.

Keywords: osmoadaptation; glycerol production; hyperosmotic stress; amino acid metabolism; cell wall remodeling.

1. Introduction

To achieve optimal growth rates, microorganisms must have balanced internal conditions. Fluctuations in the external environment can result in a variety of cellular disorders that can promote damage to the internal environment. To avoid this imbalance, the cells must develop adaptive mechanisms that control internal homeostasis (Gasch and Werner-Washburne, 2002). To establish infection, pathogenic fungi must adapt to their environment. In addition to virulence factor production, fungi, such as *Candida albicans*, require adaptation to stress conditions to establish a successful infection (Brown et al., 2014). The *Candida albicans* stress response is considered to be a fitness attribute by acting against a wide variety of stressors, including oxygen and nitrogen reactive species, heat shock, and osmotic and cationic stressors (Fradin et al., 2005; Lorenzen et al., 2004; Rubin-Bejerano et al., 2003). While this response contributes to virulence, it is not directly involved with the host-pathogen interaction.

Osmotic shock can change intracellular turgor pressure (Hohmann, 2002b). Most cells respond to high osmolality by producing and accumulating low molecular weight metabolites, which help to restore the osmotic balance (Burg and Ferraris, 2008). It is commonly accepted that the accumulation of glycerol is the primary and fastest mechanism for adaptation to osmotic stress (Hohmann, 2002a; Klipp et al., 2005; Muzzey et al., 2009). For example, KCl exposure imposes osmotic and cationic stress that leads to a loss of turgor pressure (Kuhn and Klipp, 2012), which mediates the activation of target genes including those encoding glycerol biosynthesis enzymes (Smith et al., 2004). The accumulation of glycerol occurs concomitantly with the change in intracellular osmolarity, contributing to the ability of the cell to resist hyperosmotic shock (Blomberg and Adler, 1989). Hyperosmotic shock in yeast specifically induces transcription of the glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene (*Gpd1p*) that encodes a key enzyme for glycerol synthesis (Brewster et al., 1993). In bacteria and fungi, the high osmolarity glycerol (HOG) MAP kinase pathway triggers these responses. In *S. cerevisiae*, *Sln1p* and *Sho1p* are sensors of the two upstream branches controlling HOG pathway (Maeda et al., 1993; Van Wuytswinkel et al., 2000). Transcriptional analysis revealed that a *Sho1p* homolog was induced in *Paracoccidioides* sp. in the presence of human blood and plasma, suggesting that yeast cells can trigger an adaptive response to osmotic stress under these conditions (Bailao et al., 2006; Bailão et al., 2007).

Paracoccidioidomycosis (PCM) is an important human systemic mycosis with a broad distribution in Latin America. The disease is caused by dimorphic fungi belonging to the genus *Paracoccidioides* that consists of a complex of phylogenetic species (Matute et al., 2006; Teixeira et al., 2009). This disease is transmitted by inhalation of infective airborne conidia or mycelia fragments, which convert to the pathogenic yeast phase in the lungs of the host (San-Blas et al., 2002). *Paracoccidioides* sp. is a pathogen able to infect numerous sites within the human body. The infection occurs primarily in the lungs, from where the fungus can disseminate via the bloodstream and/or the lymphatic system to all parts of the body, leading to the disseminated form of PCM (Franco, 1987).

Proteomic approaches in *Paracoccidioides* sp. have been successfully employed by our group in several studies, including those focusing on environmental stresses, such as the fungal response to iron and zinc deprivation, oxidative and nitrosative stresses (Grossklaus et al., 2013; Parente et al., 2011; Parente et al., 2013; Parente et al., 2015), and hypoxia (Lima et al., 2014), as well as evaluating the response to macrophage infection (Parente-Rocha et al., 2015). In this present study, we mapped the proteome of *Paracoccidioides lutzii* Pb01 yeast cells exposed to KCl for 6 hours. Upon the induction of osmotic stress, yeast cells had alterations in protein levels of key enzymes involved in several metabolic pathways. Our data suggest a reduction in the expression of glycolytic enzymes, while the expression of enzymes related to gluconeogenesis was increased. The expression of enzymes for amino acid metabolism was also altered, suggesting decreases in tyrosine and alanine degradation, and cysteine and glycine biosynthesis. In addition, enzymes related to leucine, valine and isoleucine degradation were induced. These data suggest a potential cell wall remodeling mechanism that occurred when enzymes belonging to the glucan biosynthesis pathway were induced, while chitin biosynthesis enzymes were repressed. In summary, *P. lutzii* Pb01 yeast cells showed several metabolic changes revealing adaptive mechanisms developed by this pathogen to overcome the damage caused by osmotic stress.

2. Material and methods

2.1 Microorganism, osmotic stress treatment and viability analysis

The osmotic stress response was investigated in *P. lutzii* Pb01 yeast cells, (ATCC MYA – 826). Fungal cells were collected from stationary 7-day-old cultures in Fava Neto's medium

[0.3% (w/v) protease peptone, 1% (w/v) peptone, 0.5% (w/v) meat extract, 0.5% (w/v) yeast extract, 4% (w/v) glucose, 0.5% (w/v) NaCl, pH 7.2], washed in PBS and exposed for 6 hours to 0.1 M KCl in the same medium. In the same way, control cells were obtained without KCl treatment. The stress condition used in the majority of experiments (0.1 M KCl) was chosen due to the results of cell viability assays using different concentrations (0.1 and 0.2 M) of stressor. We tested for viability by assessing membrane integrity, and dead cells were marked with propidium iodide as previously described (Grossklaus et al., 2013).

2.2 Quantification of transcripts by RT-qPCR

Total RNA from *P. lutzii* Pb01 yeast cells with and without KCl-treatment was extracted using the Trizol Reagent (Invitrogen Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The High Capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) was used to synthesize the first-strand cDNA from 1 µg of RNA. The cDNA samples were diluted 1:5 in water, and RT-qPCR was performed using the SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in the Step One Plus PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Data normalization was performed by measuring the transcriptional levels of the gene encoding α -tubulin in each set of RT-qPCR experiments. Samples of each cDNA were pooled and serially diluted 1:5 to generate a relative standard curve. Relative expression levels of the genes of interest were calculated using the standard curve method for relative quantification (Bookout et al., 2006). Statistical comparisons were performed using Student's t-test, and samples with p-values < 0.05 were considered statistically significant. The oligonucleotides used in RT-qPCR experiments were designed to span an exon-exon junction (Table S1).

2.3 Protein sample preparation, data acquisition and processing, and protein identification by mass spectrometry analysis

P. lutzii Pb01 cells were grown in Fava-Netto's medium with or without 0.1 M KCl for up to 6 h. The cells were then centrifuged at 1,500 x g, resuspended in 50 mM ammonium bicarbonate, pH 8.5, and lysed using glass beads under strong agitation by a bead beater (BioSpec, Oklahoma, USA) in 5 cycles of 30 sec, while on ice. The cell lysate was centrifuged at 10,000 x g for 15 min at 4 °C and the protein content in supernatant was quantified (Bradford,

1976). The samples were analyzed using nanoscale liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. Aliquots (50 μg) were prepared for NanoUPLC-MS^E as previously described with modifications (Murad and Rech, 2012; Murad et al., 2011). Briefly, 50 mM ammonium bicarbonate containing 25 μl of RapiGESTTM (0.2% v/v) was added to the samples (Waters Corp, Milford, MA). The solution was maintained at 80 °C for 15 min. Following, a 100 mM DTT solution was added and samples were incubated for 30 min at 60 °C. The alkylating agent iodoacetamide (300 mM) was added, followed by sample incubation in a dark room for 30 min. The digestion step was performed using trypsin 50 ng/ μl (Promega, Madison, WI, USA). The sample was vortexed slightly and digested at 37 °C overnight. Following the digestion, 10 μl of 5% (v/v) trifluoroacetic acid was added and samples were incubated at 37 °C for 90 min. The samples were centrifuged at 18,000 $\times g$ at 6 °C for 30 min, and the supernatant was transferred to a recovery vial (Waters Corp). MassPREP Digestion Standard [rabbit phosphorylase B (PHB)] (Waters Corp) was used as internal standard at a final concentration of 150 fmol μl^{-1} . The buffering solution of 20 mM ammonium formate was used to increase the pH.

The nanoscale LC separation of tryptic peptides was carried out on a Waters nanoAcquity UPLC device with 2D technology as previously described (Murad et al. 2012), with modifications. The first fractionation of the peptides was performed by first-dimension chromatography using the XBridge BEH 130 C18 NanoEase column (5 μm , 300 μm \times 50 mm; Waters, USA). The first-dimension solvent A was ammonium formate (20 mM, pH 10.0) and solvent B was acetonitrile (ACN). All fractions obtained were trapped onto a nanoAcquity UPLC Symmetry C18 trap column (5 μm , 180 μm \times 20 mm; Waters, USA) before analytical chromatography. Second dimension chromatography was carried out using a NanoAcquity UPLC column BEH 130 C18 (1.7 μm , 100 μm \times 100 mm; Waters, USA). Second dimension solvent A was 0.1% (v/v) formic acid and solvent B was 0.1% formic acid in acetonitrile (v/v; pH 2.4). The flow rate was 0.9 μl per minute with a temperature of 35 °C. All of the samples were analyzed in three replicates. External calibration was performed using Glu-fibrinopeptide B molecular mass as reference (GFP; Sigma).

The software Protein Lynx Global Server v.2.4 (PLGS) was used for spectra processing, and protein identification was based on a databank search. The chromatographic peak width and MS TOF resolution were configured in automatic mode. Data were submitted to automatic background subtraction, deisotoping and charge state deconvolution. The search was performed

using the *Paracoccidioides Pb01* genome database (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html), based on taxonomy. A maximum of 1 missed cleavage by trypsin was allowed and a mass error tolerance under 50 ppm. Identified protein showed at least one matched peptide and 5 fragments. A maximum false positive rate of 4% was admitted. We also applied searches for modified peptides (cysteine carbamidomethylation; methionine oxidation; serine, threonine and tyrosine phosphorylation). The score provided by PLGS and confidence level, were used as inclusion criteria for identified proteins. Proteins showing a score value above 350 and presenting 100% confidence were included. Protein and peptide tables generated by PLGS were merged and the dynamic range of the experiments, peptides detection type, and mass accuracy were determined for each condition as described in (Murad and Rech, 2012). Protein abundance values were based on the intensity of the three most intense tryptic peptides from a constitutive protein detected in all replicates and with a low variance coefficient. This protein was used to normalize the expression data and accurately compare the protein expression levels to control and KCl-treated samples. Expression^E informatics v.2.5.2 was used to properly quantitate comparisons.

2.4 Dosage of cell wall polymers

Total carbohydrates were measured using *P. lutzii* Pb01 yeast cells cultivated in liquid Fava-Netto medium at 36 °C for 6 h with or without KCl 0.1 M. The cell wall polymers were obtained as previously described (Tomazett et al., 2011). In summary, yeast cells were washed with acetone, ethyl alcohol and ether. After that, cells were suspended in 50 mM Tris HCl pH 7.5 and disrupted with glass beads. Cell walls were separated from the cytosolic fraction by centrifugation at 3,500 x g for 10 min. The alkali soluble (AS) fraction was extracted with 1 N NaOH and 500 mM sodium borohydride.

Total carbohydrates were determined by phenol (PA)-sulfuric acid using glucose as a standard. One milligram of cell wall (dry weight) was dissolved in 250 µl of water and 750 µl sulfuric acid PA. Afterwards, 40 µl of water and 150 µl of sulfuric acid PA were added to 10 µl of the cell wall extract. This mixture was dissolved and stirred for 30 min. 30 µl of phenol (5%) was added and the mixture was incubated for 5 min at 90^o C. The absorbance was measured at 490 nm. Preceding the quantification of 1,3-β-D-glucan content in the AI fraction (alkali

insoluble), the sample was digested with 1,3- β -glucanase (Sigma Aldrich). After digestion, the amount of 1,3- β -D-glucan was estimated by measuring the release of reducing sugars by *p*-amino-hydroxybenzoic acid hydrazide, as previously described (Beauvais et al., 2005).

The amount of N-acetylglucosamine was determined as previously described (Tomazett et al., 2011). In microplates, 2 mg of the cell wall enriched fraction obtained from *P. lutzii* Pb01 yeast cells was hydrolyzed by adding 8 M HCl at 100 °C for 4 h and was neutralized with 8 M NaOH. To 200 μ l of the neutralized extract, we added 100 μ l of 0.15 M Na₂CO₃ in 4% (w/v) acetylacetone, and the mixture was incubated for 20 min at 100 °C. Afterwards, 100 μ l of ethanol PA and 100 μ l of Ehrlich reagent (1.5 g *p*-dimethylaminobenzaldehyde in 30 ml HCl PA and 30 ml of ethanol PA) were added to the mixture. The mixture was incubated for 45 min at room temperature. The absorbance at 520 nm was measured and compared to absorbance values from a standard curve of glucosamine that was obtained through the same reactions.

2.5 Fluorescence microscopy

Fluorescence microscopy was performed as previously described (Zambuzzi-Carvalho et al., 2013). A total of 10⁶ *P. lutzii* Pb01 yeast cells/mL were inoculated in Fava Netto's liquid medium and grown for 3 days under agitation at 150 rpm. Cultures were then incubated in Fava Netto's liquid medium for 6 h with and without 0.1 M KCl while shaking at 36 °C. Cells were fixed in 100% methanol at -80 °C for 20 min and then at -20 °C. Cells were then washed and centrifuged. We used 100 μ g/ml of Calcofluor White (CFW) and Congo Red (CR) (Sigma-Aldrich) to label the cell wall of *P. lutzii* Pb01 yeast cells. The cells were collected and stained with CR and CFW in PBS for 30 min, and then washed once with PBS. The samples were analyzed under a fluorescence microscope (Zeiss AxioCam MRc - Scope A1, Carl Zeiss, Jena, Germany) at 345 nm and 500 nm for CR and CFW, respectively.

2.6 Assays of glycerol-3-phosphate dehydrogenase activity and glycerol measurement

The specific activity of the cytoplasmic glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) was determined as previously described, with modifications (Blomberg and Adler, 1989). Briefly, the assay was performed in a SpectraMax® Paradigm® microplate detection platform using Costar® UV 96-well plates with UV transparent flat bottoms at 25 °C. The NADH

depletion was detected at 340 nm using an extinction coefficient for NADH of $6.2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. One unit of enzyme activity was defined as 1 μmol of NADH consumed per minute. The specific activities were given as mU/mg protein. Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) was assayed in a total volume of 100 μL , in buffer containing 20 mM imidazole-HCl (pH 7.0), 1 mM dithioerythritol (DTE), 1 mM MgCl_2 , 0.67 mM dihydroxyacetone phosphate (DHAP) and 0.09 mM NADH. The reaction was started by the addition of DHAP and was linear for at least 3 min. No background activity of NADH oxidase was detected. At least five protein concentrations in the range of 0.05 to 0.5 mg/mL in the plate were recorded per sample. All experiments were performed at least in triplicate. Glycerol concentration was determined enzymatically using the Free Glycerol Assay kit ab65337 (Abcam) adapted to a SpectraMax® Paradigm® microplate detection instrument following the manufacturer's instructions.

3. Results

3. *P. lutzii* Pb01 yeast cell response to osmotic stress

The effect of KCl on yeast cell viability was assayed using propidium iodide. The percentage of viable cells after 1 h, 2 h, 3 h and 6 h of KCl-treatments (0.1 M and 0.2 M) were determined. No significant loss of viability was observed in yeast culture after treatment with 0.1 M (Fig. S1). Because of this result, 0.1 M KCl and a 6 h time frame were selected to perform subsequent analyses.

The HOG (high osmolarity glycerol) pathway is the best-characterized osmotic signaling system in eukaryotes. For that reason, we carried out a similarity search on *Paracoccidioides* spp. genome databases (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html), using the gene coding for the mitogen activated protein (MAP) kinase (MAPK) involved in osmotic stress responses (HOG1) from yeast as a template (Brewster et al., 1993). The similarity search provided three putative HOG1 sequences: PAAG_00535.1, PABG_06792.1, and PADG_02153.1, corresponding, respectively, to the searches in Pb01, Pb03 and Pb18 genomes. The sequence alignment revealed 82% identity between *Saccharomyces cerevisiae* HOG1 gene and *Paracoccidioides* PAAG_00535.1, PABG_06792.1, and PADG_02153.1 sequences (data not shown).

The quantitative analysis of *P. lutzii* Pb01 HOG1 transcripts (PAAG_00535.1) during osmotic stress was performed using different incubation times (1 h, 3 h and 6 h). The results pointed to an induction in transcription of HOG1 gene in the presence of KCl 0.1 M. This increase is even more significant after three hours of treatment (Fig. 1).

3.2 *P. lutzii* Pb01 global adaptation to osmotic shock

To investigate the differentially regulated proteins in *P. lutzii* Pb01 yeast cells during osmotic stress, we used a high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) apparatus. Three hundred and three proteins were differentially expressed after 6 h treatment with 0.1 M KCl. As depicted in Table S2, 141 proteins were induced by at least 50% when compared to control, while 162 proteins (Table S3) were decreased.

Proteins with increased or decreased expression during osmotic stress were categorized according to their cellular function using the Functional Catalogue (FunCat2) (Tables S2 and S3, respectively). Importantly, 25% of the proteins with significant expression changes belong in the metabolism category. Of the 76 proteins grouped in this category, 46 were up-regulated and 30 were down-regulated. Approximately 12% of the proteins regulated by osmotic stress were involved in energy producing pathways. Additionally, 17.7% of proteins related to translation, post-translational processing and fate were regulated by osmotic stress. Importantly, 15.4% of the down-regulated proteins are involved in protein synthesis and 8.4% of the up-regulated proteins are involved in protein degradation, folding, modification or destination. In addition, approximately 10% of the regulated proteins are part of cell rescue and defense pathways, or are presumed virulence factors. We also found proteins related to cellular transport, cell cycle, DNA processing, and transcription, and proteins with binding functions or cofactor requirements.

A significant number of hypothetical and predicted proteins, as well as proteins without known function, were regulated during osmotic stress (23 proteins with increased and 20 with decreased expression rates). An overview of the functional classifications of the regulated proteins during osmotic stress is presented in Fig. 2. Notably, most of the regulated proteins in the metabolism category are related to amino acid metabolism. Among the down-regulated proteins, in addition to metabolism, are those related to protein synthesis, folding, cell rescue and virulence.

Osmotic stress on *P. lutzii* Pb01 provoked an intense remodeling of amino acid metabolism (Table 1, Fig. 3). Central enzymes involved in nitrogen metabolism, such as aspartate aminotransferase and glutamate dehydrogenase, are involved in the metabolism of ammonia. The resulting glutamate can be used to produce ornithine and citrulline because levels of acetylornithine aminotransferase, ornithine aminotransferase and ornithine carbamoyltransferase were increased during osmotic shock. Additionally, the conversion of arginine to ornithine by arginase might contribute to the level of ornithine. In addition to the high levels of aspartate aminotransferase, the argininosuccinate synthase levels were lower during osmotic stress, indicating an accumulation of aspartate. Additionally, osmotic shock down-regulates enzymes related to phenylalanine and tyrosine degradation, such as 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase and homogentisate 1,2-dioxygenase. Prephenate dehydrogenase, an enzyme that plays a role in tyrosine-phenylalanine inter-conversion, was induced; suggesting that maintaining the appropriate levels of these amino acids is required for osmoadaptation. Moreover, branch chain amino acid degradation may be activated during osmotic stress because one subunit of 2-oxoisovalerate dehydrogenase and methylcrotonoyl CoA carboxylase were induced. Overall, the proteomic data suggest that the fungus might use amino acid osmolytes to regulate cell volume during osmoadaptation.

Taurine is a non-protein amino acid with both known and unknown function (Yancey et al., 1982). It is known that this compound plays a role in osmoregulation (Schaffer et al., 2000). Our proteomic analysis revealed that *P. lutzii* Pb01 potentially increases taurine synthesis during osmotic stress (Fig. 3). It is likely that serine and cysteine are used as precursors in the production of cysteine sulfinate by cysteine synthase and cysteine dioxygenase, which can then be converted in taurine by two reaction steps. Consistently, the enzymes cystathionine beta synthase and serine hydroxymethyltransferase, which consume precursors in the taurine pathway, were decreased (Table 1). These adaptations imply that serine and cysteine are being used for taurine production.

Concerning carbohydrate metabolism, the enzyme glycogen phosphorylase, which produces glucose-1-phosphate, was induced (Table 2). The pentose-phosphate enzymes 6-phosphogluconolactonase isomerase and ribose-5-phosphate isomerase were also induced (Table 2), suggesting that the products of this pathway (fructose-6-phosphate and glyceraldehyde-3-phosphate) may be required during osmotic stress. In addition, the pentose phosphate pathway

produces NADPH that can be used for biosynthetic reactions or detoxification processes. Furthermore, the enzyme pyruvate carboxylase, which is a key enzyme of gluconeogenesis, was induced (Table 2). The enzyme fructose 1,6-bisphosphate aldolase, which provides the precursor of glycerol production, dihydroxyacetone phosphate, was induced (Table 2). Pyruvate decarboxylase, an enzyme that converts pyruvate to acetaldehyde, was also induced in osmotic stress (Table 2). In addition, the key enzyme of the glyoxylate cycle, malate synthase, was induced. Additionally, thioredoxin reductase and glutathione reductase, enzymes involved in cellular detoxification, were induced during treatment with KCl (Table 2).

The enzymes glucose-6-phosphate isomerase, phosphoacetylglucosamine mutase and UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase, putatively related to chitin synthesis, were repressed (Table 2). The glycolytic pathway appears to be reduced during osmotic stress, given that glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, pyruvate kinase, phosphoglycerate kinase and pyruvate dehydrogenase were repressed (Table 2). Moreover, the enzyme aldehyde dehydrogenase, which converts acetaldehyde to acetate, was also repressed in this condition (Table 2).

Figure 4 summarizes the deduced *P. lutzii* Pb01 response to osmotic stress, as revealed by proteomic analysis. From the proteomic analysis, it appears that the cell wall undergoes remodeling because of the increase in UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase, an enzyme involved in glucan biosynthesis, and the decrease in enzymes from chitin biosynthesis (glucose-6-phosphate isomerase, phosphoacetylglucosamine mutase and UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase). Additionally, the osmoadaptative response may be induced, given the up regulation of triosephosphate isomerase that is related to metabolic processes that increase the glycerol in the cytoplasm. In this way, glycogen could be broken down to provide glucose-1-phosphate for glucan biosynthesis. During osmotic stress, fructose 1,6 biphosphatase is induced, suggesting that the glycolytic pathway could be down-regulated while gluconeogenesis is induced to promote glycerol production.

3.3 Cell wall composition of yeast cells changes upon osmotic stress

The carbohydrates in the cell walls of *P. lutzii* Pb01 yeast cells were fractionated according to their solubility in alkali conditions (AI – alkali insoluble; AS – alkali soluble). Fig. 5A depicts a shift in total carbohydrate content in the cell wall fractions under osmotic stress.

After treatment with KCl, there was decrease in the total carbohydrate content in the AI fraction, and an increase in carbohydrate in the AS fraction. In addition, there was a remarkable decrease in the N-acetylglucosamine (GlcNAc) residue content in the cell wall (Fig. 5B) during KCl treatment, indicating a possible reduction of chitin synthesis.

In *P. brasiliensis* yeast cells, the 1,3- β -glucan polymer is present in a small amount (5%) in the AI fraction, compared with the AS fraction (95%) (Kanetsuna et al., 1972). The 1,3- β -glucan content in the AS fraction was not significantly different from the control (Fig. 5C). Taken together, this result and the higher total carbohydrate amount found in the AS fraction (Fig. 5A) suggests that *P. lutzii* Pb01 yeast cells increase 1,3- α -glucan synthesis during osmotic stress.

Calcofluor White (CFW) and Congo Red (CR) dyes interact with various polysaccharides in the fungal cell wall, but exhibit high affinity toward chitin and glucans, respectively. To investigate the cell wall integrity under osmotic stress, the *P. lutzii* Pb01 yeast cells were analyzed by fluorescence microscopy (Fig. 6). *P. lutzii* Pb01 yeast cells under osmotic stress showed weaker fluorescence relative to control when stained with CFW (Fig. 6A, B), indicating decreased chitin levels. Cells exposed to osmotic stress and stained with CR presented stronger fluorescence relative to control (Fig. 5 C, D), suggesting increased glucan levels. The microscopic observations also corroborated the estimated polysaccharide levels in the stressed cells. These results corroborate the proteomic data that demonstrate an increase in the UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase (UGP1) enzyme that is related to 1,3- α -glucan biosynthesis and a decrease in enzymes related to chitin biosynthesis pathway, such as UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase (UAP) and phosphoacetyl glucosamine mutase (AGM) (Fig. 4).

3.4 Enzymatic activity assay of glycerol-3-phosphate dehydrogenase and measurement of glycerol

The induction of enzymes related to glycerol production is a classical fungal response to osmotic shock (Hohmann, 2002a; You et al., 2012). However, the enzymes related to glycerol production were not identified in our proteomic analysis. To investigate the glycerol production by *P. lutzii* Pb01 yeast cells under osmotic stress condition, the glycerol-3-phosphate dehydrogenase activity (GPDH) and the glycerol concentration were assessed. The data revealed

a higher specific activity of GPDH during osmotic stress when compared to the control (Fig. 7A). This increase of the enzymatic activity is consistent with increased levels of glycerol (Fig. 7B). These data taken together support the hypothesis that *P. lutzii* Pb01 under osmotic stress develops a metabolic adaptation aimed at glycerol production, which acts as osmo-protectant.

4. Discussion

The hyperosmotic condition was here defined by the quantitative analysis of *P. lutzii* Pb01 yeast cells HOG1 transcript in yeast cells incubated in a salt concentration similar to that found in human blood, NaCl 0.14M (McCallum et al., 2015). The results depict induction in transcription of the HOG1 gene in the presence of KCl 0.1 M. This increase is even more significant after three hours of treatment. This finding can be relevant for the pathogenesis of *P. lutzii* Pb01 that can disseminate via the bloodstream and/or the lymphatic system to all parts of the body, leading to the disseminated form of PCM (Franco, 1987).

Our proteomic data shows that *P. lutzii* Pb01 yeast cells have reduced glycolytic activity during osmotic stress. This suggests that glycolysis may be redirected to increased production of glycerol through dihydroxyacetone phosphate. The increased activity of glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) corroborates this idea. In addition, gluconeogenesis was induced, presumably to re-establishment of glucose availability to support the increase of glycerol and glucan synthesis. Transcriptional and proteomic data in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* revealed that glycolysis and related pathways show changes during stress conditions (Gasch et al., 2000; Norbeck and Blomberg, 1996; Posas et al., 2000; Soufi et al., 2009).

In our experiments, glycogen phosphorylase was induced, indicating that *P. lutzii* Pb01 yeast cells use glycogen breakdown to mobilize glucose during hyperosmotic stress adaptation, which favors glucose-1-phosphate production. In support of this finding, the induction of glycogenolysis was previously described under stress conditions (Baltzegar et al., 2014; Soufi et al., 2009). In addition, UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase (UGP1) was induced to possibly support the increase in glucan biosynthesis.

The silencing of the gene encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenase in *S. cerevisiae* promoted reduced glycerol levels and increased ethanol production (He et al., 2014). In our study, we found that alcohol dehydrogenase is induced during osmotic stress and glycerol-3-phosphate dehydrogenase is more active. These findings likely indicate that alcohol dehydrogenase is catalyzing the conversion of ethanol to acetaldehyde and pyruvate, which

readies cellular metabolism for glycerol accumulation, suggesting that *P. lutzii* Pb01 yeast cells use glycerol as an osmo-protectant under osmotic stress.

It is evident that the adaptation to high osmolality may differ from species to species; however, some mechanisms are conserved, such as changes in redox metabolism and the production and transport of glycerol (Hohmann, 2002a; Thome, 2007). Our study also revealed a decrease in enzymes involved in the biosynthesis of cysteine, which appears to be an osmo-adaptation mechanism of *P. lutzii* Pb01. Hohmann (Hohmann, 2002a) described that yeasts under stress conditions show diminished expression of genes involved in some amino acid biosynthesis pathways, such as methionine and cysteine. This finding can be interpreted as an adaptative response to ensure that sulfur levels are sufficient for the production of proteins involved in reductive detoxification, such as thioredoxin and glutathione (Hohmann, 2002a). Supporting this idea, our proteomic data demonstrated that both, thioredoxin reductase and glutathione reductase were induced during osmotic shock. It has been observed for *S. cerevisiae* that glutaredoxin-deficient mutants are sensitive to oxidative and osmotic stresses, which indicates a link between these two types of stress conditions (Rodriguez-Manzaneque et al., 1999). Other studies in *S. cerevisiae* have confirmed that, in addition to responding to osmotic stress, the HOG pathway is also associated with the oxidative stress response. It was demonstrated that the response to both stresses is related to Yap1 and Skn7, two yeast transcriptional regulators that cooperate to activate thioredoxin (TRX2) and thioredoxin reductase (TRR1) in response to redox stress signals (He and Fassler, 2005; Morgan et al., 1997; Wormley et al., 2005).

Several other transcriptional factors have also been related to the fungal response to osmotic stress, such as Msn2p/Msn4p, a pair of redundant transcription factors that bind to general stress response elements (STREs) (Martinez-Pastor et al., 1996). These elements require the pentanucleotide sequence CCCCT, in either orientation, usually found in multiple copies upstream of Msn2p/Msn4p target genes (Treger et al., 1998). The transcriptional response of *S. cerevisiae* lacking *msn2p* and *msn4p* genes and exposed to osmotic shock revealed a reduced expression of 46 genes and an increased expression of five genes. Among these genes, we can highlight those coding for catalase, aldehyde dehydrogenase, cytochrome b c1 complex and 6-phosphogluconolactonase, also found in our proteomic analysis. The promoter region of these genes (PAAG_05249, PAAG_05621, PAAG_01454, and PAAG_08088) was obtained in *P.*

lutzii Pb01 genome database, and used as template in the search for CCCCT domain (data not shown). We observed at least two copies of the C₄T sequence in each promoter region, suggesting that these genes possible are under regulation of the Msn2p/Msn4p transcriptional factors.

The pentose phosphate pathway was induced in *P. lutzii* Pb01 during osmotic stress, supporting the hypothesis that this metabolic pathway could be activated to provide NADPH for reactive oxygen species detoxification. The pentose phosphate pathway was also induced in *S. cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* after osmotic shock (Chen et al., 2003; Rep et al., 2000). Moreover, proteomic approaches in *Paracoccidioides* during oxidative stress showed that the pentose phosphate pathway was induced, suggesting that this pathway works as a great source of cellular reducing power in the NADPH form (10).

The degradation of amino acids, such as leucine, isoleucine and valine, seems to be increased during osmotic stress in *P. lutzii* Pb01. This response was also observed for the bacteria *Shewanella amazonenses*, that when exposed to osmotic stress increases proteins involved in branched-chain amino acid degradation. The authors suggest that the role of branched chain amino acid degradation in *S. amazonenses* during osmotic stress may be related to changes in branched chain fatty acid content, which suggests alterations in membrane fatty acids (Parnell et al., 2011). Supporting this assumption, it was observed that during exposure to high levels of NaCl, *Candida membranefaciens* had a high degree of unsaturation of fatty acids in the plasma membrane, resulting in higher membrane fluidity (Khaware et al., 1995). In *P. lutzii* Pb01, trans- Δ -2-enoyl CoA reductase, an enzyme involved in unsaturated fatty acid biosynthesis, was induced during osmotic stress. These results suggest that *P. lutzii* Pb01 responds to KCl-treatment by manifesting changes in the cell membrane that can lead to a remodeling of the fatty-acid content, which alters membrane fluidity. Additionally, the degradation of leucine, isoleucine and valine produces acetyl-CoA, which can be converted to succinate via the glyoxylate cycle, for carbohydrate biosynthesis. Our proteomic analysis also found that malate synthase, an enzyme in the glyoxylate cycle, was up-regulated during osmotic stress.

When cells are under hyperosmotic conditions they shrink and the cell wall becomes restructured (Brown et al., 2014; Levin, 2005). It is possible that these circumstances also affect the carbohydrate composition of *P. lutzii* Pb01 yeasts cells. In *Schizosaccharomyces pombe*, the

re-establishment of the cell wall after osmotic shock requires the glucan synthase enzyme Bgs1p (Sharifmoghadam et al., 2012). Our proteomic findings suggest changes in the architecture of the *P. lutzii* Pb01 cell wall due to a decrease in chitin levels and an increase in the α -glucan polymer, after 6 hours of osmotic stress. Thinner cell walls with reduced chitin content are more tolerant to cell wall-perturbing agents. Therefore, after incubation in the hyper-osmotic condition, cells become adapted to the new environment by adjusting their internal osmolality through glycerol accumulation, and they reorganize the distribution of chitin and glucan to restore cell wall integrity. Alterations in the *P. lutzii* Pb01 cell wall could promote a quick and successful environmental adaptation to osmotic stress.

5. Conclusions

Proteomic analysis allowed us to study the molecular events associated with the adaptive response to osmotic stress in *P. lutzii* Pb01. The data suggest a cell wall remodeling mechanism and changes in metabolism that shift the glycolytic flux to glycerol, modulate amino acids metabolism, and alter the pentose phosphate pathway. Taken together, the findings suggest that glucose mobilization in response to a hyperosmotic condition involves both glycogenolysis and gluconeogenesis. The data also showed the induction of proteins involved in the control of oxidative damage. Our study suggests that *P. lutzii* Pb01 presents a vast osmoadaptive response that is composed of different proteins that act together to minimize the effects caused by osmotic stress. Additionally, the observed *P. lutzii* Pb01 responses to 0.1 M KCl osmotic stress could be relevant to the fungus to cope with the host environment during dissemination to organs and tissues from lungs.

Acknowledgments

This research was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG). The researcher L.N.S.R was supported by a fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

- Bailao, A. M., et al., 2006. Differential gene expression by *Paracoccidioides brasiliensis* in host interaction conditions: representational difference analysis identifies candidate genes associated with fungal pathogenesis. *Microbes Infect.* 8, 2686-97.
- Bailão, A. M., et al., 2007. The transcriptional profile of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells is influenced by human plasma. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 51, 43-57.
- Baltzegar, D. A., et al., 2014. Role for leptin in promoting glucose mobilization during acute hyperosmotic stress in teleost fishes. *J Endocrinol.* 220, 61-72.
- Beauvais, A., et al., 2005. Two alpha(1-3) glucan synthases with different functions in *Aspergillus fumigatus*. *Appl Environ Microbiol.* 71, 1531-8.
- Blomberg, A., Adler, L., 1989. Roles of glycerol and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) in acquired osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 171, 1087-92.
- Bookout, A. L., et al., 2006. High-throughput real-time quantitative reverse transcription PCR. *Curr Protoc Mol Biol.* Chapter 15, Unit 15 8.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248-54.
- Brewster, J. L., et al., 1993. An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science.* 259, 1760-3.
- Brown, A. J., et al., 2014. Stress adaptation in a pathogenic fungus. *J Exp Biol.* 217, 144-55.
- Burg, M. B., Ferraris, J. D., 2008. Intracellular organic osmolytes: function and regulation. *J Biol Chem.* 283, 7309-13.
- Chen, D., et al., 2003. Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Mol Biol Cell.* 14, 214-29.
- Fradin, C., et al., 2005. Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. *Mol Microbiol.* 56, 397-415.
- Franco, M., 1987. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol.* 25, 5-18.
- Gasch, A. P., et al., 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell.* 11, 4241-57.
- Gasch, A. P., Werner-Washburne, M., 2002. The genomics of yeast responses to environmental stress and starvation. *Funct Integr Genomics.* 2, 181-92.
- Grossklaus, D. A., et al., 2013. Response to oxidative stress in *Paracoccidioides* yeast cells as determined by proteomic analysis. *Microbes Infect.* 15, 347-64.
- He, W., et al., 2014. Silencing the glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene in *Saccharomyces cerevisiae* results in more ethanol being produced and less glycerol. *Biotechnol Lett.* 36, 523-9.
- He, X. J., Fassler, J. S., 2005. Identification of novel Yap1p and Skn7p binding sites involved in the oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.* 58, 1454-67.
- Hohmann, S., 2002a. Osmotic adaptation in yeast-control of the yeast osmolyte system. *Int Rev Cytol.* 215, 149-87.
- Hohmann, S., 2002b. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev.* 66, 300-72.

- Kanetsuna, F., et al., 1972. Biochemical studies on the thermal dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. J Bacteriol. 110, 208-18.
- Khaware, R. K., et al., 1995. High membrane fluidity is related to NaCl stress in *Candida membranefaciens*. Biochem Mol Biol Int. 35, 875-80.
- Klipp, E., et al., 2005. Integrative model of the response of yeast to osmotic shock. Nat Biotechnol. 23, 975-82.
- Kuhn, C., Klipp, E., 2012. Zooming in on yeast osmoadaptation. Adv Exp Med Biol. 736, 293-310.
- Levin, D. E., 2005. Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol Mol Biol Rev. 69, 262-91.
- Lima, P. S., et al., 2014. Transcriptional and proteomic responses to carbon starvation in *Paracoccidioides*. PLoS Negl Trop Dis. 8, e2855.
- Lorenzen, I., et al., 2004. Salt stress-induced chloride flux: a study using transgenic *Arabidopsis* expressing a fluorescent anion probe. Plant J. 38, 539-44.
- Maeda, T., et al., 1993. Mutations in a protein tyrosine phosphatase gene (PTP2) and a protein serine/threonine phosphatase gene (PTC1) cause a synthetic growth defect in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol. 13, 5408-17.
- Martinez-Pastor, M. T., et al., 1996. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). EMBO J. 15, 2227-35.
- Matute, D. R., et al., 2006. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. Mol Biol Evol. 23, 65-73.
- McCallum, L., et al., 2015. The hidden hand of chloride in hypertension. Pflugers Arch. 467, 595-603.
- Morgan, B. A., et al., 1997. The Skn7 response regulator controls gene expression in the oxidative stress response of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. EMBO J. 16, 1035-44.
- Murad, A. M., Rech, E. L., 2012. NanoUPLC-MSE proteomic data assessment of soybean seeds using the Uniprot database. BMC Biotechnol. 12, 82.
- Murad, A. M., et al., 2011. Detection and expression analysis of recombinant proteins in plant-derived complex mixtures using nanoUPLC-MS^E. J Sep Sci. 34, 2618-30.
- Muzzey, D., et al., 2009. A systems-level analysis of perfect adaptation in yeast osmoregulation. Cell. 138, 160-71.
- Norbeck, J., Blomberg, A., 1996. Protein expression during exponential growth in 0.7 M NaCl medium of *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol Lett. 137, 1-8.
- Parente-Rocha, J. A., et al., 2015. Macrophage Interaction with *Paracoccidioides brasiliensis* Yeast Cells Modulates Fungal Metabolism and Generates a Response to Oxidative Stress. PLoS One. 10, e0137619.
- Parente, A. F., et al., 2011. Proteomic analysis reveals that iron availability alters the metabolic status of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. PLoS One. 6, e22810.
- Parente, A. F., et al., 2013. A proteomic view of the response of *Paracoccidioides* yeast cells to zinc deprivation. Fungal Biol. 117, 399-410.
- Parente, A. F., et al., 2015. The response of *Paracoccidioides* spp. to nitrosative stress. Microbes Infect. 17, 575-85.
- Parnell, J. J., et al., 2011. Time-course analysis of the *Shewanella amazonensis* SB2B proteome in response to sodium chloride shock. Sci Rep. 1, 25.

- Posas, F., et al., 2000. The transcriptional response of yeast to saline stress. *J Biol Chem.* 275, 17249-55.
- Rep, M., et al., 2000. The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes. *J Biol Chem.* 275, 8290-300.
- Rodriguez-Manzanique, M. T., et al., 1999. Grx5 glutaredoxin plays a central role in protection against protein oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 19, 8180-90.
- Rubin-Bejerano, I., et al., 2003. Phagocytosis by neutrophils induces an amino acid deprivation response in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 11007-12.
- San-Blas, G., et al., 2002. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med Mycol.* 40, 225-42.
- Schaffer, S., et al., 2000. Role of osmoregulation in the actions of taurine. *Amino Acids.* 19, 527-46.
- Sharifmoghadam, M. R., et al., 2012. The integrity of the cytokinesis machinery under stress conditions requires the glucan synthase Bgs1p and its regulator Cfh3p. *PLoS One.* 7, e42726.
- Smith, D. A., et al., 2004. A conserved stress-activated protein kinase regulates a core stress response in the human pathogen *Candida albicans*. *Mol Biol Cell.* 15, 4179-90.
- Soufi, B., et al., 2009. Global analysis of the yeast osmotic stress response by quantitative proteomics. *Mol Biosyst.* 5, 1337-46.
- Teixeira, M. M., et al., 2009. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol Phylogenet Evol.* 52, 273-83.
- Thome, P. E., 2007. Cell wall involvement in the glycerol response to high osmolarity in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 91, 229-35.
- Tomazett, P. K., et al., 2011. Response of *Paracoccidioides brasiliensis* Pb01 to stressor agents and cell wall osmoregulators. *Fungal Biol.* 115, 62-9.
- Treger, J. M., et al., 1998. Functional analysis of the stress response element and its role in the multistress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun.* 243, 13-9.
- Van Wuytswinkel, O., et al., 2000. Response of *Saccharomyces cerevisiae* to severe osmotic stress: evidence for a novel activation mechanism of the HOG MAP kinase pathway. *Mol Microbiol.* 37, 382-97.
- Wormley, F. L., Jr., et al., 2005. Identification and characterization of an SKN7 homologue in *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun.* 73, 5022-30.
- Yancey, P. H., et al., 1982. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science.* 217, 1214-22.
- You, T., et al., 2012. A systems biology analysis of long and short-term memories of osmotic stress adaptation in fungi. *BMC Res Notes.* 5, 258.
- Zambuzzi-Carvalho, P. F., et al., 2013. Transcriptional profile of *Paracoccidioides* induced by oenothain B, a potential antifungal agent from the Brazilian Cerrado plant *Eugenia uniflora*. *BMC Microbiol.* 13, 227.

ACCEPTED MANUSCRIPT

Figure legend

Fig. 1. Expression analysis of the HOG1 gene: Relative levels of expression of the HOG1 gene after treatment with 0.1 M KCl at different treatment times. The gene expression values were normalized using the expression values of the transcript coding for tubulin. * Statistically significant ($p < 0.05$).

Fig. 2. Differentially expressed proteins during treatment with 0.1 M KCl. Three hundred and three proteins were identified and are listed in Tables S2-S3. From the total, 162 proteins were repressed and 141 were induced. The main functional groups to which the proteins belong and their respective percentages, with reference to the total number, are shown. All identified proteins were classified according to Functional Catalogue (FunCat2). *The other metabolic categories are listed in Tables S2-S3.



Fig. 3. Amino acid metabolism during osmotic stress: *Paracoccidioides* yeast cells after KCl treatment present changes in amino acid metabolism. CS: cysteine synthase; CDO: cysteine dioxygenase; BCKDE1B: 2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit beta, ARG: arginase, OAT: ornithine aminotransferase, OTC: ornithine carbamoyltransferase, CBS: cystathionine beta synthase; SHMT: serine hydroxymethyltransferase; AAT: Aspartate aminotransferase; 4HPPD: 4 hydroxyphenylpyruvate dioxygenase; HGDO: homogentisate-1,2-dioxygenase; MMSDH: malonate-semialdehyde dehydrogenase; FAA: fumarylacetoacetase; PPD: prephenate dehydrogenase; T3D: L-threonine 3 dehydrogenase; AGA: alanine glyoxylate aminotransferase; ASS: argininosuccinate synthase; 3HIBD: 3 hydroxyisobutyrate dehydrogenase; MCCCBC: methylcrotonoyl Co-A carboxylase beta chain; NSGD: NAD specific glutamate dehydrogenase; AOAT: acetylornithine aminotransferase; GS: glutamine synthetase.  Up and  Down.

Fig. 4. Representative model of some *Paracoccidioides* sp. metabolic processes presumed to be regulated during osmotic stress. Enzymes involved in glycolysis, gluconeogenesis, pentose phosphate pathway, glyoxylate cycle, chitin and glucan biosynthesis, ethanol and glycogen metabolism are shown in the pathways: GP: Glycogen phosphorylase; UGP1: UTP -glucose-1-phosphate uridylyltransferase; PGI: glucose 6-phosphate isomerase;



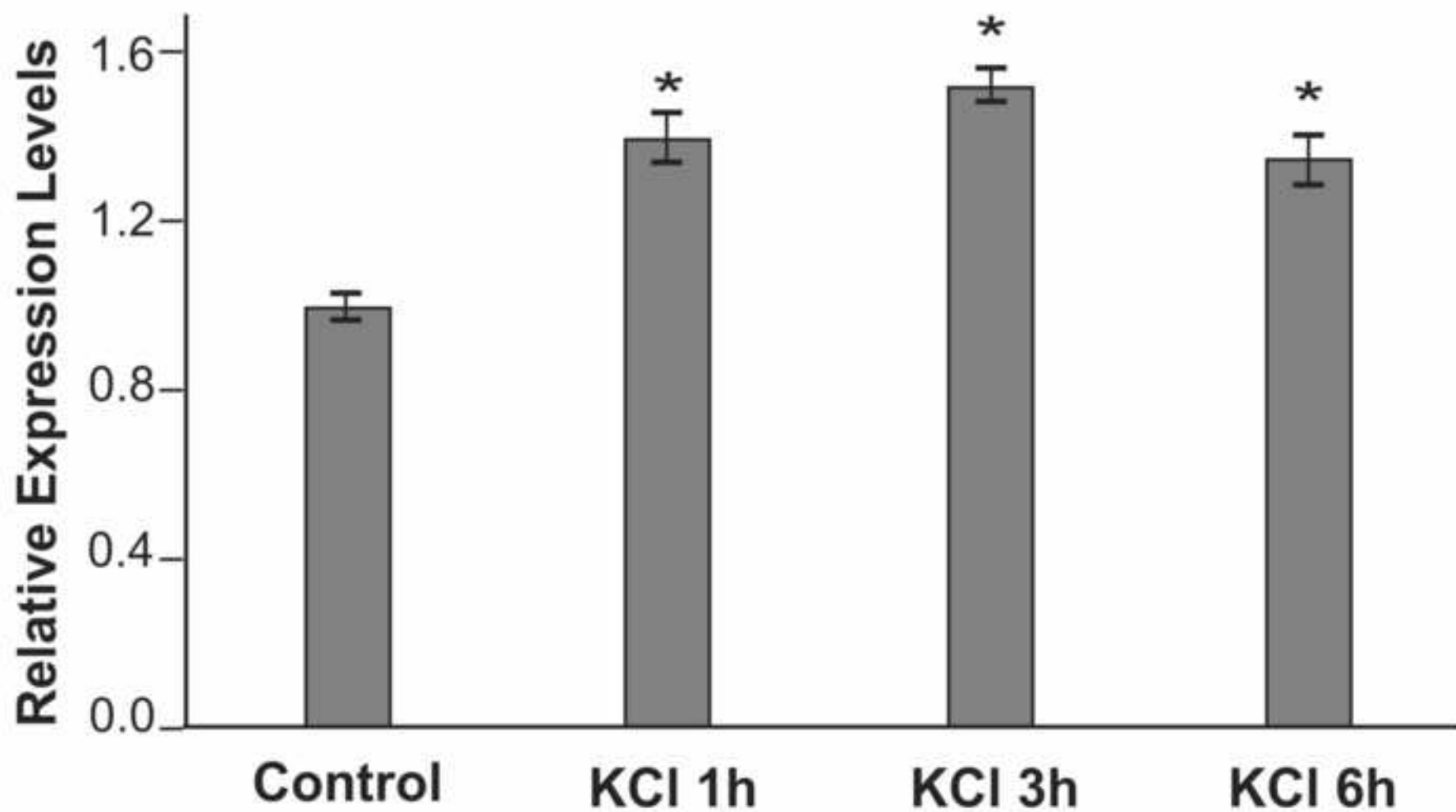
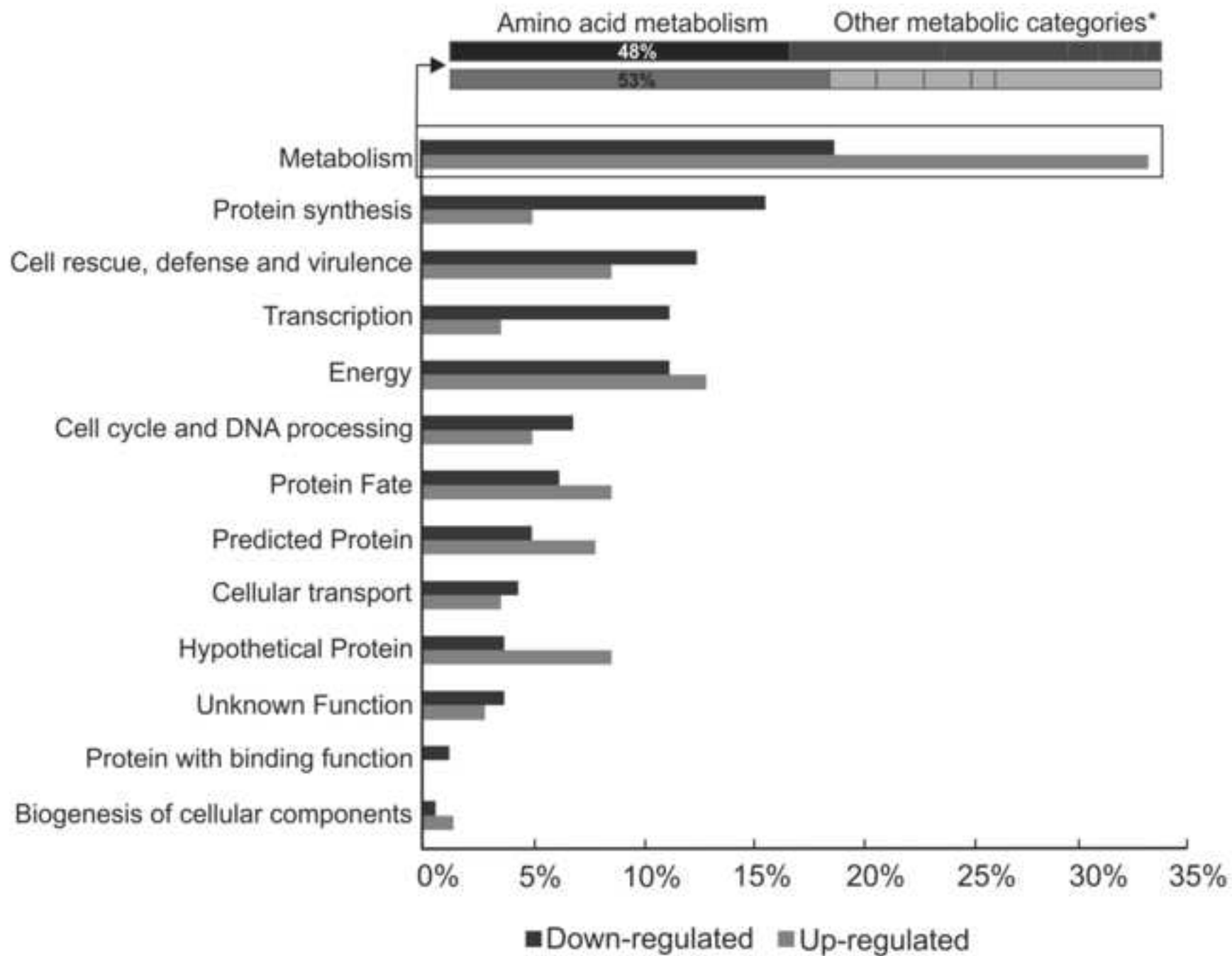
AGM: phosphoacetyl glucosamine mutase; UAP: UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; PGK: phosphoglycerate kinase; PYK: pyruvate kinase; PDH: pyruvate dehydrogenase; PGL: 6 - phosphogluconolactonase; RI-5-P: ribose-5-phosphate isomerase; FBA: fructose bisphosphate aldolase; FBP: fructose-1,6-bisphosphatase; PCX: pyruvate carboxylase; PDC: pyruvate decarboxylase; ALD: aldehyde dehydrogenase; MLS: malate synthase.  Up and  Down.

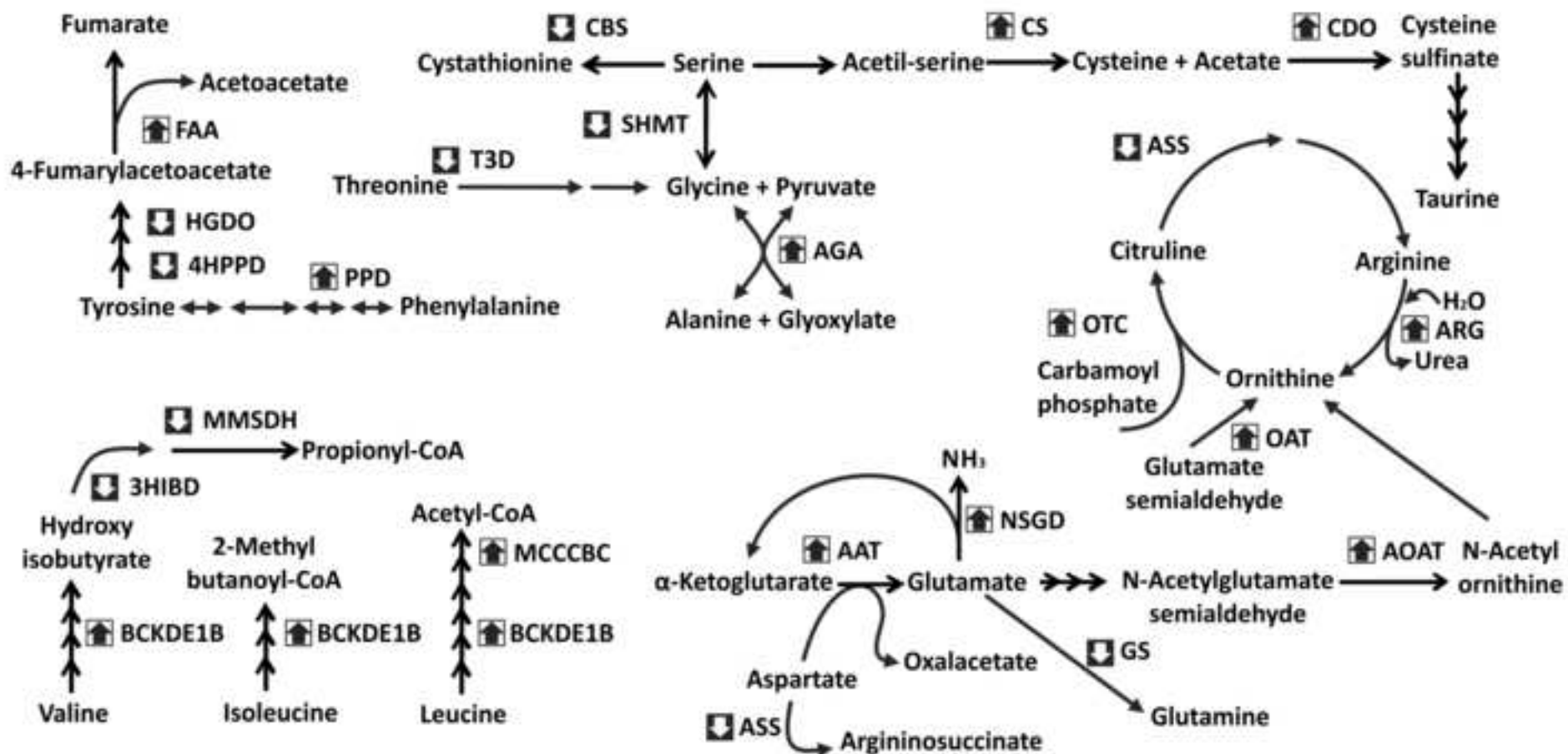
Fig. 5. Carbohydrate content in the cell wall of *Paracoccidioides* yeast cells exposed to KCl. The cell wall of *Paracoccidioides* was isolated from control and KCl-treated cells. The alkali-soluble (AS) and alkali-insoluble (AI) fractions were obtained. **A.** Total carbohydrate content was measured in the AS and AI fractions. **B.** The amount of N-acetylglucosamine (GlcNAc) in the AS fraction. **C.** Amount of 1,3- β -glucan polymer in the AS fraction. All data were normalized relative to the control. Three independent experiments were performed. *Statistically significant compared to the control ($p \leq 0.05$).

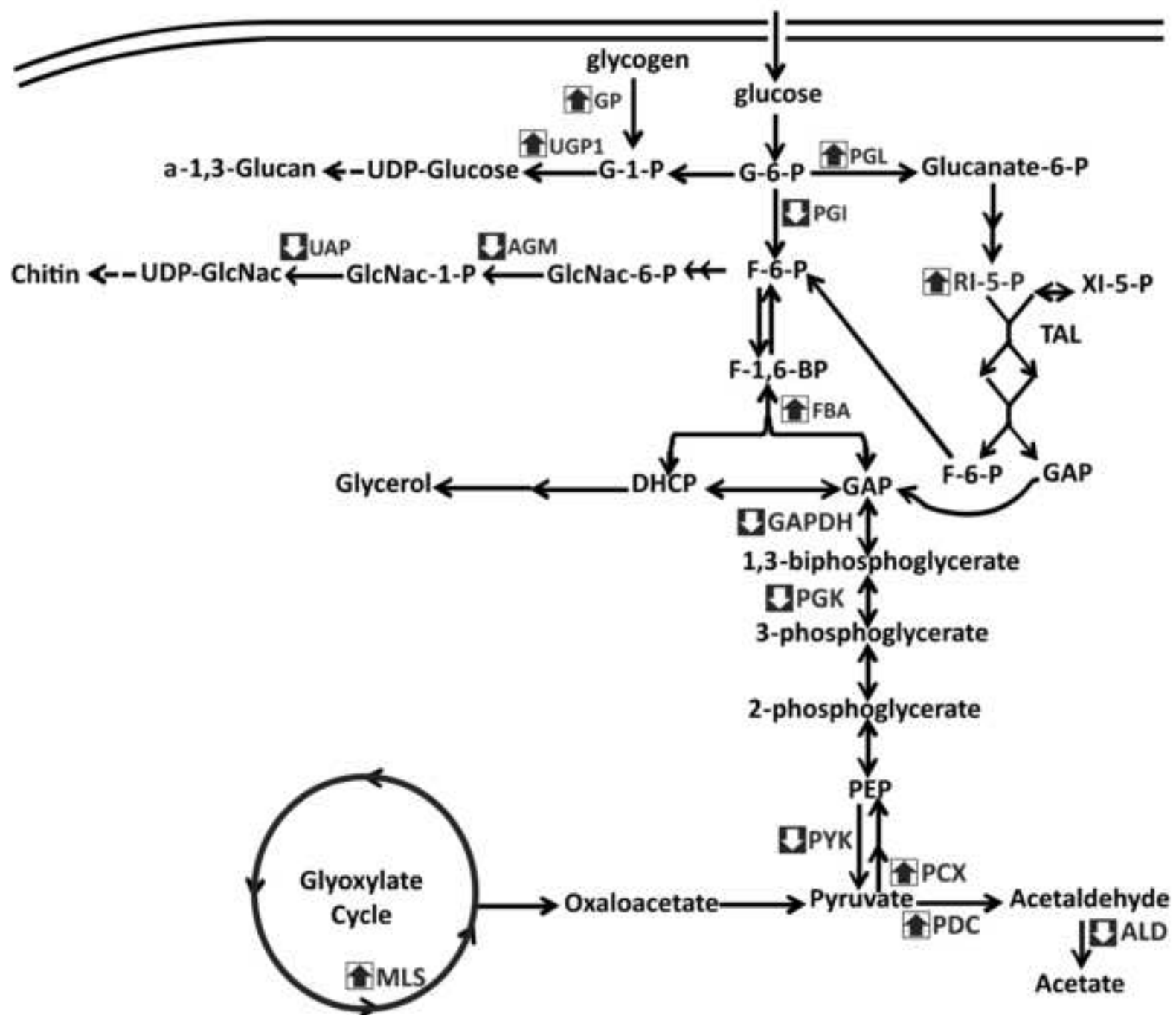
Fig. 6. Fluorescence microscopy of *Paracoccidioides Pb01* yeast cells. Cells treated with 0.1 M KCl had a decrease in fluorescence when stained with CFW (blue cells), and an increase in fluorescence when stained with CR (red cells) relative to the control (untreated cells).

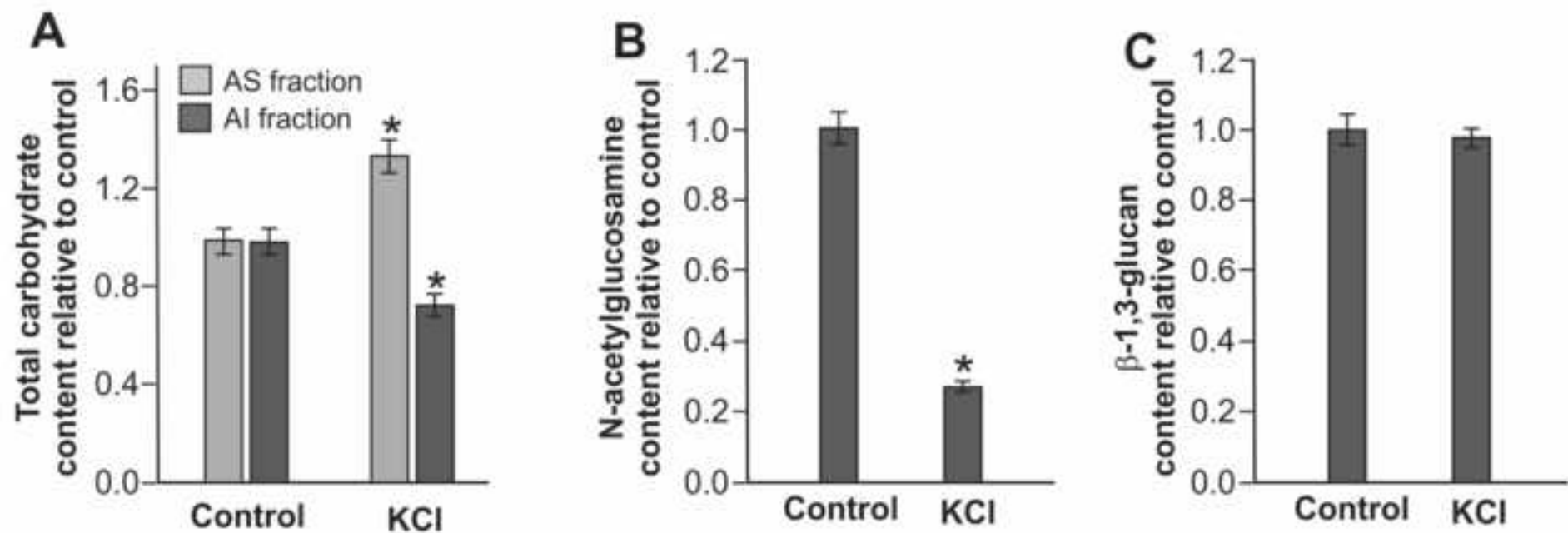
Fig. 7. A. Specific enzymatic activity of GPDH of *Paracoccidioides* yeast cells. GPDH activity was measured using NADH substrate as described in Materials and Methods. Data represent mean values of three independent experiments. GPDH specific activity in untreated (control) yeast cells (C), and after 0.1 M KCl treatment (T). **B.** Glycerol concentrations in untreated (control) yeast cells (C) and after 0.1 M KCl treatment (T).

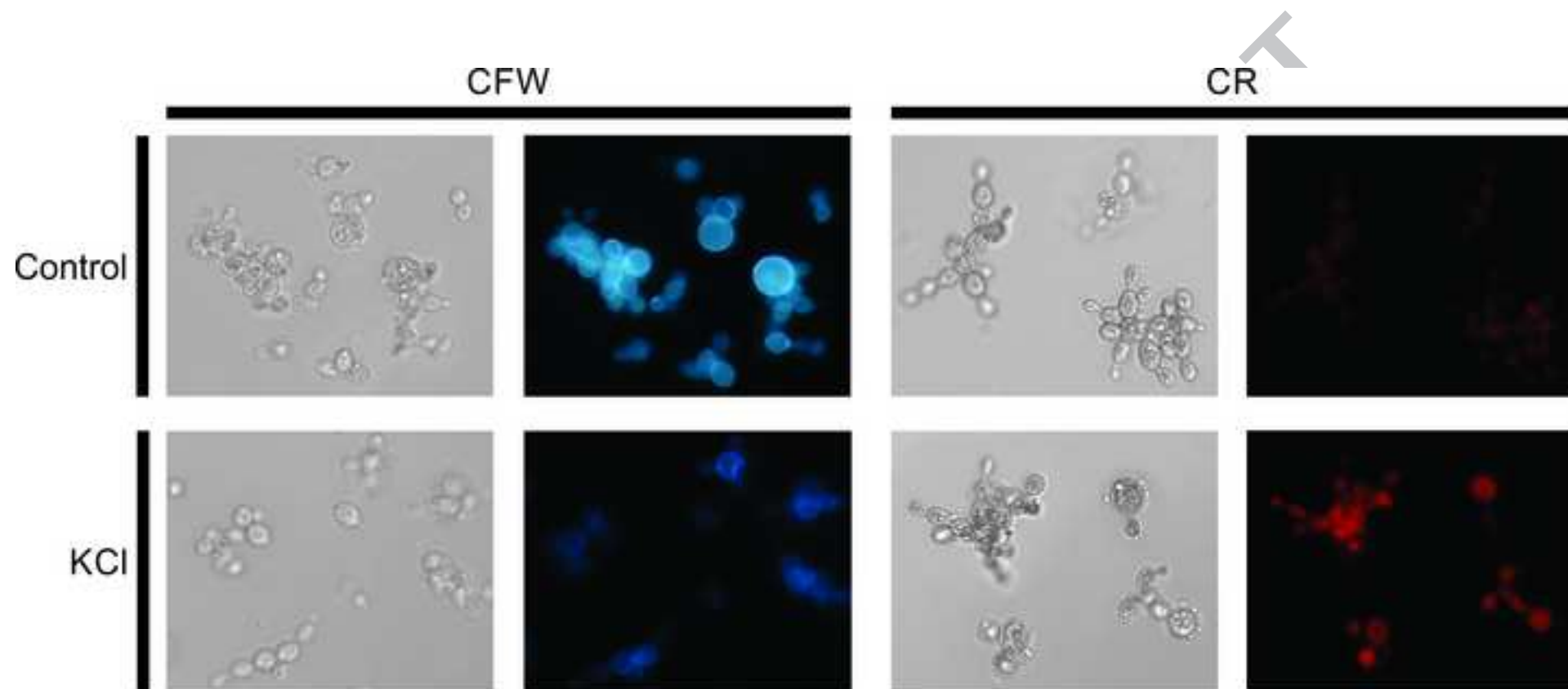
HOG1











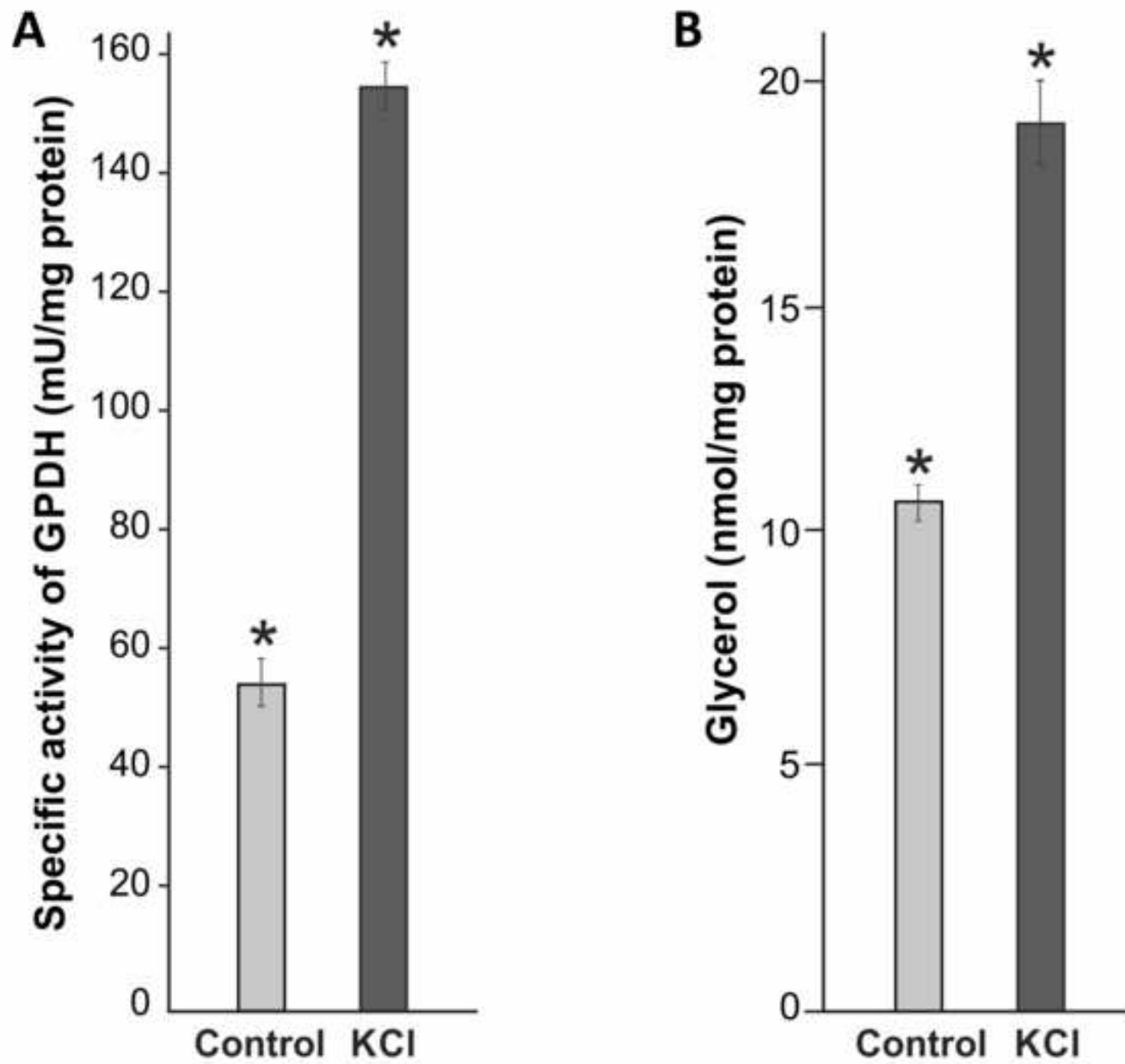


Table 1. *Pb01* proteins related to amino acid metabolism showing altered expression upon 6 h of 0.1M KCl treatment.

ID ^a	Annotation ^b	Fold change ^c	Related Amino acid ^d
↑ PAAG_01563	Aromatic L amino acid decarboxylase	1.86	Isoleucine
↑ PAAG_06947	Gamma glutamyltranspeptidase	*	Taurine
↑ PAAG_08649	Cysteine dioxygenase	*	Cysteine
↑ PAAG_07601	Ornithine carbamoyltransferase	*	Arginine
↑ PAAG_06431	Ornithine aminotransferase	*	Arginine
↑ PAAG_01969	Arginase	*	Arginine
↑ PAAG_02935	Glycine cleavage system H protein	*	Glycine
↑ PAAG_01432	Prephenate dehydrogenase	*	Tyrosine
↑ PAAG_07813	Cysteine synthase	*	Cysteine
↑ PAAG_09095	ATP phosphoribosyltransferase	*	Histidine
↑ PAAG_03138	Alanine glyoxylate aminotransferase	*	Histidine
↑ PAAG_01002	NAD specific glutamate dehydrogenase	*	Alanine
↑ PAAG_01310	2 oxoisovalerate dehydrogenase	*	Valine
↑ PAAG_02693	Saccharopine dehydrogenase	*	Lysine
↑ PAAG_01369	Betaine aldehyde dehydrogenase	*	Glycine
↑ PAAG_02975	2,4-dihydroxyhept-2-ene-1,7-dioic acid aldolase	*	Tyrosine
↑ PAAG_06217	Acetylornithine aminotransferase	*	Arginine
↑ PAAG_04103	Methylcrotonoyl CoA carboxylase beta chain	*	Leucine
↑ PAAG_08718	Succinate semialdehyde dehydrogenase	*	Alanine
↑ PAAG_01194	2 oxoisovalerate dehydrogenase subunit beta	*	Leucine
↑ PAAG_06506	Aspartate aminotransferase	1.54	Tyrosine
↑ PAAG_04309	3-dehydroshikimate dehydratase	*	Phenylalanine
↓ PAAG_08986	Cystathionine beta synthase	-1.72	Cysteine
↓ PAAG_05392	Betaine aldehyde dehydrogenase	-2.77	Glycine betaine
↓ PAAG_07412	Serine hydroxymethyltransferase	-1.82	Serine
↓ PAAG_07114	Argininosuccinate synthase	-2.27	Arginine
↓ PAAG_00966	L threonine 3 dehydrogenase	-3.74	Threonine
↓ PAAG_08164	Homogentisate 1,2-dioxygenase	-2.75	Tyrosine
↓ PAAG_02603	Aspartate aminotransferase	*	Tyrosine
↓ PAAG_03978	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	*	Valine,
↓ PAAG_01302	S-methyl-5-thioadenosine phosphorylase	*	Metionine

↓ PAAG_08166	4 hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	-1.73	Tyrosine
↓ PAAG_07036	Methylmalonate semialdehyde dehydrogenase	-2.16	Valine
↓ PAAG_02901	S adenosylmethionine synthetase	-1.93	Metionine
↓ PAAG_05847	Saccharopine dehydrogenase	*	Lysine
↓ PAAG_06387	Homoisocitrate dehydrogenase	-1.58	Lysine
↓ PAAG_07505	Glutamine amidotransferase subunit pdxT	*	Glutamine
↓ PAAG_04525	Glutamine synthetase	*	Alanine

^aIdentification of differentially regulated proteins from *Paracoccidioides* genome database (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html) using the ProteinLynx Global Server (PLGS) version 3.0 (Waters Corporation. Manchester. UK);

^bProteins annotation from *Paracoccidioides* genome database or by homology from NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>);

^cProtein expression profiles in fold change obtained from ProteinLynx Global Server (PLGS) analysis normalized with internal standard;

^dAmino acid metabolic pathways affected by the identified enzyme;

*Identified only in osmotic stress condition.

ACCEPTED MANUSCRIPT

Table 2. *Pb01* proteins related to energy metabolic processes altered upon 6 h of KCl treatment

ID^a	Annotation^b	Fold change^c
Glycolysis and gluconeogenesis		
↑ PAAG_08295	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha	*
↑ PAAG_01995	Fructose bisphosphate aldolase	1.67
↑ PAAG_00726	Pyruvate carboxylase	*
↓ PAAG_06526	Glucose 6 phosphate isomerase	-1.70
↓ PAAG_06380	Pyruvate kinase	-1.77
↓ PAAG_08468	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase	-5.93
↓ PAAG_02869	Phosphoglycerate kinase	-1.67
Pentose phosphate pathway		
↑ PAAG_05621	6 phosphogluconolactonase	*
↑ PAAG_05146	Ribose 5 phosphate isomerase A	*
Alcohol fermentation		
↑ PAAG_02050	Pyruvate decarboxylase	2.92
↑ PAAG_04541	Alcohol dehydrogenase	*
Glyoxylate cycle		
↑ PAAG_04542	Malate synthase	*
Tricarboxylic acid cycle		
↑ PAAG_04238	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	*
↑ PAAG_01725	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	*
↓ PAAG_01463	Succinyl CoA ligase subunit beta	-2.05
↓ PAAG_00417	Succinyl CoA ligase subunit alpha	-1.68
↓ PAAG_05150	Citrate synthase	*
Electron transport and respiration		
↑ PAAG_08088	Cytochrome b c1 complex subunit 2	*
↑ PAAG_02656	NADH ubiquinone oxidoreductase 51 kDa subunit	*
↑ PAAG_07672	Ubiquinol-cytochrome c reductase subunit 7	*
↑ PAAG_05576	ATP synthase gamma chain	*
↓ PAAG_06155	Vacuolar ATP synthase subunit E	-2.41
↓ PAAG_04820	ATPase alpha subunit	-4.48
↓ PAAG_02019	Mitochondrial F1F0 ATP synthase subunit Atp14	*
↓ PAAG_08037	ATP synthase subunit beta	-1.50
↓ PAAG_04931	Electron transfer flavoprotein subunit beta	-3.78

↓	PAAG_00173	Electron transfer flavoprotein subunit alpha	*
Oxidation of fatty acids			
↑	PAAG_01252	Enoyl-CoA hydratase/isomerase	*
↑	PAAG_03407	Delta 3 5 Delta 2 4 dienoyl CoA isomerase	*
↑	PAAG_04963	Oleate induced peroxisomal protein	*
↑	PAAG_06392	Enoyl CoA hydratase isomerase family protein	*
↓	PAAG_03689	Ketoacyl CoA thiolase B	*
↓	PAAG_02664	3 ketoacyl CoA thiolase	-1.84
↓	PAAG_05454	Acyl CoA dehydrogenase	-2.97
↓	PAAG_08859	Peroxisomal multifunctional enzyme	-2.48

^aIdentification of differentially regulated proteins from *Paracoccidioides* genome database (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html) using the ProteinLynx Global Server (PLGS) version 3.0 (Waters Corporation, Manchester, UK);

^bProteins annotation from *Paracoccidioides* genome database or by homology from NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>);

^cProtein expression profiles in fold change obtained from ProteinLynx Global Server (PLGS) analysis normalized with internal standard.

*: identified only in osmotic stress condition.

Highlights

- * Osmotic stress response determines increase in the glycerol and glucan synthesis
- * *Paracoccidioides* osmotic stress adaptation implies a cell wall shift
- * Osmoadaptative response involves remodeling in glycolytic and amino acid metabolism

ACCEPTED MANUSCRIPT

5 DISCUSSÃO

Trabalhos realizados por meio de análises transcricionais e proteômicas na levedura *Saccharomyces cerevisiae* revelaram que a via glicolítica e as vias ligadas à ela apresentam mudanças durante condições de estresse (Norbeck & Blomberg, 1996; Posas *et al.*, 2000; Gasch *et al.*, 2000; Soufi *et al.*, 2009). Os dados proteômicos de *Paracoccidioides* sp. obtidos no presente estudo revelaram que a via glicolítica apresenta-se reduzida durante o estresse osmótico. Este fato sugere que o metabolismo de carbono pode ser redirecionado de síntese piruvato para o aumento da produção de glicerol, uma vez que a gliconeogênese foi induzida, supostamente para promover a síntese de glicerol a partir de diidroxiacetona fosfato. Já foi demonstrado em *S. cerevisiae* que quando o gene codificante para glicerol-3-fosfato desidrogenase era silenciado ocorria redução nos níveis de glicerol e concomitantemente um aumento nos níveis da produção de etanol (He *et al.*, 2014). Em nosso estudo, os dados revelam que a enzima álcool desidrogenase foi induzida durante o estresse osmótico, e a enzima glicerol-3-fosfato apresentou maior atividade nessa condição. Esse fato sugere que a álcool desidrogenase possa estar catalizando a conversão de etanol à acetaldeído, direcionando o metabolismo para a produção de glicerol, indicando que *Paracoccidioides* sp. utilize glicerol como osmoprotetor sob condições de estresse osmótico.

A enzima glicogênio fosforilase também foi induzida, sugerindo que *Paracoccidioides* sp. degrada glicogênio durante o estresse osmótico favorecendo a produção de glicose-1-fosfato. Suportando este fato, já foi demonstrado em *S. cerevisiae* que ocorre um aumento na degradação de glicogênio em condições de estresse osmótico, provendo ao fungo glicose-6-fosfato (Soufi *et al.*, 2009).

Sabe-se que a adaptação às condições de alta osmolalidade pode variar de espécie para espécie, mas alguns mecanismos são conservados, como alterações no metabolismo redox, e na produção e transporte de glicerol (Hohmann, 2002; Thome, 2007). Nosso estudo revelou uma diminuição nas enzimas envolvidas na biossíntese de cisteína, o que parece ser um mecanismo de osmo adaptação em *Paracoccidioides*. Hohmann (2002) descreveu que leveduras sob condições de estresse apresentaram uma diminuição na expressão

de genes codificantes para enzimas envolvidas na biossíntese de alguns aminoácidos, como metionina e cisteína. Esse achado pode ser interpretado como uma resposta adaptativa visando assegurar níveis de enxofre para a produção de proteínas envolvidas em processos de detoxificação, como tioredoxina e glutathione (Hohmann, 2002). Suportando essa idéia, nossos dados proteômicos demonstraram que tanto a enzima tioredoxina redutase quanto a glutathione redutase foram induzidas durante o choque osmótico. Já foi demonstrado em *S. cerevisiae*, que mutantes deficientes de glutathione são mais sensíveis ao estresse oxidativo e ao estresse osmótico, o que indica uma ligação entre os dois tipos de estresse (Rodriguez-Manzanque *et al.*, 1999). Outros estudos em *S. cerevisiae*, tem confirmado que, em adição à resposta ao estresse a via HOG é também associada à resposta ao estresse oxidativo. Já foi demonstrado que em resposta tanto ao estresse osmótico quanto ao estresse oxidativo Yap1 e Skn7, dois reguladores transcricionais em leveduras que cooperam para a ativar tioredoxina (TRX2) e tioredoxina redutase (TRR1) em resposta a sinais de estresse redox (Morgan *et al.*, 1997; He and Fassler, 2005; Wormley *et al.*, 2005).

A via das pentoses fosfato foi induzida em *Paracoccidioides* sp. durante o estresse osmótico, sugerindo que a via possa estar sendo ativada para fornecer gliceraldeído-3-fosfato para a biossíntese de glicerol e NADPH para processos de detoxificação. Essa via também apresentou-se induzida em *S. cerevisiae* e em *Schizosaccharomyces pombe*, após esses microrganismos terem sido submetidos à condição de estresse osmótico (Rep *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2003). Adicionalmente, análises proteômicas realizadas no fungo *Paracoccidioides* sp. durante estresse oxidativo, revelaram que a via das pentose fosfato também mostrou-se induzida nesta condição, indicando que esta via atua como uma grande fonte celular de poder redutor na forma de NADPH (Grossklaus *et al.*, 2013).

A degradação de aminoácidos como leucina, isoleucina e valina mostrou-se induzida durante o estresse osmótico em *Paracoccidioides* sp. Esta resposta também foi observada para a bactéria *Shewanella amazonenses*, que quando exposta a uma condição de estresse osmótico induz proteínas envolvidas na degradação de aminoácidos de cadeia ramificada. Os autores sugerem que o papel da degradação de aminoácidos de cadeia ramificada em *S. amazonenses* durante o estresse osmótico pode estar relacionada com alterações no conteúdo

de ácidos graxos de cadeia ramificada, sugerindo mudanças de ácido graxos de membrana (Parnell et al., 2011). Corroborando esta hipótese, foi observado em *Candida membranefaciens* que quando na presença de NaCl, esta levedura apresenta alto teor de ácidos graxos insaturados na membrana plasmática, resultando em uma maior fluidez da membrana (Khaware et al. 1995). Além disso, também foi descrito em *S. cerevisiae* que o estresse osmótico reduz a fluidez da membrana (Laroche et al., 2001). Reforçando esta ideia, em nossa análise proteômica, foi observado em *Paracoccidioides* que a enzima trans-2-enoil CoA redutase envolvida na biossíntese de ácidos graxos de cadeia insaturada foi induzida durante o estresse osmótico. Estes resultados sugerem que o fungo possa estar respondendo ao tratamento com KCl manifestando mudanças na membrana celular, promovendo o aumento de ácidos graxos de cadeia ramificada e concomitantemente aumentando a fluidez da membrana.

Os dados proteômicos sugerem que possa estar ocorrendo mudanças na parede celular de *Paracoccidioides* sp. durante o estresse osmótico. O perfil proteômico obtido no presente trabalho indica uma diminuição nos níveis de quitina e um aumento nos níveis de α -glucana. Análises por meio de microscopia utilizando CFW para corar quitina, revelaram que os níveis deste carboidrato de parede celular foram diminuídos durante o tratamento com KCl. Experimentos de dosagem de carboidratos revelaram que a fração alkali-solúvel foi induzida durante o estresse osmótico; além disso já é descrito que o polímero 1,3- α -glucana está presente nesta fração (Kanetsuna et al. 1972), reforçando a ideia de que o estresse osmótico induz mudanças na parede celular de células leveduriformes deste fungo.

6 CONCLUSÕES

A análise proteômica nos possibilitou estudar os eventos moleculares associados à resposta adaptativa de *Paracoccidioides* sp. ao estresse osmótico. Este trabalho permitiu acessar a modulação geral de proteínas do fungo *Paracoccidioides* sp. envolvidas principalmente no mecanismo de osmorregulação deste patógeno. Foram identificadas 375 proteínas diferencialmente expressas, sendo 163 mais abundantes na condição de estresse osmótico e 212 menos abundantes nesta condição.

O perfil proteômico avaliado sugere um mecanismo de remodelamento de parede celular como resposta às diferenças de osmolaridade provocadas pelo estresse osmótico, assim como alterações no metabolismo evidenciando uma mudança no fluxo glicolítico para a biossíntese de glicerol, modulando o metabolismo de aminoácidos, assim como a via das pentoses fosfato.

Os dados também mostraram a indução de proteínas envolvidas no controle de danos oxidativos. Neste sentido, nosso estudo revelou que *Paracoccidioides* possui um amplo repertório osmoadaptativo, composto por diferentes proteínas que atuam de maneira complementar e que devem minimizar os efeitos causados pelo estresse osmótico.

7 REFERÊNCIAS

Albrecht D, Guthke R, Brakhage AA, Kniemeyer O. (2010). Integrative analysis of the heat shock response in *Aspergillus fumigatus*. **BMC Genomics**. 11:32.

Ambudkar IS. (2011). Dissection of calcium signaling events in exocrine secretion. **Neurochem Res**. 36(7):1212-21.

Asif AR, Oellerich M, Armstrong VW, Gross U, Reichard U. (2010). Analysis of the cellular *Aspergillus fumigatus* proteome that reacts with sera from rabbits developing an acquired immunity after experimental aspergillosis. **Electrophoresis**. 31(12):1947-58.

Bagagli E, Bosco SM, Theodoro RC, Franco M. (2006). Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. **Infect Genet Evol** 6(5): 344-51.

Bailão AM, Schrank A, Borges CL, Dutra V, Molinari-Madlum EEWI, Felipe MSS, Mendes- Giannini MJS, Martins WS, Pereira M e Soares, CMA. (2006). Differential gene expression by *Paracoccidioides brasiliensis* in host interaction conditions: representational difference analysis identifies candidate genes associated with fungal pathogenesis. **Microbes Infect**. 8(12-13): 2686-97.

Bailão AM, Shrank A, Borges CL, Parente JA, Dutra V, Felipe MS, Fiuza RB, Pereira M, Soares CMA. (2007). The transcriptional profile of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells is influenced by human plasma. **FEMS Immunol Med Microbiol**. 51(1): 43-57.

Bhadauria V, Zhao WS, Wang LX, Zhang Y, Liu JH, Yang J, Kong LA, Peng YL. (2007). Advances in Fungal proteomics. **Microbiol Res**. 162 (3):193-200.

Blomberg A, Adler L. (1989). Roles of glycerol and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) in acquired osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Bacteriol**. 171(2): 1087-92.

Blotta MH, Mamoni RL, Oliveira SJ, Nouer SA, Papaiordanou PM, Goveia A, Camargo ZP. (1999). Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. **Am J Trop Med Hyg**. 61(3):390-4.

Bonifaz A, Vázquez-González D, Perusquía-Ortiz AM. (2011). Endemic systemic mycoses: coccidioidomycosis, histoplasmosis, paracoccidioidomycosis and blastomycosis. **J Dtsch Dermatol Ges**. 9(9):705–15.

Brewster J, Valoir T, Dwyer N, Winter E, Gustin M. (1993). An osmosensing signal transduction pathway in yeast. **Science**. 259:1760-63.

Bruneau JM, Magnin T, Tagat E, Legrand R, Bernard M, Diaquin M, Fudali C, Latgé JP. (2001). Proteome analysis of *Aspergillus fumigatus* identifies glycosylphosphatidylinositol- anchored proteins associated to the cell wall biosynthesis. **Electrophoresis**. 22(13):2812-23.

Burg MB, Ferraris JD (2008). Intracellular organic osmolytes: function and regulation. **J Biol Chem**. 283(12): 7309-13.

Camargo ZP, Franco MF. (2000). Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Rev Iberoam Micol**. 17(2): 41-48

Carberry S, Neville CM, Kavanagh KA, Doyle S. (2006). Analysis of major intracellular proteins of *Aspergillus fumigatus* by MALDI mass spectrometry: Identification and characterisation of an elongation factor 1B protein with glutathione transferase activity. **Biochem Biophys Res Commun**. 341(4):1096-104.

Carrero LL, Nino-Vega G, Teixeira MM, Carvalho MJ, Soares CMA, Pereira M, Jesuino RS, McEwen JG, Mendoza L, Taylor JW, Felipe MS, San-Blas G. (2008). New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. **Fungal Genet Biol**. 45(5): 605-12.

Cash, P. (2002). Proteomics: the protein revolution. **Biologist (London)**. 49(2):58-62.

Chauhan N, Latgé JP, Calderone R. (2006). Signalling and oxidant adaptation in *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. **Nat Rev Microbiol**. 4(6):435-44.

Chen D, Toone WM, Mata J, Lyne R, Burns G, Kivinen K, Brazma A, Jones N, Bähler J. (2003) Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. **Mol. Biol. Cell**. 14:214-29.

Corte AC, Svoboda WK, Navarro IT, Freire RL, Malanski LS, Shiozawa MM, *et al.* (2007). Paracoccidioidomycosis in wild monkeys from Paraná State, Brazil. **Mycopathologia**. 164(5):225-8.

Corte AC, Itano EN, Freire RL, Camargo ZP, Ono MA. (2009). Detecção de anticorpos para *Paracoccidioides brasiliensis* em cavalos da região norte do Estado do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**. 30(2):441-6.

Cunningham KW. (2011). Acidic calcium stores of *Saccharomyces cerevisiae*. **Cell Calcium**. 50(2):129-38.

De Brito T, Franco MF. (1994). Granulomatous inflammation. **Rev. Inst. Med Trop. São Paulo**. 36(2):185-92.

Duran R, Cary JW, Calvo AM. (2010). Role of the Osmotic Stress Regulatory Pathway in Morphogenesis and Secondary Metabolism in Filamentous Fungi. **Toxins**. 2(4): 367-81.

Gao L, Song Y, Cao J, Wang S, Wei H, et al. (2011). Osmotic stabilizer-coupled suppression of NDR defects is dependent on the calcium-calcineurin signaling cascade in *Aspergillus nidulans*. **Cell Signal**. 23(11):1750–7.

Garcia NM, Del Negro GM, Heins-Vaccari EM, Melo NT, Assis CM, Lacaz CS. (1993). *Paracoccidioides brasiliensis*, a new sample isolated from feces of a penguin (*Pygoscelis adeliae*). **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. 35(3):227-35.

Gasch AP. (2002). The Environmental Stress Response: a common yeast response to environmental stresses. *In*: Hohmann S, Mager P (eds). **Yeast Stress Responses**. Springer-Verlag: Berlin; 11-70.

Gasch AP, Spellman PT, Kao CM, Carmel-Harel O, Eisen MB, Storz D, Botstein D, Brown PO. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. **Mol Biol Cell**. 11:4241-57.

Grossklaus DA, Bailão AM, Rezende TCV, Borges CL, Pelli de Oliveira MA, Parente JA, Soares CMA. (2013). Response to oxidative stress in *Paracoccidioides* yeast cells as determined by proteomic analysis. **Microbes Infect**. 15(5):347-64.

Gustin MC, Albertyn J, Alexander M, Davenport K. (1998). MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol Mol Biol Rev**. 62(4):1092-2172.

He W, Ye S, Xue T, Xu S, Li W, Lu J, Cao L, Ye B, Chen Y. (2014). Silencing the glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene in *Saccharomyces cerevisiae* results in more ethanol being produced and less glycerol. **Biotechnol Lett**. 36(3):523-9.

He XJ, Fassler JS. (2005). Identification of novel Yap1p and Skn7p binding sites involved in the oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Microbiol**. 58:1454-67.

Hohmann S. (2002). Osmotic adaptation in yeast-control of the yeast osmolyte system. **Int Rev Cytol**. 215:149-87.

Hohmann S. (2002). Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. **Microbiol Mol Biol Rev**. 66(2):300-72.

Hong MP, Vu K, Bautos J, Gelli A. (2010). Cch1 restores intracellular Ca²⁺ in fungal cells during endoplasmic reticulum stress. **J Biol Chem**. 285(14):10951-8.

Jamesdaniel S, Salvi R, Colling D. (2009). Auditory proteomics: Methods, accomplishments and challenges. **Brain Res**. 1277:24-36.

Jones CA, Greer-Philips SE, Borkovich KA. (2007). The response regulator RRG-1 functions upstream of a mitogen-activated protein kinase pathway impacting asexual development, female fertility, osmotic stress, and fungicide resistance in *Neurospora crassa*. **Mol Biol Cell**. 18(6): 2123-36.

- Kanetsuna F, Carbonell LM, Azuma I, Yamamura Y. (1972). Biochemical studies on the thermal dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Bacteriol.** 110 (1):208-18.
- Khaware RK, Koul A, Prasad R. (1995). High membrane fluidity is related to NaCl stress in *Candida membranefaciens*. **Biochem Mol Biol Int.** 35:875-80.
- Kim Y, Nandakumar MP, Marten MR. (2007). Proteome map of *Aspergillus nidulans* during osmoadaptation. **Fungal Genet Biol.** 44(9):886-95.
- Klipp E, Nordlander B, Krug R, Gennemark P, Hohmann S. (2005). Integrative model of the response of yeast to osmotic shock. **Nat Biotechnol.** 23(8): 975-82.
- Kniemeyer O, Lessing F, Scheibner O, Hertweck C, Brakhage AA. (2006). Optimisation of a 2-D gel electrophoresis protocol for the human-pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. **Curr Genet.** 49(3):178-89.
- Krantz M, Nordlander B, Valadi H, Johansson M, Gustafsson L, Hohmann S. (2004). Anaerobicity prepares *Saccharomyces cerevisiae* cells for faster adaptation to osmotic shock. **Eukaryot Cell.** 3(6):1381-90.
- Laroche C, Beney L, Marechal P, Gervais P. (2001). The effect of osmotic pressure on the membrane fluidity of *Saccharomyces cerevisiae* at different physiological temperatures. **Appl Microbiol Biotechnol.** 56:249-254.
- Lew RR, Levina NN, Shabala L, Anderca ML, Shabala SN. (2006). Role of a mitogen- activated protein kinase cascade en ion flux-mediated turgor regulation in fungi. **Eukaryot Cell.** 5(3): 480-7.
- Lew RR, Nasserifar S. (2009). Transient responses during hyperosmotic shock in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. **Microbiology.** 155(Pt 3): 903-11.
- Lim D, Hains P, Walsh B, Bergquist P, Nevalainen H. (2001). Proteins associated with the cell envelope of *Trichoderma reesei*: A proteomic approach. **Proteomics.** 1(7):899-909.
- Mager WH, Siderius M. (2002). Novel insights into the osmotic stress response of yeast. **FEMS Yeast Res.** 2(3):251-7.
- Marques SA, Franco MF, Mendes RP, Silva NC, Baccili C, Curcelli ED, Feracin AC, Oliveira CS, Tagliarini JV, Dillon NL. (1983). Epidemiologic aspects of paracoccidioidomycosis in the endemic area of Botucatu (São Paulo - Brazil). **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.** 25(2):87-92.
- Martin DC, Kim H, Mackin NA, Maldonado-Baez L, Evangelista CC, et al. (2011). New Regulators of a High Affinity Ca²⁺ Influx System Revealed through a Genome-wide Screen in Yeast. **J Biol Chem.** 286(12):10744–54.

Martinez R. (2010). Paracoccidioidomycosis: the dimension of the problem of a neglected disease. **Rev Soc Bras Med Trop.** 43(4):480.

Matute DR, McEwen JG, Puccia R, Montes BA, San-Blas G, Bagagli E, Rauscher JT, Restrepo A, Morais F, Nino-Vega G, Taylor JW. (2006). Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Mol Biol Evol.** 23(1):65-73.

Melin P, Schnürer J, Wagner EG. (2002). Proteome analysis of *Aspergillus nidulans* reveals proteins associated with the response to the antibiotic concanamycin A, produced by *Streptomyces* species. **Mol Genet Genomics.** 267(6):695-702.

Melin P. (2004). Proteomics as a tool to study microbial interactions. **Curr Prot.** 1: 27–34.

Miller TK, Renault S, Selitrennikoff CP. (2002). Molecular dissection of alleles of the osmotic-1 locus of *Neurospora crassa*. **Fungal Genet Biol.** 35(2): 147-55.

Monteoliva L, Martinez-Lopez R, Pitarch A, Hernaez ML, Serna A, Nombela C, Albar JP, Gil C. (2010). Quantitative proteome and acidic subproteome profiling of *Candida albicans* yeast-to-hypha transition. **J Proteome Res.** 10(2):502-17.

Morgan BA, Banks GR, Toone WM, Raitt D, Kuge S, Johnston LH. (1997). The Skn7 response regulator controls gene expression in the oxidative stress response of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO J.** 16, 1035-44.

Muzzey D, Gómez-Urbe C, Mettetal JT, Van Oudenaarden A. (2009). A systems-level analysis of perfect adaptation in yeast osmoregulation. **Cell.** 138(1):160-71.

Naiff RD, Ferreira LCL, Barret TV, Naiff MF, Arias JR. (1986). Paracoccidioidomycose enzoótica em tatus (*Dasypus novemcinctus*) no estado do Pará. **Rev Inst Med Trop S Paulo.** 28(1):19-27.

Neidhardt FC. (2011). How microbial proteomics got started. **Proteomics.** 11(15):2943-6.

Nevalainen KM, Te'o VS, Bergquist PL. (2005). Heterologous protein expression in filamentous fungi. **Trends Biotechnol.** 23(9):468–74.

Nikolaou E, Agrafioti I, Stumpf M, Quinn J, Stansfield I, Brown AJP. (2009). Phylogenetic diversity of stress signalling pathways in fungi. **BMC Evol Biol.** 9:44.

Noguchi R, Banno S, Ichikawa R, Fukumori F, Ichiishi A, Kimura M, Yamaguchi I, Fujimura M. (2007). Identification of OS-2 MAP kinase-dependent genes induced in response to osmotic stress, antifungal agent fludioxinil, and heat shock in *Neurospora crassa*. **Fungal Genet Biol.** 44(3): 208-18.

Norbeck J, Blomberg A. (1996). Protein expression during exponential growth in 0.7 M NaCl medium of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol. Lett.** 137:1-8.

Oliveira GG, Silveira LH, Itano EN, Soares RM, Freire RL, Watanabe MA, Camargo ZP, Ono MA. (2011). Serological evidence of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in chickens from Paraná and Mato Grosso do Sul states, Brazil. **Mycopathologia.** 2011; 171:197-202.

Paniago AM, Aguiar ES, da Cunha RV, Pereira GR, Londero AT, Wanke B. (2003). Paracoccidioidomycose: estudo clínico e epidemiológico de 422 casos observados no Estado de Mato Grosso do Sul. **Rev Soc Bras Med Trop.** 36(4):455-9.

Parente AF, Borges CL, Bailao AM, Sousa MV, Ricart CA, Winters MS, Soares CMA. (2011). Proteomic analysis reveals that iron availability alters the metabolic status of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **PLoS One.** 6(7):e22810.

Parnell JJ, Callister SJ, Rompato G, Nicora CD, Paša-Tolić L, Williamson A, Pfrender ME. (2011). Time-course analysis of the *Shewanella amazonensis* SB2B proteome in response to sodium chloride shock. **Sci Rep.** 1:25-32.

Patergnani S, Suski JM, Agnoletto C, Bononi A, Bonora M, De Marchi E, Giorgi C, Marchi S, Missiroli S, Poletti F, Rimessi A, Duszynski J, Wieckowski MR, Pinton P. (2011). Calcium signaling around Mitochondria Associated Membranes (MAMs). **Cell Commun Signal.** 9:19.

Pigosso LL, Parente AF, Coelho AS, Silva LP, Borges CL, Bailao AM, Soares CMA. (2013). Comparative proteomics in the genus *Paracoccidioides*. **Fungal Genet Biol.** 60: 87-100.

Pinzan CF, Ruas LP, Casabona-Fortunato AS, Carvalho FC, Roque-Barreira MC. (2010). Immunological basis for the gender differences in murine *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **PloS one.** 5(5):e10757.

Pitarch A, Sánchez M, Nombela C, Gil C. (2003). Analysis of the *Candida albicans* proteome. I. Strategies and applications. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.** 787(1):101-28.

Posadas A. (1892). Un Nuevo caso de micosis fungoidea con psorospermias. **Ann Cir Med Argent.** 15:585-97.

Posas F, Chambers JR, Heyman JA, Hoeffler JP, de Nadal E, Arino J. (2000). The transcriptional response of yeast to saline stress. **J. Biol. Chem.** 275:17249–55.
Queiroz-Telles F. (1994). *Paracoccidioides brasiliensis* ultrastructural Windings. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G. (1994). *Paracoccidioidomycosis*. London, **CRC Press:** 27–44.

- Restrepo A. (1985). The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **Sabouraudia**. 23(5): 323-34.
- Restrepo-Moreno A. (2003). Paracoccidioidomycosis. *In*: Dismukes WE, Pappas PG, Sobel JD. Clinical Mycology. New York, **Oxford University Press**. 328–45.
- Rezende TC, Borges CL, Magalhaes AD, de Sousa MV, Ricart CA, Bailao AM, Soares CM. (2011). A quantitative view of the morphological phases of *Paracoccidioides brasiliensis* using proteomics. **J Proteomics**. 75(2):572-87
- Ricci G, Mota FT, Wakamatsu A, Serafim RC, Borra RC, Franco M. (2004). Canine paracoccidioidomycosis. **Med Mycol**. 42(4):379-83.
- Rodriguez-Manzanique MT, Ros J, Cabisco E, Sorribas A, Herrero E. (1999). Grx5 glutaredoxin plays a central role in protection against protein oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Cell Biol**. 19(12):8180-90.
- Romani L. (1997). The T cell response against fungal infections. **Curr Opin Immunol**. 9(4):484-90.
- Salgado-Salazar C, Jones LR, Restrepo A, McEwen JG. (2010). The human fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* (Onygenales: Ajellomycetaceae) is a complex of two species: phylogenetic evidence from five mitochondrial markers. **Cladistics** 26, 613–624.
- San-Blas G, Niño-Vega G, Iturriaga T. (2002). *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Med Mycol**. 40(3):225-42.
- Sano A, Nishimura K, Miyaji M. (1999). The Research Encouragement Award. Effects of sex hormones on sexual difference of experimental paracoccidioidomycosis. **Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi**. 40(1):1-8.
- Schaber J, Adrover MA, Eriksson E, Pelet S, Petelenz-Kurdziel E, Klein D, Posas F, Goksör M, Peter M, Hohmann S, Klipp E. (2010). Biophysical properties of *Saccharomyces cerevisiae* and their relationship with HOG pathway activation. **Eur Biophys J**. 39(11):1547–56.
- Schaber J, Baltanas R, Bush A, Klipp E, Colman-Lerner A. (2012). Modelling reveals novel roles of two parallel signalling pathways and homeostatic feedbacks in yeast. **Mol Systems Biol**. 8:622.
- Seneviratne CJ, Wang Y, Jin L, Abiko Y, Samaranayake LP. (2010). Proteomics of drug resistance in *Candida glabrata* biofilms. **Proteomics**. 10(7):1444-54.
- Shankar J, Restrepo A, Clemons KV, Stevens DA. (2011). Hormones and the resistance of women to paracoccidioidomycosis. **Clin Microbiol Rev**. 24(2): 296-313

Shikanai-Yasuda MA, Telles Filho FQ, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML. (2006). Guidelines in paracoccidioidomycosis. **Rev Soc Bras Med Trop.** 39(3):297-310.

Silveira LH, Paes RCS, Medeiros EV, Itano EN, Camargo ZP, Ono MA. (2008). Occurrence of antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis* in dairy cattle from Mato Grosso do Sul, Brasil. **Mycopathologia.** 165(6):367-71.

Soufi B, Kelstrup CD, Stoehr G, Frohlich F, Walther TC, Olsen JV. (2009). Global analysis of the yeast osmotic stress response by quantitative proteomics. **Mol. Biosyst.** 5: 1337-46.

Ström K, Schnürer J, Melin P. (2005). Co-cultivation of antifungal *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 and *Aspergillus nidulans*, evaluation of effects on fungal growth and protein expression. **FEMS Microbiol Lett.** 246(1):119-24.

Teixeira MM, Theodoro RC, de Carvalho MJ, Fernandes L, Paes HC, Hahn RC, Mendoza L, Bagagli E, San-Blas G, Felipe MS. (2009). Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Mol Phylogenet Evol** 52(2): 273-83.

Theodoro RC, Candeias JM, Araujo JP Jr, Bosco Sde M, Macoris SA, Padula LO, Franco M, Bagagli E. (2005). Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. **Med Mycol.** 43(8):725-9.

Thome PE. (2007). Cell wall involvement in the glycerol response to high osmolarity in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. **Antonie Van Leeuwenhoek.** 91: 229-35.

Tumbarello M, Posteraro B, Trecarichi EM, Fiori B, Rossi M, Porta R, de Gaetano Donati K, La Sorda M, Spanu T, Fadda G, Cauda R, Sanguinetti M. (2007). Biofilm production by *Candida* species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. **J Clin Microbiol.** 45(6):1843-50.

Wang S, Cao J, Liu X, Hu H, Shi J, Zhang S, Keller NP, Lu L. (2012). Putative calcium channels CchA and MidA play the important roles in conidiation, hyphal polarity and cell wall components in *Aspergillus nidulans*. **PLoS ONE.** 7(10): e46564.

Weber SS, Parente AFA, Parente JA, Borges CL, Bailao AM, Soares CMA. (2012). Proteomic analysis of released proteins by *Paracoccidioides* yeast cells and mycelia. **PlosOne.** 7(12):e52470.

Winters MS, Spellman DS, Chan Q, Gomez FJ, Hernandez M, Catron B, Smulian AG, Neubert TA, Deepe GS Jr. (2008). *Histoplasma capsulatum* proteome response to decreased iron availability. **Proteome Sci.** 6:36.

Wolfe DM, Pearce DA. (2006). Channeling studies in yeast: yeast as a model for channelopathies? **Neuromolecular Med.** 8(3):279–306.

Wormley F, Heinrich G, Miller J, Perfect J, Cox G. (2005). Identification and characterization of an *SKN7* homologue in *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.** 73: 5022-30

Yuzyuk T, Foehr M, Amberg DC. (2002). The MEK kinase Ssk2p promotes actin cytoskeleton recovery after osmotic stress. **Mol Biol Cell.** 13(8):2869-80.