



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DAS
RELAÇÕES PARASITO-HOSPEDEIRO**

André Luís Elias Moreira

**Análises proteômicas de conídios do fungo patogênico
humano *Paracoccidioides* sp**

**Goiânia
2014**

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) 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), 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

| | | | | | |
|--|--|-----|------------------------------|--------------|------------------|
| Autor (a): | André Luís Elias Moreira | | | | |
| E-mail: | andre.bio.br@hotmail.com | | | | |
| Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? | <input checked="" type="checkbox"/> Sim | | <input type="checkbox"/> Não | | |
| Vínculo empregatício do autor | | | | | |
| Agência de fomento: | Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior | | | Sigla: CAPES | |
| País: | Brasil | UF: | GO | CNPJ: | 00889834/0001-08 |
| Título: | Análises proteômicas de conídios do fungo patogênico humano <i>Paracoccidioides</i> sp | | | | |
| Palavras-chave: | <i>Paracoccidioides</i> , conídio, proteoma | | | | |
| Título em outra língua: | Proteomic analysis of conidia of human pathogenic fungus <i>Paracoccidioides</i> sp | | | | |
| Palavras-chave em outra língua: | <i>Paracoccidioides</i> , conidia, proteome | | | | |
| Área de concentração: | Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro - microbiologia | | | | |
| Data defesa: (dd/mm/aaaa) | 22/08/2014 | | | | |
| Programa de Pós-Graduação: | Biologia da relação parasito-hospedeiro | | | | |
| Orientador (a): | Dr. Clayton Luiz Borges | | | | |
| E-mail: | clbluiz2@gmail.com | | | | |
| Co-orientador (a):* | Alexandre Melo Bailão | | | | |
| E-mail: | alexandrebailao@gmail.com | | | | |

*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

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 ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Assinatura do (a) autor (a)

Data: ____ / ____ / ____

André Luís Elias Moreira

Análises proteômicas de conídios do fungo patogênico humano *Paracoccidioides* sp

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia das Relações Parasito-Hospedeiro da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Mestre.

Orientador: Dr Clayton Luiz Borges

**Goiânia
2014**

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

Moreira, André Luís Elias

Análises proteômicas de conídios do fungo patogênico humano *Paracoccidioides* sp [manuscrito] / André Luís Elias Moreira, Orville Hernandez Ruiz, Célia Maria de Almeida Soares. - 2014.
XCVII, 97 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Clayton Luiz Borges; co-orientador Dr. Alexandre Melo Bailão.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, Goiânia, 2014.

Bibliografia. Anexos. Apêndice.

Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. *Paracoccidioides* sp. 2. conídio. 3. proteoma. I. Hernandez Ruiz, Orville . II. Maria de Almeida Soares, Célia. III. Luiz Borges, Clayton , orient. IV. Melo Bailão, Alexandre, co-orient. V. Título.

CDU 575

**Programa de Pós-Graduação em Biologia das Relações Parasito-
Hospedeiro da Universidade Federal de Goiás**

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno (a): André Luís Elias Moreira

Orientador (a): Dr Clayton Luiz Borges

Membros:

1. Dr. Clayton Luiz Borges – Universidade Federal de Goiás (UFG)

2. Dr. Alexandre Melo Bailão – Universidade Federal de Goiás (UFG)

**3. Dr^a. Ana Flávia Alves Parente – Universidade Federal do Amazonas
(UFAM)**

4. Dr^a. Patrícia de Souza Lima – Universidade Federal de Goiás (UFG)

5. Dr. Wesley de Almeida Brito – Universidade Estadual de Goiás (UEG)

6. Dr^a. Luciana Casaletti – Universidade Federal de Goiás (UFG)

Data: 22/08/2014

Dedico à:

Meus pais, Osmar e Izabel, pelo suporte e por sempre acreditarem no meu sonho.

Ao meu irmão Carlos Eduardo, por ser sempre essa pessoa maravilhosa.

À todos da minha família, pela compreensão durante as minhas ausências nas reuniões de família e nunca me julgarem por isso.

À minha namorada Pollyana, por sempre estar comigo nas horas que mais precisei

Aos meus amigos verdadeiros, que sempre estiveram comigo em momentos tristes e felizes.

Ao professor Dr Clayton Luiz Borges, pela oportunidade de ser seu aprendiz e crescer profissionalmente.

Quando você cresce, você tende a acreditar
que o mundo é o que é, que sua vida
é apenas viver dentro desse mundo
e tentar não esmurrar muito as paredes.

Mas essa é uma vida muito limitada,
a vida pode ser muito mais.

Assim que você descobre um simples fato,
esse fato é que tudo ao seu redor, que você chama de vida foi
inventado por pessoas que não são mais inteligentes que você,
e que você pode mudar, influenciar tudo,
pode construir suas próprias coisas que os outros poderão usar.

É só esquecer essa ideia equivocada de que a vida
está aí e que você só vai passar por ela em vez de agarrá-la,
modificá-la, incrementá-la, deixar sua marca nela,
quando aprender isso, você nunca mais será o mesmo!

Steve Jobs

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me resgatar do mundo e me ajudar nos momentos difíceis e sempre me apoiar nas conquistas e batalhas que enfrentei até hoje. Por ter me dado forças e proteção divina durante as idas diárias para o serviço. E principalmente, por me ensinar que o sentimento mais importante da vida é amar o meu próximo como a mim mesmo.

À minha família por acreditar em mim e me apoiar nas minhas decisões e principalmente aos meus pais, por me darem a maior atenção do mundo e por sempre me apoiarem com os meus estudos e em minha “empreitada” (Muito Obrigado Pai e Mãe por me darem a vida e por fazer ela mais feliz a cada dia que passa, amo vocês). Agradeço a minha namorada Pollyana pelo companheirismo, pelo carinho e por ficar sempre ao meu lado me ajudando nas horas mais difíceis me dando forças.

Obrigado Prof. Dr. Clayton Luiz Borges por ter me aceito como seu aluno. Agradeço por continuar acreditando em mim mesmo sabendo das minhas dificuldades, e por ter me orientando em meu trabalho. Obrigado por ser essa pessoa atenciosa e por ter me aconselhado nos momentos difíceis que enfrentei durante o tempo. Com sabedoria sempre soube extrair o melhor de cada um de seus amigos e alunos. O senhor é um dos poucos homens que conheci que tem esse espírito de vencedor, de um homem de honra. Sinto orgulho de ser seu aluno. Obrigado mesmo professor Clayton.

Obrigado a Prof^a Célia Maria De Almeida Soares, por possibilitar um excelente ambiente de trabalho e fornecer os utensílios para o andamento do laboratório. Tenho admiração pela sua liderança.

Obrigado ao Luiz Paulo por me ajudar em alguns aspectos no meu trabalho, sempre com muita paciência e amizade. Ao Leandro do Prado, pela

maravilhosa amizade, aprendi muito com você. Ao Zairo por sempre acreditar no meu potencial e pela bela amizade que ele me proporciona. Ao Gabriel pelo companheirismo durante as nossas viagens aos congressos da vida, e pela excelente amizade que tem me proporcionado. Ao Igor Godinho, por me fazer rir e pela belíssima amizade. Ao Lucas Nojosa, por ser essa pessoa incrível e ter uma presença muito forte. Agradeço a Vanessa, por ter me dado forças, por me ajudar no momentos mais difíceis do meu mestrado e por ser essa pessoa maravilhosa. Muito obrigado amigos! Vocês são muito especiais para mim.

Muito obrigada também a cada um dos amigos do LBM. Em especial a Sheyla Bonfim por me apresentar o laboratório e por ter tido a disposição de me orientar quando eu não conhecia praticamente ninguém. Por sempre ter sido atenciosa e por sempre acreditar em mim. Obrigado Sheyla.

A todos do grupo: Alessandro, Alex, Alexandre, Amanda, Ana Flávia, Carla, Daciene, Danielle, Edilânia, Elisa, Fabiana, Juliana DeCurcio, Juliana Parente, Laura, Laurine, Leandro Rodrigues, Lílian Baeza, Lívia, Lucas Nojosa, Lucas Oliveira, Luciana, Marielle, Mariana, Mirelle, Neto, Isabella, Bianca, Guilherme, Diandra, Janaina, Paula, Paulo Henrique, Patrícia Lima, Renata, Silvia, Symone Vitoriano, Kleber, Deise, Simone Weber, Tereza Cristina, Thatyany Gama, Lanah, vocês tornaram tudo isso mais feliz e prazeroso! E aos amigos da Colômbia, Orville e suas alunas, Angela e Diana. A convivência com vocês foi uma experiência muito importante pra mim.

Agradeço à CAPES pela concessão da bolsa de estudo, pois sem ela seria tudo mais difícil. Agradeço a FAPEG pelo apoio financeiro que foi de grande ajuda para o desenvolvimento deste trabalho, e agradeço, principalmente, ao Programa de Pós-graduação em Biologia da Relação Parasito Hospedeiro (IPTSP) e à Universidade Federal de Goiás pela oportunidade de formação profissional.

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| SUMÁRIO | ix |
| TABELAS, FIGURAS E ANEXOS | xi |
| SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS | xiii |
| RESUMO | xiv |
| ABSTRACT | xv |
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1. O fungo termodimórfico <i>Paracoccidioides</i> spp. | 1 |
| 1.2. Classificação taxonômica de <i>Paracoccidioides</i> spp | 2 |
| 1.3. Habitat de <i>Paracoccidioides</i> spp | 4 |
| 1.4. Aspectos gerais da Paracoccidioidomicose | 5 |
| 1.5. Aspectos epidemiológicos da paracoccidioidomicose | 7 |
| 1.6. Conídios: A forma de propagação de <i>Paracoccidioides</i> spp. | 10 |
| 1.7. As análises proteômicas | 12 |
| 1.8. A proteômica aplicada à fungos | 14 |
| 2. JUSTIFICATIVA | 19 |
| 3. OBJETIVOS | 20 |
| 3.1. Geral | 20 |
| 3.2. Específicos | 20 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 21 |
| 4.1. Isolado e manutenção de <i>Paracoccidioides</i> | 21 |
| 4.2. Obtenção de células na fase exponencial de crescimento | 21 |
| 4.3. Produção e purificação de conídios | 22 |
| 4.4. Preparação dos extratos proteicos de conídios de <i>Paracoccidioides</i> | 22 |
| 4.5. Verificação da integridade do extrato proteico | 23 |
| 4.6. Digestão trípica dos extratos proteicos | 23 |
| 4.7. Análise de dados por <i>NanoUPLC-MS^E</i> e processamento de dados | 24 |
| 4.8. Análises Bioinformática | 25 |
| 5. RESULTADOS | 27 |
| 5.1. Produção de conídios de <i>Paracoccidioides</i> sp, isolado 01 | 27 |
| 5.2. Purificação dos conídios de <i>Paracoccidioides</i> sp, isolado 01 | 28 |
| 5.3. Perfil qualitativo das proteínas de conídios de <i>Paracoccidioides</i> sp, isolado 01 | 28 |
| 5.4. Perfil qualitativo das análises proteômicas | 29 |

| | | |
|-------|---|----|
| 5.5. | Classificação funcional das proteínas de conídios de <i>Paracoccidioides</i> sp, isolado 01..... | 30 |
| 5.6. | Predição de localização subcelular das proteínas de conídios de <i>Paracoccidioides</i> sp, isolado 01 | 42 |
| 5.7. | Predição de proteínas secretadas em conídios de <i>Paracoccidioides</i> sp, isolado 01..... | 43 |
| 5.8. | Predição de fatores de virulência em conídios de <i>Paracoccidioides</i> | 45 |
| 5.9. | Predição de adesinas presentes em conídios de <i>Paracoccidioides</i> sp, isolado 01..... | 47 |
| 5.10. | Abundância relativa das proteínas identificadas durante as análises proteômicas de conídios de <i>Paracoccidioides</i> sp, isolado 01 | 49 |
| 6. | DISCUSSÃO | 51 |
| 6.1. | Proteínas das vias de sinalização potencialmente relacionadas ao processos de transição dimórfica..... | 51 |
| 6.2. | Glicoproteínas preditas como adesinas encontradas na parede celular de conídios de <i>Paracoccidioides</i> | 53 |
| 6.3. | Proteínas de adesão para invasão das células hospedeiras..... | 54 |
| 6.4. | Proteínas relacionadas aos estresse oxidativo | 56 |
| 6.5. | Proteínas relacionadas aos estresse térmico | 57 |
| 6.6. | Conídios de <i>Paracoccidioides</i> sp, isolado 01 possuem grandes quantidades de proteínas ribossomais..... | 59 |
| 6.7. | Metabolismo em conídios | 60 |
| 7. | CONCLUSÕES | 62 |
| 8. | PERSPECTIVAS..... | 63 |
| 9. | ANEXOS..... | 64 |
| | REFERÊNCIAS | 66 |

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS

| | | |
|------------|--|----|
| Figura 1: | Aspectos morfológicos de <i>Paracoccidioides</i> spp.. | 2 |
| Figura 2: | Distribuição geográfica de espécies do gênero <i>Paracoccidioides</i> spp e espécie <i>Lacazia loboi</i> . | 8 |
| Figura 3: | Micrografia eletrônica do conídio de <i>Paracoccidioides</i> sp, isolado 01. | 10 |
| Figura 4: | Análise da produção de conídios de <i>Paracoccidioides</i> sp, isolado 01.... | 27 |
| Figura 5: | Conídios purificados de <i>Paracoccidioides</i> sp, isolado 01..... | 28 |
| Figura 6: | Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE dos extratos proteicos de conídios de <i>Paracoccidioides</i> sp, isolado 01..... | 29 |
| Figura 7: | Classificação Funcional das proteínas de conídios de <i>Paracoccidioides</i> sp, isolado 01..... | 41 |
| Figura 8: | Modelo metabólico de conídios de <i>Paracoccidioides</i> sp, isolado 01..... | 42 |
| Figura 9: | Análise <i>in silico</i> da distribuição das proteínas de conídios de <i>Paracoccidioides</i> sp, isolado 01 pela localização subcelular..... | 43 |
| Figura 10: | Classificação das proteínas preditas como secretadas durante o proteoma de conídios de <i>Paracoccidioides</i> sp, isolado 01..... | 44 |
| Figura 11: | Abundância relativa das proteínas identificadas durante as análises proteômicas de conídios de <i>Paracoccidioides</i> sp, isolado 01..... | 49 |
| Figura 12: | Abundância relativa das proteínas preditas como fatores de virulência durante as análises proteômicas de conídios de <i>Paracoccidioides</i> sp, isolado 01..... | 50 |
| Tabela 1: | Classificação funcional de proteínas de conídios de <i>Paracoccidioides</i> sp, isolado 01..... | 31 |
| Tabela 2: | Identificação de proteínas de conídios de <i>Paracoccidioides</i> sp, isolado 01 relacionadas a virulência..... | 46 |
| Tabela 3: | Proteínas identificadas durante o proteoma de conídios de <i>Paracoccidioides</i> sp, isolado 01 relacionadas à adesão..... | 48 |

| | | |
|--------------------------|---|----|
| Figura suplementar 1: | Faixa de detecção dinâmica das proteínas de conídios de <i>Pb01</i> | 64 |
| Figura suplementar 2: | Tipo de detecção dos peptídeos..... | 64 |
| Figura suplementar 3: | Análise de precisão na detecção de massa..... | 65 |

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

- (p/v):** peso por volume
2-DE: eletroforese bidimensional
ACN: acetonitrila
BSA: albumina do soro bovino
cAMP: adenosina monofosfato cíclico
DTT: ditioneitol
ECM: matriz extracelular
EDTA: ácido etilenodiaminotetracético
FA: formiato de amônio
fmol: femtomol
g/L: gramas por litro
GCPSR: reconhecimento de espécies filogenéticas pela concordância genealógica
GPI: glicosilfosfatidilinositol
HPLC-MS: cromatografia líquida de alta performance acoplada à espectrometria de massas
HSP: proteína de choque térmico
ITS: sequência espaçadora interna
kDa: kilodalton
KH₂HPO₄: fosfato de hidrogênio dipotássico
MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno
MET: microscopia eletrônica de transmissão
MS/MS: espectrometria de massas em tandem
MSE: Espectrometria de massas multiplexada
nanoUPLC-MS^E nano cromatografia líquida de ultra desempenho - espectrometro de massas
NCBI: Centro Nacional para Informação Biotecnológica
Nested-PCR: reação em cadeia da polimerase
NH₄HCO₃: bicarbonato de sódio
PBS: solução de tampão fosfato
pl: ponto isoelétrico
PLGs: protein lynx global server
rDNA: DNA ribossomal
RNA_m: RNA mensageiro
RNI: espécies reativas de nitrogênio
ROI: intermediários reativos de oxigênio
ROS: espécies reativas de oxigênio
SDS-PAGE: eletroforese em dodecil-sulfato de sódio em gel de poliacrilamida
TFA: ácido trifluoroacético

RESUMO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica causada pelo fungo termodimórfico *Paracoccidioides* spp.. A principal rota de infecção da PCM ocorre por inalação de conídios ou fragmentos de micélio. Até o momento, estudos proteômicos não foram realizados com conídios de *Paracoccidioides* sp. Neste sentido, caracterizar o proteoma do conídio poderá contribuir para o conhecimento detalhado das proteínas expressas durante a fase de propagação e seus potenciais papéis na virulência e patogenicidade, fornecendo prováveis alvos para estratégias antifúngicas. Para a produção de conídios, o micélio do isolado Pb01 (ATCC MYA-826) foi cultivado em meio ágar batata durante 90 dias a 18 °C. Após a produção, os conídios foram coletados e purificados. As proteínas foram extraídas e submetidas a digestão triptica com subsequente identificação por *NanoUPLC-MS^E*. Foram identificados um total de 242 proteínas de conídios de *Paracoccidioides*. As análises *in silico* foram utilizadas para caracterizar as proteínas presentes em conídios de *Paracoccidioides*. Proteínas como a GAPDH, enolase, triosefosfato isomerase e algumas glicoproteínas como ECM33 e β -1,3-glicosiltransferase Gel2 foram identificadas durante as análises. Algumas destas já foram descritas como adesinas em *Paracoccidioides* e em outros fungos patogênicos. Também foram identificadas proteínas relacionadas as vias de transdução de sinais, tais como: Ras GTPase, RhoA GTPase e calmodulina, descritas em outros fungos envolvidas em alterações morfológicas. Proteínas relacionadas à evasão, defesa e virulência do fungo, tais como HSP90, catalase B, peroxiredoxina mitocondrial Prx1, foram descritos com funções relacionadas a mudanças de temperatura ou estresse oxidativo proporcionado pelo ambiente hospedeiro, também foram identificados. Esses resultados demonstram que o conídio de *Paracoccidioides* contem proteínas que podem contribuir para sua manutenção no meio ambiente e possuem moléculas relacionadas a processos importantes necessários para os passos iniciais da infecção no hospedeiro.

Palavras-chave: *Paracoccidioides*, conídios, proteoma.

ABSTRACT

The paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic disease caused by the thermo dimorphic fungus *Paracoccidioides* spp.. The route of infection of the PCM occurs by the inhalation of conidia or mycelia fragments. Until now, no proteomic studies were performed with conidia of *Paracoccidioides* sp. In this sense, characterize the proteome of the conidia, may contribute to the detailed knowledge of the proteins expressed during the propagation phase and their potential roles in virulence and pathogenicity, providing possible targets for antifungal strategies. For the conidia production, the mycelia of isolate *Pb01* (ATCC MYA-826) were cultured in potato agar medium during 90 days at 18 °C. After production, the conidias were collected and purified. The proteins were extracted and subjected to tryptic digestion with subsequent identification by *NanoUPLC-MS^E*. We identified a total of 242 proteins of conidia of *Paracoccidioides*. The *in silico* analysis were used to characterize the proteins present in *Paracoccidioides* conidia. Proteins as GAPDH, enolase, triosephosphate isomerase, and some glycoproteins like ECM33 and β -1,3-glucanosyltransferase gel2 were identified during analysis. Some of these have been described as adhesins in *Paracoccidioides* and in other pathogenic fungi. Were also identified proteins related to signal transduction pathways, such as: Ras GTPase, RhoA GTPase and calmodulin, described in other fungi involved in morphologic changes. Proteins related to evasion, defense and virulence of the fungus, such as HSP90, catalase, mitochondrial peroxiredoxin Prx1, have been described with functions related to temperature shifts or oxidative stress provided by the host environment, were also identified. These results highlight that *Paracoccidioides* conidia contain proteins that can contribute to its maintenance in the environment and have molecules related to important processes necessary for the initial steps of infection in the host.

Keywords: *Paracoccidioides*, Conidia, Proteome

1 INTRODUÇÃO

1.1. O fungo termodimórfico *Paracoccidioides* spp.

O gênero *Paracoccidioides* compreende os agentes etiológicos da paracoccidioidomicose (PCM) (Matute et al. 2006; Teixeira et al. 2009). O fungo foi descrito por Adolpho Lutz em 1908, isolado de lesões orais e de linfonodo cervical no Instituto Biológico de São Paulo (Brasil), o qual foi descrito como agente etiológico da "*Hifoblastomicose pseudococcídica*". O termo "pseudococcídica" foi usado para reforçar as diferenças existentes entre o fungo recém-isolado e o agente causador da coccidioidomicose, também uma "hifoblastomicose", que designava todas as doenças causadas por fungos dimórficos (Lacaz 1994).

Inicialmente, o fungo foi denominado *Zymonema brasiliensis* por Splendore, em 1912. Em 1930, Floriano de Almeida propôs o nome *Paracoccidioides brasiliensis* quando o distinguiu o fungo do agente *Coccidioides immitis*, porém, a doença só foi reconhecida oficialmente como paracoccidioidomicose pela Organização Mundial de Saúde apenas em 1971 (Marques 1998).

Paracoccidioides spp são fungos que apresentam dimorfismo térmico. Os fungos dimórficos são caracterizados pela mudança da fase filamentosa multicelular para a unicelular. Algumas espécies como *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Emmonsia parva* e *Emmonsia crescens* são dessa família (Theodoro et al. 2012). Esse processo de transição dimórfica pode ser reproduzido *in vitro* a partir da mudança da temperatura de incubação do microrganismo, o que faz de *Paracoccidioides* um bom modelo para o estudo dos mecanismos moleculares envolvidos no dimorfismo (Rappleye & Goldman 2006; San-Blas 1985).

O fungo quando incubado *in vitro* à temperatura em torno de 36 °C ou alojados nos tecidos infectados do hospedeiro podem sofrer transição para

leveduras multinucleadas (Figura 1A) (McEwen et al. 1987). Macroscopicamente, a fase leveduriforme de *Paracoccidioides spp* é caracterizada por colônias rugosas, amareladas, de aspecto cerebriforme. Microscopicamente, são visualizadas células ovais ou esféricas de 2-30 µm de diâmetro, multinucleadas, apresentando paredes birrefringentes e espessas, aparentemente duplas e citoplasma contendo vacúolos de lipídeos. O diagnóstico baseia-se no achado de estruturas fúngicas com formato de "roda de leme" que refletem células-mães em brotamento múltiplos; neste caso, a célula central é circundada por várias células periféricas (Restrepo 1978).

Quando o *Paracoccidioides spp* é cultivado *in vitro* ou em condições ambientais onde as temperaturas variam em torno de 22 a 27 °C, o fungo cresce na forma miceliana (Figura 1B), apresentando-se macroscopicamente em colônias pequenas, irregulares, esbranquiçadas ou acastanhadas e, quando examinado ao microscópio de luz, apresenta hifas finas, hialinas e septadas (1-3 µm) com raros clamidósporos terminais ou intercalares e com vários núcleos (Franco et al. 1989; Queiroz-Telles 1994). Em condições de estresse, como baixas temperaturas ou falta/carência de nutrientes, o micélio pode transformar-se em conídios (Restrepo 1988).

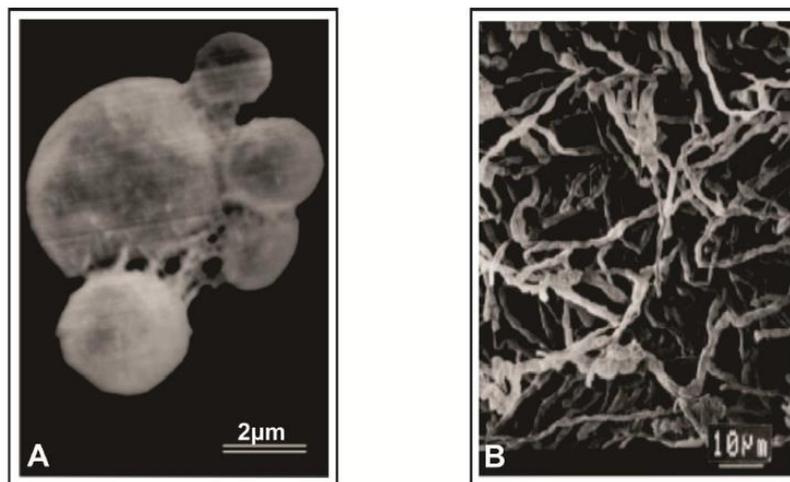


Figura 1: Aspectos morfológicos de *Paracoccidioides spp.* (A) Forma leveduriforme de *Paracoccidioides spp.*(Santos et al. 2007). (B) Forma miceliana de *Paracoccidioides spp.* (da Silva et al. 1999).

1.2. Classificação taxonômica de *Paracoccidioides spp*

A caracterização taxonômica de micro-organismos vem sendo aprimorada em paralelo ao avanço das técnicas moleculares. Através de

comparações filogenéticas entre fungos dimórficos das espécies Onygenaceae e dermatófitos das espécies Arthrodermataceae, foram utilizados para as análises a subunidade ribossomal 28S e rDNA, afim de propor a classificação de *Paracoccidioides* spp (Bialek et al. 2000; Leclerc et al. 1994). Nesse sentido, os fungos do gênero *Paracoccidioides* são classificados como um Ascomiceto (filo Ascomycota), subdivisão Euascomycotina, classe Plectomyceto, subclasse Euascomycetidae, ordem Onygenales, família Onygenaceae, subfamília Onygenaceae Anamórficos, gênero *Paracoccidioides*, espécie *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii* (Peterson & Sigler 1998; San-Blas et al. 2002; Teixeira et al. 2009).

Estudos filogenéticos realizados por Matute et al. (2006) utilizando abordagens moleculares baseadas em sequências de nucleotídeos de oito regiões de 5 genes em 65 isolados de *P. brasiliensis* foram analisados, permitindo a classificação dos mesmos em três espécies filogenéticas distintas: S1 (Espécie 1; 39 isolados), PS2 (Espécie filogenética 2; 6 isolados) e PS3 (Espécie filogenética 3; 21 isolados). A espécie filogenética PS3 está geograficamente restrita à Colômbia, enquanto S1 está distribuída no Brasil, Paraguai, Argentina, Peru e Venezuela. Alguns isolados da espécie filogenética PS2 foram encontrados no Brasil nos estados de São Paulo e Minas Gerais e ainda na Venezuela (Matute et al. 2006).

Posteriormente, Carrero et al. (2008), realizaram análises filogenéticas comparativas utilizando vários genes de 7 novos isolados e 14 isolados já estudados de *P. brasiliensis*, oriundos da Venezuela, Colômbia e Brasil, utilizando o método de comparação genealógica *GCPSR* (*Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition*). Com essas análises foi possível constatar que o isolado *Pb01* se distanciava de todos os outros isolados de *P. brasiliensis*. Este isolado separa-se claramente das três espécies filogenéticas descritas de *Paracoccidioides*, sugerindo a possibilidade de uma nova espécie (Carrero et al. 2008; Theodoro et al. 2008).

Buscando elucidar a classificação de *Pb01*, Teixeira et al., (2009) utilizaram o método de comparação genealógica *GCPSR* (*Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition*), para investigar as diferenças genômicas do *Pb01* como anteriormente descrito por Carrero et al. (2008). Foram utilizados 122 isolados de *Paracoccidioides*, onde foram analisadas as

características morfológicas das leveduras e conídios dos diferentes isolados, bem como sua filogenia. O estudo permitiu a identificação de um grupo com 17 isolados similares genotipicamente, e outro grupo que se distancia dos grupos já caracterizados filogeneticamente por outros autores já descritos anteriormente, tais como S1/PS2/PS3. Essa nova espécie filogenética foi denominada *Pb01-like*, e em homenagem ao micologista Adolfo Lutz foi sugerida o nome *Paracoccidioides lutzii* (Carrero et al. 2008).

Esta nova espécie é endêmica da região Centro-Oeste brasileira, mais especificamente dos estados de Goiás e Mato Grosso (Teixeira et al. 2009). Posteriormente à essas análises, o gênero *Paracoccidioides* foi dividido em duas espécies filogenéticas: *Paracoccidioides brasiliensis* (S1, PS2 e PS3) e *Paracoccidioides lutzii* (*Pb01-like*) (Bocca et al. 2013; Teixeira et al. 2009).

Alguns isolados do gênero *Paracoccidioides* (*Pb01*, *Pb03* e *Pb18*) possuem um genoma que variam entre 29,06 Mb a 32,94 Mb, podendo codificar de 7,610 a 8,139 genes. Essas variações genômicas podem refletir em fatores de virulência, adaptações ao estresse térmico, estresse oxidativo e nitrosativo e indução de respostas imunológicas no hospedeiro. Essas condições são essenciais para o processo de patogênese do fungo em que o complexo proteico citoplasmático e secretado são importantes nesse processo de estabelecimento da infecção (Desjardins et al. 2011).

1.3. Habitat de *Paracoccidioides* spp

A localização e as condições ambientais onde o fungo ocorre na natureza ainda não são completamente entendidas, embora, evidências apontem que o fungo sobreviva saprobioticamente em locais ricos em matéria orgânica, solos úmidos e com mínimas alterações de temperatura, onde o fungo poderia crescer sob forma miceliana (McEwen et al. 1995; Tercarioli et al. 2007).

O isolamento de *P. brasiliensis* já foi obtido de amostras do solo (De Albornoz 1971), fezes de morcego (*Artibeus lituratus*) (Grose & Tamsitt 1965), pinguins (*Pygoscelis adeliae*) (Gesuele, 1989), amostras comerciais de ração canina (Silva-Vergara et al. 1998), cachorros (Ricci et al., 2004; Farias et al.,

2005), solo, água e plantas (Restrepo et al. 2001) e em três espécies de tatus, *Dasypus novemcinctus* (Bagagli et al. 2003), *Cabassaus centralis* (Corredor et al. 2005) e *Dasypus septemcinctus* (Conti Dias 2007). A infecção por *P. brasiliensis* é frequentemente encontrada em tatus *Dasypus novemcinctus* onde o fungo já foi isolado em 75-100% dos animais capturados nas áreas endêmicas da doença. Acredita-se que este animal possa ser o hospedeiro silvestre do fungo, podendo desenvolver a doença (Bagagli et al. 2003).

A presença do fungo em mamíferos selvagens foram confirmadas através de *Nested-PCR* (reação em cadeia da polimerase), com base nas regiões ITS-5.8S-ITS2 (Richini-Pereira et al. 2008). Durante as análises, amplicons de DNA específicos de *P. brasiliensis* foram detectados em amostras de baço, pulmões, linfonodos mesentéricos, glândulas adrenais e rins de porcos-da-índia (*Cavia aperea*), nos pulmões de guaxinin (*Procyon cancrivorus*) e no fígado e pulmões de porco-espinho (*Sphiggurus spinosus*), assim como em vários órgãos de espécies de tatus (*Dasypus septemcinctus*), indicando que, em áreas endêmicas, é comum a infecção pelo fungo em animais selvagens (Richini-Pereira et al. 2008).

1.4. Aspectos gerais da Paracoccidioidomicose

A paracoccidioidomicose (PCM) anteriormente denominada como blastomicose sul americana é uma micose sistêmica causada por fungos do gênero *Paracoccidioides* (Catano & Aguirre 2013). Trata-se de uma doença sistêmica humana de origem pulmonar que pode afetar diferentes locais, como membranas, mucosas orais, pele, glândulas adrenais e o sistema retículo endotelial, envolvendo também órgãos como baço, fígado, gânglios linfáticos, medula óssea e tubos digestivos (Restrepo 1978).

A principal rota de infecção ocorre por inalação de fragmentos de micélio ou propágulos infectantes como conídios. Após penetrar nas vias aéreas superiores, esses propágulos chegam aos alvéolos pulmonares, onde, sob o estímulo da temperatura convertem-se para a fase leveduriforme podendo disseminar-se para diferentes órgãos e tecidos pelas vias hematogênica e/ou linfática do hospedeiro (Franco 1987). Essas mudanças morfológicas durante a

interação patógeno-hospedeiro requer um ajuste rápido e coordenado por parte do fungo, afim de manter sua sobrevivência e capacitá-lo a invadir as células do hospedeiro (San-Blas & Nino-Vega 2008; San-Blas et al. 2002).

Em condições de cultivo *in vitro*, as mudanças morfológicas em fungos termodimórficos podem ser reversíveis, sendo esta característica considerada uma forma de adaptação do fungo aos diversos ambientes aos quais estes podem estar submetidos. Além disso, a conversão da forma miceliana para forma leveduriforme é um pré-requisito para a progressão da infecção e o estabelecimento da paracoccidiodomicose no hospedeiro (San-Blas & Nino-Vega 2008; San-Blas et al. 2002). Após o processo de transição o estabelecimento do patógeno em tecidos hospedeiros pode resultar no processo infeccioso onde o fungo de fato irá estabelecer a doença, esse progresso da interação patógeno e hospedeiro vai depender da resposta do hospedeiro e da virulência do fungo (Franco et al. 1987).

O desenvolvimento da PCM pode ocorrer imediatamente ou levar anos para ser desencadeada após a infecção fúngica, manifestando-se sobre duas formas clínicas: forma aguda/juvenil e forma crônica, conforme a idade do hospedeiro e tempo de evolução da doença (Morejon et al. 2009).

A forma aguda e subaguda afeta ambos os sexos, predominantemente o sexo masculino e, principalmente, envolve o sistema retículo endotelial, envolvimento pulmonar e da mucosa oral, sendo a forma com pior prognóstico. Seu quadro clínico caracteriza-se por um desenvolvimento rápido e por marcante envolvimento de órgãos como fígado, baço, gânglios linfáticos e medula óssea (Brummer et al. 1993; Franco 1987), ocorrendo diminuição da imunidade celular, reações de hipersensibilidade do tipo retardado, aumento da proliferação sistêmica do fungo e altas taxas de mortalidade (Franco 1987). Essa forma é geralmente mais grave e se desenvolve mais rapidamente, afetando principalmente crianças, adolescentes e adultos jovens com até 35 anos de idade, representando 3 a 5% dos casos descritos, sendo a forma clínica menos frequente e tendo um período de incubação de semanas até meses (Barrozo et al. 2009; Restrepo 1985).

A manifestação clínica mais comum da PCM é a forma crônica, a qual afeta, principalmente, adultos do sexo masculino, em que fatores como condições de higiene, nutricionais e socioeconômicas são precários, dessa

forma facilitam o contato e a infecção pelo fungo patogênico (Franco 1987; Uribe et al. 1987). A forma crônica ou adulta representa mais de 90% dos casos. Ao contrário da forma aguda, o quadro clínico apresenta um desenvolvimento lento e pode levar meses ou anos para manifestar-se clinicamente, com comprometimento pulmonar evidente (Brummer et al. 1993). Nesses casos constata-se com frequência, o envolvimento de órgãos como: pele, mucosas das vias aéreas superiores, tubo digestivo e linfonodos. Na forma crônica disseminada, os sintomas variam, podendo ocorrer lesões na pele, nas mucosas orais e nasais e gânglios linfáticos e adrenais. Com uma frequência menor, podem ocorrer destruição óssea, envolvimento ocular e comprometimento dos sistemas nervoso e vascular (Rivitti & Aoki 1999).

Os sintomas da PCM são variáveis e diferentes manifestações clínicas da doença e da ocorrência de infecções assintomáticas no hospedeiro podem estar relacionados a idade, sexo e condições imunológicas bem como da virulência do agente infeccioso (Franco et al. 1993). Por conseguinte, quando os pacientes são diagnosticados e tratados, as lesões pulmonares já estão bem estabelecidas, apresentando diferentes estágios de desenvolvimento (Machado & Teixeira 1965; Restrepo et al. 2008).

1.5. Aspectos epidemiológicos da paracoccidioidomicose

A PCM é uma micose endêmica da América Latina e está geograficamente confinada em países como Argentina, Colômbia, Venezuela e, especialmente, no Brasil, onde é a causa mais prevalente de morte entre micoses sistêmicas não associadas à AIDS (Prado et al. 2009; Restrepo 1978; Restrepo et al. 2008).

No Brasil a maioria dos casos da doença estão localizados nos estados de São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás, Rio de Janeiro e Rondônia (Colombo et al. 2011; Ramos & Saraiva 2008)

Recentemente, Theodoro et al. (2012) construíram um mapa que demonstra a predominância (ou mesmo a exclusividade) de cada espécie do gênero *Paracoccidioides* na América do Sul (Figura 2). No Brasil, em áreas classificadas como endêmicas, presume-se que a incidência anual varia entre 1-3 casos por 100.000 habitantes (Coutinho et al. 2002; Lacaz et al. 2002) com o maior número de casos da doença (80%), seguido pela Venezuela e Colômbia (Brummer et al. 1993).

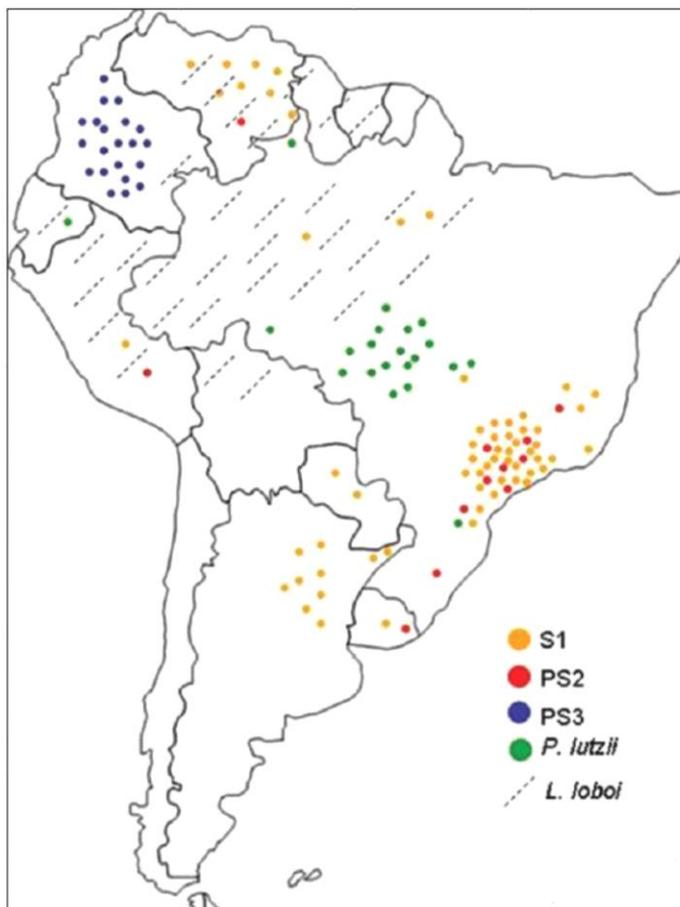


Figura 2: Distribuição geográfica de espécies do gênero *Paracoccidioides* spp e espécie *Lacazia loboi* (Theodoro et al. 2012)

Entre os anos de 1980 a 1995, a doença foi descrita como a oitava causa de mortalidade por doenças predominantemente crônica ou repetitiva, entre as infecciosas e parasitárias, e com a mais elevada taxa de mortalidade entre as micoses sistêmicas (Bagagli et al. 2006; Coutinho et al. 2002). A taxa de mortalidade média anual foi de, 1,45/milhão de habitantes, com maior frequência no estado de São Paulo (29,86 %), seguido por Paraná (14,52 %), Minas Gerais (12,51 %), Rio Grande do Sul (8,80 %) e Rio de Janeiro (7,92 %) (Coutinho et al. 2002).

Nas últimas décadas ocorreram muitas alterações na distribuição geográfica e na frequência da doença, chegando a atingir indivíduos presentes em estados da região Norte do Brasil, como Rondônia (Vieira Gde et al. 2014) e Amazônia (Marques-da-Silva et al. 2012). É possível que o contato intenso com atividades referentes à agropecuária sejam a causa do aumento da doença juntamente com a má qualidade de testes para diagnósticos da doença (Shikanai-Yasuda et al. 2006).

Através de análises de dados epidemiológicos, é possível constatar que a incidência da doença é similar em ambos os sexos até os 12 anos de idade, no entanto, nos anos subsequentes, o número aumenta progressivamente em homens (Marques 1998). Cerca de 80% a 90% dos indivíduos afetados possuem idade entre 29 e 40 anos, predominantemente trabalhadores de áreas rurais. Segundo dados do Ministério da Saúde em 2005, a PCM foi verificada com maior frequência em homens do que em mulheres, em uma relação média de 11:1 nas áreas endêmicas (Fagundes-Pereyra et al. 2006; Ramos & Saraiva 2008; Restrepo et al. 2008).

A predominância da doença entre o sexo masculino pode ser justificada pela ausência do hormônio feminino 17- β -estradiol presente somente em mulheres em período fértil (Restrepo et al. 1984; Sano et al. 1999). A presença do hormônio 17 β -estradiol confere uma resistência natural à infecção por este patógeno, devido ao fato da transição morfológica das fases de micélio para levedura serem inibidas na presença deste hormônio (Shankar et al. 2011).

A maior incidência de casos da doença são observados em trabalhadores das zonas rurais (Ramos & Saraiva 2008). Neste contexto, Espunhardi et al. (2010) verificaram que 86% dos pacientes estudados habitavam a zona rural e 14% moravam em zonas urbanas, no entanto, possuíam um histórico no qual já residiram ou tiveram contato com a zona rural. Acredita-se que o manejo da terra, realizado por homens na maioria das propriedades rurais, permitiram a esses trabalhadores o contato com propágulos infectantes do fungo aumentando a incidência da doença nesta população (Brummer et al. 1993).

Outros casos autóctones já foram diagnosticados nos Estados Unidos da América e Ásia (Ajello & Polonelli 1985; Joseph et al. 1966). Também já foram descritos casos de PCM em áreas não endêmicas, como Holanda, onde o perfil

epidemiológico do paciente analisado sugira que a infecção tenha sido adquirida em visitas realizadas em décadas passadas ao continente da América do Sul (Van Damme et al. 2006).

1.6. Conídios: A forma de propagação de *Paracoccidioides* spp.

Os conídios e fragmentos de micélio são a forma de propagação e disseminação de *Paracoccidioides* spp (Figura 3). A produção de conídios assexuados pelo micélio ocorre quando o ambiente é pobre em fontes nutricionais, e em temperaturas em torno de 18 °C à 20 °C, nessas condições o fungo produz conídios. Entretanto, quando o fungo está em um ambiente rico nutricionalmente esse evento de transição de micélio para conídio torna-se raro (Lacaz et al. 1984; Rubinstein & Negróni 1981). Em condições *in vitro*, esses propágulos são produzidos após um longo período de incubação - 3 a 4 meses a temperatura ambiente - permanecendo aderidos ao micélio (Bustamante-Simon et al. 1985; Restrepo 1970).

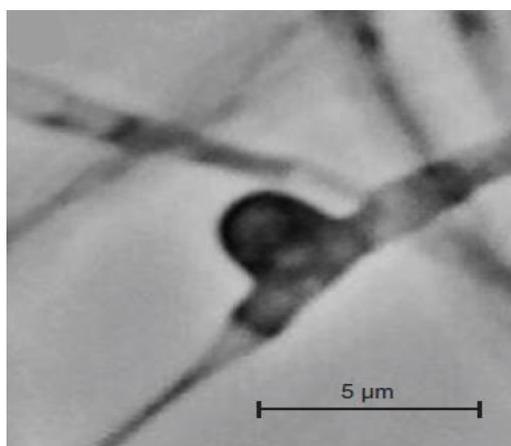


Figura 3: Micrografia eletrônica do conídio de *Paracoccidioides* sp, isolado 01 (Bocca et al. 2013).

Os primeiros relatos sobre a produção de propágulos por *P. brasiliensis* foram feitos em 1942 por Conant & Howell, pesquisadores americanos que realizavam um estudo comparativo entre os agentes da blastomicose americana, forma como a doença era denominada na época. Durante este estudo, notaram a presença de esporos laterais presentes no agente da doença Sul-Americana (Conant & Howell 1942). Em 1951, Neves e Bogliolo descreveram a produção de "aleurias" (esporos que nascem na região lateral ou terminal de uma célula conidiogênica) e através do cultivo do fungo em meio

de cultura sólido com farinha de milho, verificou-se que estes meios ricos em glicose eram inadequados para a produção desses propágulos (Neves & Bogliolo 1951).

Alguns anos depois, Borelli (1955) observou uma abundante produção de "aleurias" em microculturas preparados da mesma forma mencionada acima, e também em meios que continham farinha de feijão. Em 1961, Borelli descobriu que as amostras de solo e fezes de animais (sendo estes, meios pobres em nutrientes), após serem esterilizadas, permitiam a esporulação da fase miceliana de *P. brasiliensis* (Borelli 1961).

Em 1971, Pollak também conseguiu garantir o desenvolvimento de conídios em seus experimentos utilizando meios pobres em nutrientes. No entanto, foi Borelli quem descreveu mais detalhadamente a produção desses propágulos, questionando qual seria o papel dos conídios na reprodução e na dispersão de *P. brasiliensis* (Borelli 1961; Pollak 1971).

Em estudo realizado por Restrepo (1970) para verificar o crescimento da fase miceliana de *P. brasiliensis* em solo. Durante as análises, foi possível observar a produção de conídios em isolados colombianos. Na época, notou-se sua semelhança com arthroconídios intercalares e laterais produzidos por outros patógenos, como *Coccidioides immitis* (Cole & Sun 1985; Restrepo et al. 1969).

Posteriormente, foi descrito em mais detalhes as características dos conídios de *P. brasiliensis*. Em seguida, com vários isolados de *P. brasiliensis* de pacientes infectados, foram realizados experimentos em microculturas preparadas em meios pobres (ágar água, sais e dextrose), tentando reproduzir passo a passo o processo para o desenvolvimento dos conídios. No entanto, observou-se em alguns isolados do fungo após um período de 8 semanas de incubação a uma temperatura de 20 à 22 °C a presença de arthroconídios intercalares, que posteriormente deram origem a uma protuberância lateral ao micélio, que resultava na origem dos conídios. Através de análises microscópicas, observou-se que todos os conídios eram pequenos (menores que 5 µm). Essas observações permitiram comprovar o tamanho, a forma e a relação do conídio com o micélio parental (Bustamante-Simon et al. 1985).

Apesar dos avanços descritos anteriormente eram essenciais grandes produções dos propágulos para melhores análises, afim de compreender melhor o ciclo biológico do fungo. Após muitas tentativas, foi possível obter os

micélios e conídios em grandes quantidades, a partir de culturas do fungo em placas de Petri utilizando meios pobres em nutrientes e baixas temperatura, como já mencionados acima. Posteriormente a esses resultados, Restrepo et al. (1986) descreveram um método de liberação e separação dos conídios do micélio parental. A partir deste momento, foi possível trabalhar com conídios como unidades independentes (Restrepo et al. 1986).

Para confirmar se os conídios possuíam ou não dimorfismo térmico, os propágulos foram semeados em placas de Petri contendo meios ricos e submetidos a temperaturas de 20 à 22 °C e à 36 °C, acompanhados por observações periódicas. Em menos de 24 horas, os conídios que foram submetidos a temperatura de 22 °C apresentavam a formação de tubos germinativos, e após 96 horas, foi possível observar micélios septados e ramificados. Os conídios que foram incubados a 36 °C, após 132 horas, apresentaram um aspecto redondo, com múltiplos brotamentos, características estas da fase leveduriforme de *P. brasiliensis* (Restrepo et al. 1986).

Quando o conídio é inalado pelo hospedeiro, as células fúngicas alcançam os alvéolos pulmonares, estes propágulos interagem com células epiteliais e macrófagos alveolares. A brusca mudança de temperatura, ocasiona transição para a fase parasitária do fungo. No entanto, o desenvolvimento da doença depende da virulência, da estirpe fúngica e dos fatores relacionados ao hospedeiro, tais como sistema imune suprimido ou falta de disponibilidade nutricional (Brummer et al. 1993; McEwen et al. 1987).

1.7. As análises proteômicas

Inicialmente, o termo proteoma foi utilizado por Wilkins e William em 1995 com o propósito de descrever as proteínas que são expressas por um determinado genoma. Contudo, o termo proteômica tem sido definido como uma análise em grande escala de proteínas expressas por um genoma em um determinado tecido, célula ou organismo em uma condição específica (Wilkins et al. 1996).

Nos últimos anos, ferramentas proteômicas vem sendo utilizadas para análises de complexos proteicos, contribuindo assim para a caracterização de

uma enorme diversidade de proteínas presentes em vários organismos vivos (Rotilio et al. 2012).

Apesar de existirem algumas limitações, dado a interatividade, dinamismo e mudanças na conformação das proteínas, as técnicas proteômicas demonstram ser uma poderosa ferramenta devido seu alto poder de resolução e sensibilidade. Esta ferramenta pode ser utilizada para identificar estruturas proteicas e suas modificações pós-traducionais, verificar interações proteína-proteína, funções e também pode criar um mapa de interações entre as proteínas e o ambiente no qual a célula está sendo estudada (Graves & Haystead 2002; Rotilio et al. 2012).

Além disso, a proteômica permite avaliar parâmetros qualitativos e quantitativos de um grande número de proteínas que influenciam diretamente na bioquímica e na morfologia celular e, assim, proporcionam uma análise precisa da proteína celular, mudanças durante o crescimento, diferenciação e resposta a fatores ambientais (Bohmer et al. 2007; Kim et al. 2007, 2008; Wittmann-Liebold et al. 2006).

Muitas estratégias para estudos proteômicos vem sendo desenvolvidas ao longo de décadas. Com a introdução de aparelhos de cromatografia líquida de alta eficiência acoplados aos espectrômetros de massas, amostras complexas puderam ser analisadas de forma eficiente e com alta sensibilidade. (Mann et al. 2001). Devido a presença de centenas de proteínas, com diferentes pesos moleculares e diferentes níveis de abundância em uma única amostra, conduziram-se estudos buscando métodos mais adequados, com melhor especificidade na identificação das proteínas (Geromanos et al. 2009; Plumb et al. 2006).

Para analisar amostras complexas com alta confiabilidade, podem ser utilizadas ferramentas para detecção de íons precursores e seus fragmentos. Esse tipo de análise minimiza a ocorrência de falsa detecção das proteínas. A análise dos dados de forma independente, faz uma varredura alternando rapidamente a energia de colisão entre alta e baixa, várias vezes durante a análise em uma mesma corrida, para adquirir tanto os íons precursores, quanto seus fragmentos. Esse tipo de análise é conhecida como MS^E (Geromanos et al. 2009; Plumb et al. 2006).

Assim, os estudos proteômicos envolvem a caracterização de conjuntos de proteínas que estão relacionadas aos processos biológicos de uma espécie, onde em associação com ferramentas de bioinformática, tem como objetivo identificar e prever as funções das proteínas e, assim, fornece informações sobre a função dos genes anteriormente descritos pelos projetos genomas em *Paracoccidioides* spp.

1.8. A proteômica aplicada à fungos

Embora existam diversos genomas de fungos que já foram sequenciados, poucos estudos foram feitos comparando o perfil proteômico à análises transcricionais. Neste sentido, o grande objetivo na biologia de fungos é compreender a expressão, função e regulação de proteínas codificadas pelo genoma do fungo (Bhadoria et al. 2007). As análises proteômicas em fungos patogênicos, de uma certa forma, tem contribuído para a compreensão de processos envolvidos na morfogênese, virulência e respostas ao hospedeiro, atuando também no desenvolvimento de possíveis alvos para drogas antifúngicas e diagnósticos clínicos das doenças (Pitarch et al. 2003).

Após a era pós-genômica, os primeiros trabalhos em proteômica foram feitos com ancoradas de GPI (glicosilfosfatidilinositol) em *Aspergillus fumigatus* (Bruneau et al. 2001) e com proteínas de envelope em *Trichoderma reesei* (Lim et al. 2001). Desde então, vários trabalhos em proteômica têm sido produzidos e publicados.

Em (2013), Pigozzo et al. realizaram análises proteômicas comparativas entre isolados representantes das espécies filogenéticas do complexo *Paracoccidioides*. Foi possível elucidar que as leveduras de *Paracoccidioides* sp, isolado 01 (Pb01-like), utiliza preferencialmente a via anaeróbia da glicólise, produzindo etanol, enquanto que, *Paracoccidioides* Pb2 (PS2), apresenta altos índices de enzimas relacionadas ao metabolismo de aminoácidos, provavelmente, utilizados para obtenção de energia. Já nas leveduras de *Paracoccidioides* Pb339 (S1), a degradação aeróbia de ácidos graxos indica que essa via é utilizada preferencialmente para obtenção de energia, e em *Paracoccidioides* PbEpm83 (PS3), apresentou as vias degradação aeróbia de

moléculas relacionadas à glicose. Diferenças na expressão de moléculas antigênicas e na resposta ao estresse oxidativo foram encontradas nas formas leveduriformes entre as espécies do complexo *Paracoccidioides*, demonstrando que, mesmo dentro do gênero *Paracoccidioides* há distintos mecanismos de adaptação, principalmente quanto à obtenção de energia.

Em estudos feitos por Rezende et al. (2011) foram realizadas análises proteômicas em *P. brasiliensis* durante as diferentes fases morfológicas do fungo. As análises foram realizadas com o intuito de caracterizar proteínas que eram expressas durante as fases de micélio, transição de micélio para levedura e levedura. Foram identificadas um total de 100 proteínas, sendo 81 diferencialmente expressas, possibilitando classificar e identificar quais funções metabólicas as proteínas estavam relacionadas. Na fase miceliana as proteínas antioxidantes de defesa contra espécies reativas de oxigênio, como a peroxiredoxina mitocondrial (PRX1) e Mn Superóxido dismutase estavam abundantes. Durante a transição dimórfica foi possível observar o aumento de enzimas como a fosfoglicomutase, álcool desidrogenase e enolase, sendo estas importantes na contribuição da produção de ATP da via glicolítica. Na fase leveduriforme foram induzidas algumas enzimas da via glicolítica e a álcool desidrogenase, sugerindo que tanto a fermentação quanto a respiração aeróbica são presentes nessa fase. Desta forma, vias como glicólise, via das pentoses-fosfato, ciclo do glioxalato, metabolismo de carboidrato, defesa e virulência estavam induzidas em determinados estágios morfológicos do fungo demonstrando a adaptação e modulação do metabolismo as diferentes etapas de vida do fungo.

Trabalhos realizados em proteômica de conídios foram feitos por Teutschbein et al. (2010), onde foi empregado como metodologia o gel de eletroforese bidimensional (2D- PAGE) afim de identificar quais proteínas eram expressas em conídios em estágio de dormência e durante os estágios iniciais de contato com o hospedeiro de *Aspergillus fumigatus* e assim, propor um mapa proteômico de referência para esse organismo. Por meio da espectrometria de massas *MALDI-TOF*, foi possível identificar um total de 449 proteínas. Dentre estas, 57 proteínas eram exclusivas de conídios, sendo enzimas envolvidas na desintoxicação contra intermediários reativos de oxigênio (ROI), formação de pigmentos e na formação do tubo germinativo do

conídio em esporos de *A. fumigatus*, o que reflete provavelmente em resistência ao estresse. As enzimas piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase foram encontradas durante as análises, sugerindo um possível papel na fermentação alcoólica durante a dormência dos conídios ou no início da germinação (Teutschbein et al. 2010).

Em (2014), Lima et al. avaliaram o comportamento metabólico do *Paracoccidioides sp*, isolado 01 durante a ausência de fontes de carbono, sendo estes, um nutriente essencial não somente como fonte energética, mas também como precursoras de importantes moléculas para fungo. Foi possível demonstrar que o fungo consegue adaptar-se à condição de privação de carbono regulando vias de oxidação de lipídeos, glioxilato, ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e gliconeogênese como forma de adaptação a condição de estresse devido à falta de carbono. Observou-se também o aumento na expressão de proteínas de resposta ao estresse e transcritos envolvidos na degradação de proteínas, produção de etanol e formação de precursores que alimentam as vias metabólicas essenciais para o fluxo de carbono durante a adaptação do fungo a estas condições.

Em análises proteômicas realizadas por Weber et al. (2012) de proteínas extracelulares (secretoma) de *P. brasiliensis* permitiram descrever o perfil proteômico de micélio e levedura. Foram identificadas 30 e 24 proteínas diferencialmente expressas das fases miceliana e leveduriforme respectivamente. Ao investigar a função destas proteínas secretadas durante a interação com os macrófagos, utilizou-se a Brefeldina A, sendo este, um composto que inibe a interação entre o fungo e o macrófago. A adição do composto provocou a diminuição da quantidade de proteínas secretadas e bem como de leveduras internalização pelos macrófagos, reforçando a importância da secreção fúngica de *P. brasiliensis* na sobrevivência desse patógeno em células fagocíticas, bem como seu papel crucial na patogenicidade e virulência do fungo.

Para investigar proteínas envolvidas nas fases iniciais de germinação dos conídios de *Aspergillus nidulans*, Oh et al. (2010) utilizaram gel de eletroforese bidimensional (2D-PAGE) em conjunto com espectrometria de massas (MALDI-TOF). Foram avaliados os níveis de expressão proteica durante a fase inicial de germinação, o que permitiu a identificação de 241

proteínas através de gel 2D-PAGE e 57 proteínas através de *MALDI-TOF/MS*. Classificando funcionalmente as proteínas encontradas em banco de dados de domínios conservados, um total de 21, 13 e proteínas estavam associadas ao metabolismo da energia, síntese proteica e processo de dobramento da proteína, respectivamente. 8 proteínas envolvidas na desintoxicação de espécies reativas de oxigênio (ROS), incluindo catalase A, tioredoxina redutase e a mitocondrial peroxiredoxina. Esses dados, revelam que a fase inicial de germinação dos conídios de *A. nidulans* requer a expressão de proteínas relacionadas a transcrição de genes, síntese de novas proteínas, incluindo fator de iniciação eucariótica 4A, proteína da família TCTP, bem como, a expressão de proteínas relacionadas ao estresse térmico, principalmente *HSP70*, que em 30 minutos foi induzidas e *HSP88* que foi induzida em 60 minutos (Oh et al. 2010).

Em (2013), Parente et al. realizaram análises proteômicas em células leveduriformes de *P. brasiliensis* durante a privação de zinco, sendo este, um micronutriente essencial para a proliferação e patogenicidade do fungo. Durante as análises foi possível identificar 135 proteínas/isoformas que foram reguladas em resposta à depleção de zinco. Durante os experimentos observou-se o aumento na expressão de proteínas relacionadas ao estresse oxidativo, como principal modificação metabólica necessária à sua sobrevivência. Nesse sentido, as proteínas de estresse oxidativo tiveram sua expressão aumentada durante o tratamento, uma vez que, este mecanismo de adaptação ao estresse é importante para a sobrevivência de *P. brasiliensis* durante a privação de zinco.

Como demonstrado anteriormente, a análises proteômicas utilizadas são de grande importância para caracterização e identificação de proteínas de fungos patogênicos, uma vez que, foi possível demonstrar claramente as habilidades que os fungos utiliza durante os processos de estresse, falta ou carência de nutrientes, ou até mesmo durante os processos de interação patógeno-hospedeiro. Sendo assim, a caracterização do proteoma do conídio de *Paracoccidioides* sp, isolado 01, contribuirá para a compreensão da biologia do fungo ampliando o conhecimento das proteínas expressas durante a fase de propagação, bem como a identificação de prováveis alvos para estratégias antifúngicas.

Neste trabalho, utilizamos a técnica de cromatografia líquida de alta performance acoplado à espectrometria de massa como ferramentas proteômicas para a identificação de proteínas de conídios de *Pb01*.

2. JUSTIFICATIVA

Os fungos do gênero *Paracoccidioides* compreendem os agentes etiológicos da PCM, uma micose endêmica da América Latina confinada em países como Argentina, Colômbia, Venezuela e, especialmente no Brasil, onde é a causa mais prevalente de morte entre micoses sistêmicas não associadas à AIDS.

Atualmente, as infecções fúngicas vem contribuindo significativamente para a morbidade e a mortalidade humana. Estima-se que um milhão e meio de pessoas morram a cada ano vítimas de infecções fúngicas. Apesar disso, ainda existe um baixo investimento em pesquisa, tratamento e diagnóstico de doenças fúngicas. A incidência de doenças fúngicas sistêmicas tanto em indivíduos imunocomprometidos, quanto em indivíduos saudáveis vem demonstrando um padrão crescente em todo mundo nos últimos anos, convertendo doenças sistêmicas causadas por fungos em um importante campo de pesquisa médica. Na última década, estudos genômicos e proteômicos mostraram-se de grande importância para na caracterização e identificação de fatores de virulência fúngica, bem como, a descoberta de novas proteínas-alvo com papel relevante na biologia do organismo, tornando-se um ponto de partida para o conhecimento da patogênese desses microorganismos.

Neste sentido, caracterizar o proteoma do conídio de *Paracoccidioides* sp, isolado 01, contribuirá para a compreensão da biologia do fungo, bem como, a ampliação do conhecimento das proteínas expressas durante a fase de propagação e seus potenciais papéis na virulência e patogenicidade, fornecendo prováveis alvos para estratégias antifúngicas.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

O objetivo geral do presente projeto é a obtenção de conídios de *Paracoccidioides* sp, isolado 01 e caracterização do perfil das proteínas citoplasmáticas expressas por *Paracoccidioides* nessa forma de propagação.

3.2. Específicos

- Obtenção dos conídios de *Paracoccidioides* sp, isolado 01;
- Obter extrato proteico citoplasmático dos conídios;
- Identificar proteínas expressas em conídios de *Paracoccidioides* sp, isolado 01, utilizando a cromatografia líquida de alta performance acoplada à espectrometria de massas;
- Caracterizar o proteoma de conídios de *Paracoccidioides* sp, isolado 01;
- Realizar análises *in silico* das proteínas identificadas utilizando ferramentas bioinformáticas;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Isolado e manutenção de *Paracoccidioides*

Os experimentos foram realizados utilizando *Paracoccidioides* sp, isolado 01 (ATCC MYA-826) já caracterizado em nosso laboratório. Este foi utilizado durante todos experimentos do estudo. O fungo foi mantido em sua forma saprofítica (micélio) e foi cultivada e mantida *in vitro* durante 15 dias em meio sólido Fava-Netto (1955) em temperatura à 22 °C. Os componentes do meio sólido são os seguintes: 0,3% (p/v) proteose peptona, 1% (p/v) peptona, 0,5% (p/v) extrato de carne, 0,5% (p/v) extrato de levedura, 4% (p/v) glicose, 0,5% (p/v) NaCl, 1,4% (p/v) Ágar, pH 7,2.

4.2. Obtenção de células na fase exponencial de crescimento

Após quinze dias de cultivo da fase saprofítica (micélio) de *Paracoccidioides* em meio sólido Fava-Netto (1955), as células foram incubadas em meio Fava-Netto líquido (200 mL) durante 12 dias à 25 °C sob agitação de 120 rpm, para obtenção de células na fase exponencial de crescimento. Posteriormente, as células micelianas foram lavadas com tampão fosfato salina (PBS 1X) (0,14 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,8 mM KH₂HPO₄, 10 mM Na₂HPO₄, pH 7,3) e centrifugadas a 3.000 rpm por 10 min à 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi ressuspensionado em PBS 1X. As células foram incubadas em placas de Petri contendo meio Ágar batata (Infusão de batata 200 g/L, Dextrose 20 g/L, Ágar 15 g/L) (Restrepo & Jimenez 1980).

4.3. Produção e purificação de conídios

Para a produção de conídios foi utilizado o protocolo previamente descrito por Restrepo (1986) com algumas modificações. Os micélios foram cultivados em placas de Petri contendo meio Ágar batata a 18 °C. A produção de conídios foi observada e documentada no microscópio de fluorescência *Axio Scope A1 (Carl Zeiss AG, Germany)*, ao aumento de 400x. Após 12 semanas de incubação os conídios foram coletados das placas de Petri e purificados. Para a purificação, foi adicionado em cada placa 10 mL de solução salina 0,8%, *Tween 20 PLUS* 0,01% e 10 µg/µL de gentamicina. Com uma alça para esfregaço, os micélios foram raspados das placas de Petri e colocados em Erlenmeyers de 250 mL com 6 camadas de pérolas de vidro de 6 mm e agitados por 45 minutos a 150 rpm. Após o período de agitação, o líquido foi coletado utilizando uma pipeta e o material recuperado foi centrifugado a 3000 rpm. Foi desprezado o sobrenadante após a centrifugação e coletado o sedimento celular que foi submetido a 3 ciclos de sonicação de 30 segundos a 7 Hz, com intervalos de 15 segundos a 4 °C entre os ciclos. A purificação foi realizada passando 10 ml da solução contendo os conídios por seringas de 20 ml com 1g de lã de vidro (Merck # 4086) estéril, onde vestígios de micélio foram presos a lã de vidro. Os conídios coletados foram corados por azul de Trypan e analisados por meio de microscopia de luz sob aumento de 1.000x.

4.4. Preparação dos extratos proteicos de conídios de *Paracoccidioides*

Após a purificação, as células foram levadas a centrifugação por 10 min a 10.000 *g* e lavados três vezes com tampão fosfato salina (PBS 1X). Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e as células foram refrigeradas a 4 °C e colocadas em microtubos com igual volume de pérolas de vidro (0.45 mm). O material foi acrescido de tampão Tris-Cálcio (20 mM Tris-HCl, pH 8,8; 2 mM CaCl₂). As células foram submetidas à agitação vigorosa por 6 ciclos de 30 segundos no *Mini-Beadbeater-1 (Biospec Products®)* seguido por centrifugação a 10.000 *g* por 10 min à 4 °C. O teor de proteínas foi quantificado

através do método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando albumina do soro bovino (BSA) para construir a curva padrão.

4.5. Verificação da integridade do extrato proteico

Para a verificar a integridade do extrato proteico obtido, foi realizada a análise utilizando-se o gel unidimensional SDS-PAGE como descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). Trinta e cinco μg de extrato proteico foi preparado com tampão de amostra (Tris-HCl 0.2M, pH 6.8, SDS 40% (v/v), β -mercaptoetanol 2% (v/v) e traços de azul de bromofenol), e aquecidas a 100 °C por 8 minutos e posteriormente foram submetidas a eletroforese unidimensional SDS-PAGE 12%. Foi utilizado como referência o marcador de baixo peso molecular (*GE Healthcare*). Posteriormente o gel foi corado por prata como descrito por Oakley et al., (1980). A imagem digitalizada foi obtida utilizando o foto documentador *ImageQuant 300* (*GE Healthcare*).

4.6. Digestão trípica dos extratos proteicos

Foi obtido 260 μg de extrato proteico a partir dos conídios de *Paracoccidioides* sp, isolado 01. O extrato proteico foi concentrado até volume final de 50 μL em bicarbonato de amônio 50 mM (NH_4HCO_3) pH 8.5 e posteriormente submetido à digestão com tripsina conforme descrito previamente por Murad *et al.*, (2011) com algumas modificações. Inicialmente, foi adicionado ao extrato proteico 100 μL de solução de *RapiGest SF*TM 0,2% (v/v) (*Waters Corp, Milford, MA*) para cada 50 μg de proteínas, sendo *RapiGest* um agente surfactante que desfaz os complexos proteicos e expõe a cadeia primária das proteínas. A solução foi submetida à breve agitação utilizando Vórtex e foi incubada a 80 °C por 15 min. Foi adicionado 2,5 μL de dithiothreitol (DTT) (*GE Healthcare*) 100 mM, como agente redutor nas ligações dissulfeto presentes nas proteínas e o material foi incubado por 30 min à 60 °C. Em seguida, foi adicionado iodoacetamida (*GE Healthcare*) 300 mM, atuando como agente alquilante e o material foi mantido a temperatura ambiente por 30 min ao abrigo da luz. Posteriormente este período, foi adicionada 40 μL de solução

Promega trypsin (*Promega, Madison, USA*) a 50 mM NH_4HCO_3 e o material foi incubado a 37 °C por 16 h para ação enzimática. Após a digestão trípica, adicionou-se 40 μL de ácido trifluoroacético (TFA) (*Sigma-Aldrich*) 5% para hidrolisar o *Rapigest SF*TM, com incubação a 37 °C por 90 min. A amostra foi centrifugada a 10.000 x g a 6 °C por 30 min. e o sobrenadante contendo os peptídeos digeridos foram coletados. Os peptídeos digeridos foram secos no concentrador de amostras a vácuo e resuspendidos em 80 μL de formiato de amônio (FA) a 20 mM e 20 μL *MassPREP*TM *Digestion Standard* [*rabbit phosphorilase B* (PHB)] a 1.000 fmol/ μL , utilizado como padrão endógeno. A concentração final de PHB foi de 200 fmol/ μL e o volume final da amostra de 100 μL .

4.7. Análise de dados por NanoUPLC-MS^E e processamento de dados

A análise das amostras foi realizada por meio de cromatografia líquida de alta performance utilizando o sistema *nanoACQUITY*TM (*Waters Corporation, Manchester, UK*) acoplado ao espectrômetro de massas *Synapt MS*TM (*Waters-Micromass, Manchester, UK*). Alíquotas de 5 μg de amostra, em triplicata, foram separadas pelo sistema *nanoACQUITY*TM (*Waters Corporation Manchester, UK*) que possui duas colunas de fase reversa *in tandem*, cuja a metodologia utiliza concentrações graduais crescentes (10%, 14%, 16%, 20% e 65%) de acetonitrila (ACN) (*Sigma-Aldrich*) para a análise cromatográfica dos peptídios. Para a obtenção dos espectros de massas foi utilizado o espectrômetro de massas modelo *Synapt G1 HDMS*TM *mass spectrometer* (*Waters, Manchester, UK*), utilizando *nanoelectrospray* como fonte de ionização e dois analisadores - quadrupolo e tempo de voo (*nanoESI-Q-TOF, Waters*). [*Glu*¹]-*Fibrinopeptide B* (GFB) foi utilizado como padrão de massa para calibração sendo mensurada a cada 30 segundos. Os espectros de massa foram obtidos, processados e analisados utilizando o software *ProteinLynx Global Server* (PLGS) versão 2.4 (*Waters Corp, Milford, MA*). A identificação de proteínas foi realizada a partir do banco de dados genômico de *Paracoccidioides* (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/)

[Multihome.html](#)) utilizando algoritmos descritos em sequências randômicas. Foram utilizados os padrões de isotopização, deconvolução e centróide para análise de todos os peptídeos. Os parâmetros para identificação foram: a) número mínimo de íons fragmentados por peptídeos (2); b) número mínimo de íons fragmentados por proteína (5); c) número mínimo de peptídeos por proteína (1); d) massa máxima para proteína (600 kDa); e) enzima escolhida para digestão: tripsina; f) modificação fixa: carbamidometilação de resíduos de cisteína; g) modificações variáveis: oxidação da metionina e foforil STY; h) máximo de falso-positivo de 4%. A partir dos dados obtidos, foram determinadas a faixa de detecção dinâmica, precisão de identificação de massa, a fragmentação dos peptídeos e o número de peptídeos por proteína. Para tanto, foram utilizados os programas: *Spotfire®* (TIBCO Software Inc.©), *FBAT software* (Laird et al, 2000), *MassPivot* e *Microsoft Office Excel* (Microsoft©).

4.8. Análises Bioinformática

Os dados obtidos através de *NanoUPLC-MS^E* e processados pelo *PLGS* foram posteriormente submetidos a análises bioinformáticas. Proteínas preditas de conídios foram classificadas funcionalmente baseadas no *Functional Catalogue* (*FunCAT2*) acessados no banco de dados *MIPS* (<http://www.helmholtz-muenchen.de/en/ibis>). Para determinar a localização subcelular das proteínas de conídios, foram utilizados os softwares *WoLFPSORT* (<http://wolfpsort.seq.cbrc.jp/>) e *Euk_mPloc* 2.0 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/euk-multi-2/>). Para a adição do *Enzyme Code* (*EC*), as proteínas identificadas foram analisadas utilizando o banco de dados *KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (<http://www.genome.jp/kegg/>).

Para as análises de predição de secreção de proteínas por vias clássicas, foi utilizado o software *SignalP* 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Para analisar as proteínas secretadas por vias não-clássicas, foi utilizado o software *SecretomeP* 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>). Usando os métodos de predição,

uma pontuação que varia entre 0 e 1 foi designada para cada proteínas em que um valor maior ou igual a 0,5 foi considerado como indicativo de secreção.

Para análise de predição de adesinas, o *servidor web FungalRV* (<http://fungalrv.igib.res.in/>) foi empregado. Utilizando esta ferramenta para predição de adesinas, uma pontuação que varia entre 0 e 1 foi designada para cada proteína. Proteínas que apresentavam um valor maior ou igual a 0,511 foram preditas como adesinas (Chaudhuri et al. 2011).

5. RESULTADOS

5.1. Produção de conídios de *Paracoccidioides* sp, isolado 01

Células micelianas de *Paracoccidioides* sp, isolado 01, foram cultivadas em ágar batata e monitoradas por um período de 12 semanas a 18 °C ao abrigo da luz, como descrito por Restrepo et al. (1986). Após este período, os propágulos foram corados por azul de Trypan e analisados por microscopia de luz, como mostra a figura 4. No painel A, as células foram visualizadas ao aumento de 400x, e no painel B a imagem foi ampliada para demonstrar as células conidiais. Os conídios apresentam-se corados pelo azul de Trypan por estarem em estágio metabólico basal, o que dificulta a expulsão do corante das células conidiais, diferentemente de células com suas funções metabólicas normais, que expulsam o corante com maior facilidade (Schmit & Brody 1976).

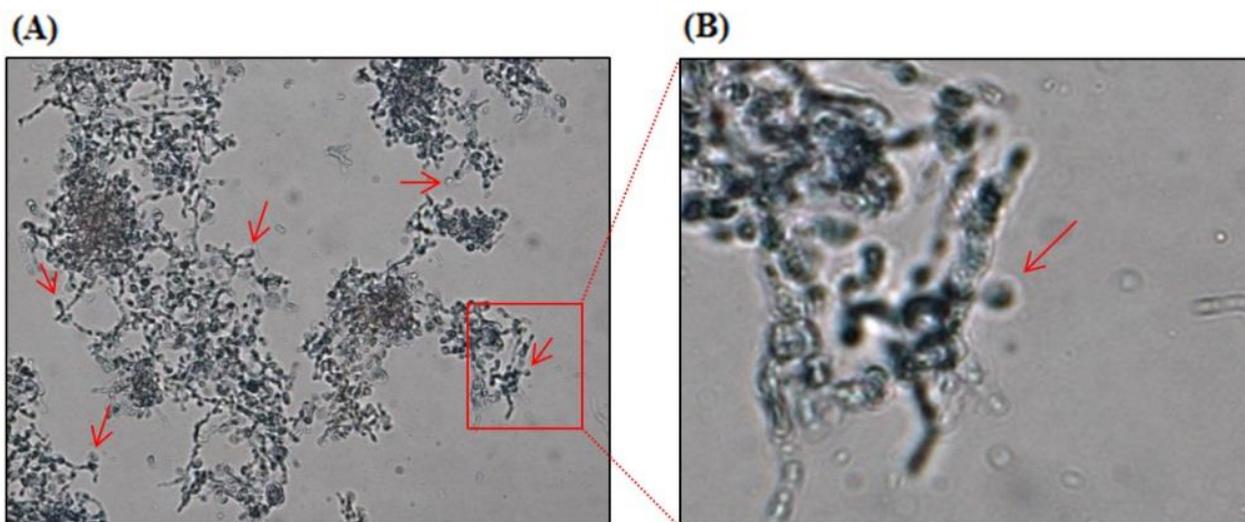


Figura 4: Análise da produção de conídios de *Paracoccidioides* sp, isolado 01. Após 12 semanas de incubação, a confirmação da produção de conídios foi realizada por meio de coloração por azul de Trypan e análise por microscopia de luz. No painel A, as setas em vermelho indicam os conídios produzidos. O painel B mostra a ampliação do painel A. Aumento de 400x em A.

5.2. Purificação dos conídios de *Paracoccidioides* sp, isolado 01

Após a coleta do complexo celular contendo micélio e conídio, foram realizadas etapas de purificação conforme descrito por Restrepo et al. (1986). Após a purificação, as células foram analisadas através de microscopia de luz. A figura 5 representa os conídios após a purificação sob ampliação de 1000x, demonstrando o aspecto morfológico já descrito em conídios.

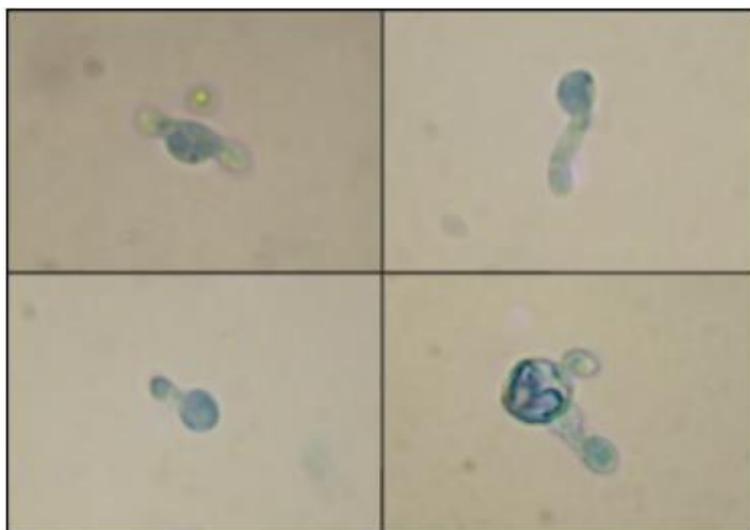


Figura 5: Conídios purificados de *Paracoccidioides* sp, isolado 01. A figura evidencia os conídios de *Paracoccidioides* sp, isolado 01, após o processo de purificação. Análise realizada através de microscopia de luz ao aumento de 1000x, corado por azul de Trypan. Conídios demonstrados nos quatro painéis.

5.3. Perfil qualitativo das proteínas de conídios de *Paracoccidioides* sp, isolado 01.

Após o processo de extração de proteínas, foi utilizado o *Kit 2-D Cleanup* (GE Healthcare, Sweden) para extração de contaminantes não proteicos. Para verificar a integridade dos extratos proteicos, as amostras foram analisadas em gel de eletroforese unidimensional SDS- PAGE (Figura 6). Foi possível a visualização das proteínas bem como um arraste que, segundo Gomez et al. (2001) provavelmente é devido à presença de melanina ou carboidratos advindos do processo de extração proteica de conídios.

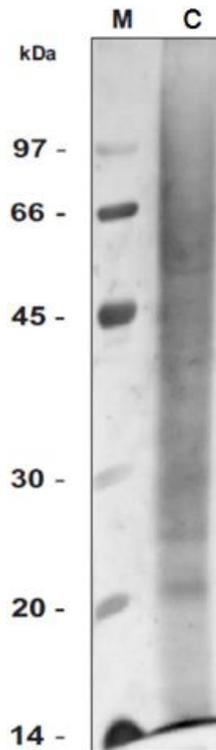


Figura 6: Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE dos extratos proteicos de conídios de *Paracoccidioides* sp, isolado 01. Perfil eletroforético de proteínas de conídios de *Paracoccidioides* sp, isolado 01 corados por prata. M: Marcador molecular de baixo peso-GE, coluna M. C: Extrato proteico bruto de conídio.

5.4. Perfil qualitativo das análises proteômicas

Após o processo de digestão proteica, a identificação dos peptídeos foram feitas através de *NanoUPLC-MS^E*, com posterior identificação das proteínas pelo processamento dos espectros pelo *PLGS*. Posteriormente, a obtenção dos dados das proteínas de conídios foram analisados utilizando o *software Spotfire Decision Site 8.0* para verificar a qualidade dos dados gerados por *NanoUPLC-MS^E* na identificação das proteínas.

Primeiramente, a taxa de falso positivo das proteínas de conídios de *Paracoccidioides* sp, isolado 01 foi 0,0%. Posteriormente, foi gerado o gráfico dinâmico de detecção da abundância de cada proteína- *Dynamic Range* que possui uma ordem de magnitude de 1 a 4 em escala logarítmica (Figura suplementar 1). Com o gráfico foi possível observar que a distribuição alcançou três ordens de magnitude, demonstrando uma faixa de detecção dinâmica aceitável.

Foram detectados 1.234 peptídeos onde um total de 10% dos peptídeos foram identificados com perda na clivagem pela tripsina e apresentam uma taxa de fragmentação na fonte de 10% (Figura suplementar 2). *PepFrag* 1 e 2 correspondem a mais de 75%, enquanto os dados de clivagens perdidas e fragmentação na fonte não ultrapassam 20% demonstrando a boa qualidade dos dados gerados.

A exatidão de massas da amostra de conídio representa 97,24% de peptídeos tripticos detectados em uma faixa de 15 ppm de erro (Figura suplementar 3). Juntos os dados mostram uma boa qualidade nas análises por *NanoUPLC-MS^E*.

5.5. Classificação funcional das proteínas de conídios de *Paracoccidioides* sp, isolado 01

Um total de 242 proteínas de conídios de *Paracoccidioides* foram identificadas por espectrometria de massas e classificadas funcionalmente (Tabela 1). Para a classificação funcional das proteínas foram utilizados os seguintes bancos de dados: *UniProtKB*, *PEDANT 3 database* e *KEGG*. As proteínas foram classificadas em 12 categorias funcionais, sendo estas: metabolismo, energia, ciclo celular e processamento de DNA, transcrição, síntese proteica, destino proteico (dobramento, modificação e destino), proteína com função de ligação ou requerimento de cofator (estrutural ou catalítico), transporte celular, facilitação dos transportes e rotas de transportes, comunicação celular/mecanismo de transdução de sinal, resgate celular, resposta ao estresse, defesa e virulência, biogênese dos componentes celulares e não classificadas.

Tabela 1. Classificação funcional de proteínas de conídios de *Paracoccidioides* sp, isolado 01.

| Categoria funcional ^{1/} Número de acesso ² | Descrição da proteína | Número EC ³ | Localização celular ⁴ | SecretomeP Score ≥ 0.5 ⁵ | SignalP Score ≥ 0.5 ⁶ | Teo, MM ⁷ | Teo, pI ⁸ | Número de peptídeos (MS/MS) ⁹ |
|--|---|-------------------------------|---|--|---|---------------------------------|---------------------------------|---|
| METABOLISMO | | | | | | | | |
| Metabolismo de aminoácidos | | | | | | | | |
| PAAG_06387 | Homoisocitrato desidrogenase | EC 1.1.1.87 | Mitocondrial | N | N | 38747 | 6.9 | 3 |
| PAAG_08910 | D-3-fosfoglicerato desidrogenase | EC 1.1.1.95 | Citoplasmática | N | N | 64099 | 6.5 | 8 |
| PAAG_00966 | L-treonina-3-desidrogenase | EC 1.1.1.103 | Citoplasmática | N | N | 38113 | 5.9 | 6 |
| PAAG_08718 | Succinato-Semialdeído Desidrogenase | EC 1.2.1.16 | Citoplasmática | N | N | 53865 | 6.7 | 7 |
| PAAG_07036 | Metilmalonato-semialdeído desidrogenase | EC 1.2.1.27 | Mitocondrial | S | N | 63148 | 9.0 | 9 |
| PAAG_07689 | Glutamato desidrogenase NADP-especifica | EC 1.4.1.4 | Citoplasmática | N | N | 50494 | 7.2 | 11 |
| PAAG_02935 | Proteína H do Sistema de Clivagem da Glicina | EC 1.4.4.2 | Mitocondrial | N | N | 20573 | 4.9 | 5 |
| PAAG_02693 | Sacaropina desidrogenase | EC 1.5.1.10 | Citoplasmática | N | N | 49958 | 6.6 | 7 |
| PAAG_03569 | 1,2-diidroxi-3-ceto-5-metiltiopentene dioxigenase | EC 1.13.11.54 | Citoplasmática | N | N | 20879 | 5.5 | 4 |
| PAAG_08820 | Tirosinase | EC 1.14.18.1 | Extracelular | S | S | 41015 | 9.1 | 16 |
| PAAG_07626 | Metionina sintase independente da cobalamina | EC 2.1.1.14 | Mitocondrial | N | N | 87358 | 6.3 | 13 |
| PAAG_07412 | Serina hidroximetiltransferase | EC 2.1.2.1 | Citoplasmática | N | N | 52453 | 8.3 | 10 |
| PAAG_02901 | S-Adenosilmetionina sintetase | EC 2.5.1.6 | Citoplasmática | N | N | 42440 | 5.6 | 7 |
| PAAG_00468 | 4-Aminobutirato transaminase | EC 2.6.1.19 | Mitocondrial | N | N | 32298 | 9.2 | 8 |
| PAAG_07003 | Glutamina sintetase | EC 6.3.1.2 | Citoplasmática | S | N | 40096 | 5.8 | 8 |
| Metabolismo de nitrogênio | | | | | | | | |
| PAAG_03333 | Formamidase | EC 3.5.1.49 | Citoplasmática | N | N | 46176 | 6.1 | 18 |
| PAAG_01321 | Proteína da família oxidoreductase 2-nitropropano dioxigenase | EC 1.13.12.16 | Citoplasmática | N | N | 37766 | 6.0 | 7 |
| PAAG_06082 | Proteína da família-NmrA | EC 1.3.1.- | Extracelular | S | N | 27558 | 4.9 | 7 |
| Metabolismo de purinas/nucleosídeos/nucleobases | | | | | | | | |
| PAAG_05929 | Sulfato Adenililtransferase | EC 2.7.7.4 | Citoplasmática | N | N | 64152 | 6.3 | 10 |
| Metabolismo de nucleotídeos de pirimidina/nucleósidos/nucleobases | | | | | | | | |
| PAAG_04291 | Nucleosídeo-difosfato-quinase | EC 2.7.4.6 | Citoplasmática | N | N | 16888 | 6.8 | 3 |
| PAAG_05611 | Desoxiuridina 5'-trifosfato nucleótido hidrolase | EC 3.6.1.23 | Mitocondrial | S | N | 22721 | 5.3 | 4 |
| Metabolismo de carboidratos e compostos de C | | | | | | | | |
| PAAG_05392 | Aldeído desidrogenase | EC 1.2.1.3 | Citoplasmática | N | N | 51642 | 6.0 | 12 |
| PAAG_05249 | Aldeído desidrogenase | EC 1.2.1.3 | Citoplasmática | N | N | 54589 | 5.9 | 17 |
| PAAG_05151 | ATP-citrato-liase | EC 2.3.3.8 | Citoplasmática | N | N | 52988 | 6.0 | 8 |

| | | | | | | | | |
|---|---|-------------|-------------------------------|---|---|--------|-----|----|
| PAAG_00850 | Glutamina-Fructose-6-Fosfato Transaminase | EC 2.6.1.16 | Membrana plasmática | N | N | 54701 | 6.0 | 4 |
| PAAG_06473 | Manitol 1,5-fosfato desidrogenase | EC 1.1.1.17 | Citoplasmática e mitocondrial | N | N | 43146 | 5.7 | 8 |
| PAAG_02664 | 3-Cetoacil-CoA Tiolase | EC 2.3.1.16 | Peroxisomal | S | N | 43897 | 8.6 | 5 |
| PAAG_04550 | 2-metilcitrato sintase | EC 2.3.3.1 | Mitocondrial | S | N | 51548 | 9.0 | 10 |
| PAAG_04541 | Álcool desidrogenase | EC 1.1.1.1 | Mitocondrial | S | N | 44865 | 9.0 | 8 |
| Metabolismo de lipídios, ácidos graxos e isoprenóides | | | | | | | | |
| PAAG_05837 | Proteína palmitoil tioesterase | EC 3.1.2.22 | Nuclear | S | N | 105674 | 5.5 | 2 |
| PAAG_01928 | Peroxisomal desidratase | — | Peroxisomal | S | N | 33576 | 9.3 | 6 |
| Biossíntese de vitaminas, co-fatores, e grupos prostéticos | | | | | | | | |
| PAAG_01934 | Cadeia alfa da Riboflavina sintase | EC 2.5.1.9 | Citoplasmática | N | N | 26017 | 5.6 | 3 |
| ENERGIA | | | | | | | | |
| Glicólise e gliconeogênese | | | | | | | | |
| PAAG_08468 | Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase | EC 1.2.1.12 | Citoplasmática | S | N | 36642 | 8.3 | 14 |
| PAAG_06380 | Piruvato quinase | EC 2.7.1.40 | Citoplasmática | N | N | 59520 | 6.3 | 6 |
| PAAG_02869 | Fosfoglicerato quinase | EC 2.7.2.3 | Citoplasmática | S | N | 45339 | 6.5 | 8 |
| PAAG_08203 | Fosfoenolpiruvato carboxiquinase | EC 4.1.1.49 | Citoplasmática | S | N | 63930 | 6.1 | 8 |
| PAAG_01995 | Fructose-bifosfato aldolase | EC 4.1.2.13 | Citoplasmática | S | N | 39746 | 6.1 | 5 |
| PAAG_00771 | Enolase | EC 4.2.1.11 | Citoplasmática | N | N | 43886 | 8.9 | 14 |
| PAAG_02585 | Triose-fosfato isomerase | EC 5.3.1.1 | Citoplasmática | N | N | 27176 | 5.4 | 8 |
| PAAG_06526 | Glicose-6-fosfato-isomerase | EC 5.3.1.9 | Citoplasmática | N | N | 61177 | 6.5 | 7 |
| PAAG_02011 | Fosfoglicomutase | EC 5.4.2.2 | Citoplasmática | N | N | 83710 | 6.6 | 8 |
| Ciclo do glicoxilato | | | | | | | | |
| PAAG_04542 | Malato sintase | EC 2.3.3.9 | Peroxisomal | N | N | 61066 | 7.7 | 5 |
| Via das pentoses-fosfato | | | | | | | | |
| PAAG_04444 | Transcetolase TktA | EC 2.2.1.1 | Citoplasmática | N | N | 74987 | 6.0 | 10 |
| PAAG_04166 | Transaldolase | EC 2.2.1.2 | Citoplasmática | N | N | 35777 | 6.5 | 11 |
| PAAG_05621 | 6-fosfogluconolactonase | EC 3.1.1.31 | Citoplasmática | S | N | 29320 | 5.9 | 5 |
| Via do ácido-tricarboxílico | | | | | | | | |
| PAAG_00053 | Malato desidrogenase | EC 1.1.1.37 | Mitocondrial | S | N | 36044 | 9.0 | 16 |
| PAAG_08449 | Malato desidrogenase | EC 1.1.1.37 | Mitocondrial | N | N | 34692 | 6.4 | 12 |
| PAAG_01534 | Subunidade beta-E1 de piruvato desidrogenase | EC 1.2.4.1 | Mitocondrial | N | N | 41069 | 8.1 | 3 |
| PAAG_04851 | Fumarato redutase Osm1 | EC 1.3.1.6 | Mitocondrial | S | N | 68083 | 6.9 | 11 |
| PAAG_05415 | Citocromo b succinato desidrogenase, subunidade pequena | EC 1.3.99.1 | Mitocondrial | N | N | 21707 | 9.8 | 2 |

| | | | | | | | | |
|------------|---|-------------|--------------|---|---|-------|-----|----|
| PAAG_03330 | Diidrolipoil desidrogenase | EC 1.8.1.4 | Mitocondrial | N | N | 56097 | 8.3 | 6 |
| PAAG_00050 | Componente X da proteína piruvato desidrogenase | EC 2.3.1.12 | Mitocondrial | S | N | 52747 | 6.5 | 10 |
| PAAG_08915 | Dihidrolipoamida succiniltransferase | EC 2.3.1.61 | Mitocondrial | S | N | 56285 | 8.9 | 6 |
| PAAG_05048 | Aconitase | EC 4.2.1.3 | Mitocondrial | S | N | 79249 | 6.5 | 4 |
| PAAG_00417 | Subunidade alfa da Succinil-CoA-ligase | EC 6.2.1.4 | Mitocondrial | N | N | 34957 | 8.5 | 6 |
| PAAG_00666 | Componente do complexo Piruvato desidrogenase, Pdx1 | — | Mitocondrial | S | N | 31703 | 5.4 | 6 |

Transporte de elétrons e conservação de energia associada à membrana

| | | | | | | | | |
|------------|---|-------------|----------------|---|---|-------|-----|----|
| PAAG_06796 | Citocromo c oxidase (polipeptídio do complexo IV) | EC 1.9.3.1 | Mitocondrial | S | N | 22239 | 6.0 | 3 |
| PAAG_07246 | Citocromo c oxidase (polipeptídio do complexo IV) | EC 1.9.3.1 | Mitocondrial | N | N | 18952 | 5.5 | 8 |
| PAAG_04570 | ATP sintase subunidade D, mitocondrial | EC 3.6.3.14 | Mitocondrial | N | N | 19665 | 7.9 | 5 |
| PAAG_04838 | ATP sintase subunidade | EC 3.6.3.14 | Mitocondrial | N | N | 26623 | 9.4 | 6 |
| PAAG_06206 | ATP sintase subunidade 5 | EC 3.6.3.14 | Mitocondrial | N | N | 24651 | 9.7 | 6 |
| PAAG_08037 | ATP sintase subunidade beta | EC 3.6.3.14 | Mitocondrial | N | N | 55215 | 5.3 | 19 |
| PAAG_05605 | ATP sintase subunidade delta | EC 3.6.3.14 | Mitocondrial | N | N | 17623 | 5.2 | 2 |
| PAAG_05576 | ATP sintase subunidade delta gama | EC 3.6.3.14 | Mitocondrial | N | N | 32482 | 6.8 | 3 |
| PAAG_06155 | Vacuolar ATP sintase subunidade E | EC 3.6.3.14 | Citoplasmática | N | N | 26666 | 9.3 | 4 |
| PAAG_04820 | ATPase subunidade alfa | EC 3.6.3.14 | Mitocondrial | N | N | 51075 | 8.7 | 14 |

Oxidação de ácidos graxos

| | | | | | | | | |
|------------|--------------------------------|-------------|--------------|---|---|-------|-----|----|
| PAAG_08859 | Acetoacetyl-CoA-redutase | EC 1.1.1.36 | Peroxisomal | S | N | 97213 | 9.0 | 16 |
| PAAG_00435 | Acil-CoA desidrogenase | EC 1.3.1.8 | Mitocondrial | N | N | 49314 | 8.9 | 6 |
| PAAG_07786 | Acetyl-CoA C-acetyltransferase | EC 2.3.1.9 | Peroxisomal | S | N | 41534 | 7.6 | 6 |

CICLO CELULAR E PROCESSAMENTO DE DNA

| | | | | | | | | |
|------------|--|---|--------------------------|---|---|--------|------|----|
| PAAG_00773 | 14-3-3 epsilon | — | Citoplasmática e nuclear | N | N | 32505 | 4.7 | 9 |
| PAAG_06751 | Proteína semelhante a 14-3-3 | — | Nuclear | N | N | 29756 | 4.7 | 13 |
| PAAG_00317 | Septina 3 | — | Nuclear | N | N | 39513 | 8.7 | 3 |
| PAAG_03532 | Actina | — | Citoplasmática | N | N | 41852 | 5.6 | 9 |
| PAAG_08697 | Miosina da Classe V | — | Nuclear | N | N | 230395 | 5.5 | 17 |
| PAAG_08058 | Cofilina | — | Citoplasmática | N | N | 17493 | 5.7 | 5 |
| PAAG_07296 | Proteína de ligação do DNA de fita simples | — | Mitocondrial | S | N | 14983 | 10.1 | 7 |
| PAAG_08973 | Tropomiosina | — | Nuclear | N | N | 18845 | 5.0 | 9 |
| PAAG_07543 | Chaperona Rbl2, tubulina específica | — | Mitocondrial | N | N | 13659 | 5.4 | 2 |
| PAAG_08917 | Histona H2A | — | Nuclear | S | N | 14312 | 10.5 | 3 |
| PAAG_08471 | Histona H2A | — | Nuclear | S | N | 14887 | 10.4 | 3 |

| | | | | | | | | |
|------------|-----------------------------|---|--------------------------|---|---|--------|------|---|
| PAAG_08918 | Histona H2B | — | Nuclear | S | N | 15081 | 10.1 | 4 |
| PAAG_07099 | Histona H3 | — | Nuclear | S | N | 15418 | 11.2 | 6 |
| PAAG_07098 | Histona H4.1 | — | Nuclear | N | N | 11370 | 11.4 | 7 |
| PAAG_00126 | Histona H4 | — | Nuclear | N | N | 11386 | 11.4 | 7 |
| PAAG_01764 | Proteína ligadora de actina | — | Citoplasmática e nuclear | S | N | 84326 | 5.2 | 9 |
| PAAG_01347 | Actina, VIP1 | — | Nuclear | S | N | 28941 | 6.1 | 6 |
| PAAG_02422 | Cadeia pesada da dineína | — | Membrana plasmática | N | N | 552520 | 6.0 | 1 |

Síntese de DNA e replicação

| | | | | | | | | |
|------------|---|---|---------|---|---|-------|-----|---|
| PAAG_00923 | Antígeno Nuclear da Proliferação Celular (PCNA) | — | Nuclear | N | N | 31353 | 4.8 | 5 |
|------------|---|---|---------|---|---|-------|-----|---|

TRANSCRIÇÃO

| | | | | | | | | |
|------------|--|---|--------------------------|---|---|--------|-----|----|
| PAAG_04814 | Proteína de ligação de ácidos nucleicos | — | Extracelular | S | N | 30423 | 9.4 | 10 |
| PAAG_07957 | Fator de splicing de pre-mRNA, (srp1) | — | Nuclear | S | N | 23270 | 9.6 | 5 |
| PAAG_04458 | Proibitina-1 | — | Citoplasmática | S | N | 30921 | 8.7 | 6 |
| PAAG_06891 | Regulador pós-transcricional ligante de mRNA, (Csx1) | — | Citoplasmática e nuclear | S | N | 42659 | 6.3 | 2 |
| PAAG_07785 | Componente ribonucleoproteína subunidade pequena, 116 kDa U5 | — | Citoplasmática e nuclear | S | N | 111054 | 5.1 | 1 |

SÍNTESE DE PROTEÍNAS

| | | | | | | | | |
|------------|--------------------------------------|-------------|----------------|---|---|-------|------|----|
| PAAG_00689 | ATP dependente de RNA helicase eIF4A | EC 3.6.4.13 | Nuclear | N | N | 45044 | 5.1 | 7 |
| PAAG_02024 | Factor de elongação 1-alfa | EC 3.6.5.3 | Citoplasmática | S | N | 50590 | 9.2 | 10 |
| PAAG_02111 | Proteína ribossomal S0 40S | — | Citoplasmática | N | N | 32096 | 4.8 | 4 |
| PAAG_08955 | Proteína ribossomal S1 40S | — | Citoplasmática | N | N | 29030 | 10.1 | 8 |
| PAAG_06367 | Proteína ribossomal S11 40S | — | Citoplasmática | S | N | 18594 | 10.7 | 3 |
| PAAG_05704 | Proteína ribossomal S13 40S | — | Citoplasmática | N | N | 16892 | 10.4 | 4 |
| PAAG_01433 | Proteína ribossomal S14 40S | — | Citoplasmática | S | N | 16169 | 10.7 | 4 |
| PAAG_04690 | Proteína ribossomal S15 40S | — | Citoplasmática | N | N | 17600 | 10.1 | 2 |
| PAAG_01435 | Proteína ribossomal S16 40S | — | Citoplasmática | S | N | 15979 | 10.1 | 4 |
| PAAG_03513 | Proteína ribossomal S18 40S | — | Citoplasmática | N | N | 18023 | 10.6 | 5 |
| PAAG_05778 | Proteína ribossomal S19 40S | — | Citoplasmática | N | N | 16421 | 9.7 | 5 |
| PAAG_09043 | Proteína ribossomal S2 40S | — | Citoplasmática | S | N | 28430 | 10.3 | 4 |
| PAAG_03322 | Proteína ribossomal S20 40S | — | Citoplasmática | N | N | 13191 | 9.8 | 1 |
| PAAG_05805 | Proteína ribossomal S21 40S | — | Citoplasmática | N | N | 9973 | 9.3 | 2 |
| PAAG_06882 | Proteína ribossomal S24 40S | — | Citoplasmática | S | N | 15469 | 10.8 | 5 |
| PAAG_08540 | Proteína ribossomal S25 40S | — | Citoplasmática | S | N | 17609 | 10.2 | 5 |

| | | | | | | | | |
|------------|--|---|----------------|---|---|-------|------|----|
| PAAG_07847 | Proteína ribossomal S26 40S | — | Citoplasmática | S | N | 14029 | 11.0 | 1 |
| PAAG_09096 | Proteína ribossomal S28 40S | — | Citoplasmática | N | N | 7802 | 10.5 | 5 |
| PAAG_01785 | Proteína ribossomal S3 40S | — | Citoplasmática | N | N | 29784 | 8.9 | 5 |
| PAAG_03816 | Proteína ribossomal S4 40S | — | Citoplasmática | N | N | 29417 | 10.2 | 3 |
| PAAG_05484 | Proteína ribossomal S5 40S | — | Citoplasmática | N | N | 24109 | 9.4 | 6 |
| PAAG_07182 | Proteína ribossomal S7 40S | — | Citoplasmática | N | N | 22682 | 10.6 | 6 |
| PAAG_00264 | Proteína ribossomal S8 40S | — | Citoplasmática | N | N | 22935 | 11.0 | 5 |
| PAAG_03828 | Proteína ribossomal S9 40S | — | Citoplasmática | N | N | 22091 | 10.2 | 6 |
| PAAG_08285 | Proteína ribossomal L12 50S | — | Citoplasmática | S | N | 21092 | 9.2 | 3 |
| PAAG_00801 | Proteína ribossomal ácida P0 60S | — | Citoplasmática | N | N | 33788 | 5.0 | 4 |
| PAAG_07841 | Proteína ribossomal ácida P1 60S | — | Citoplasmática | N | N | 11357 | 4.1 | 3 |
| PAAG_04691 | Proteína ribossomal ácida P2 60S | — | Citoplasmática | N | N | 11298 | 4.4 | 1 |
| PAAG_04691 | Proteína ribossomal ácida P2 60S | — | Citoplasmática | N | N | 11298 | 4.4 | 1 |
| PAAG_07707 | Proteína ribossomal L10a 60S | — | Citoplasmática | N | N | 25546 | 9.7 | 3 |
| PAAG_00724 | Proteína ribossomal L11 60S | — | Citoplasmática | N | N | 20050 | 9.9 | 3 |
| PAAG_05590 | Proteína ribossomal L12 60S | — | Citoplasmática | N | N | 17876 | 9.6 | 6 |
| PAAG_06320 | Proteína ribossomal L13 60S | — | Citoplasmática | S | N | 24541 | 11.1 | 3 |
| PAAG_07955 | Proteína ribossomal L18 60S | — | Citoplasmática | S | N | 21125 | 11.7 | 5 |
| PAAG_03827 | Proteína ribossomal L21a 60S | — | Citoplasmática | S | N | 18252 | 10.4 | 6 |
| PAAG_04425 | Proteína ribossomal L22 60S | — | Citoplasmática | S | N | 13948 | 9.4 | 5 |
| PAAG_07385 | Proteína ribossomal L23a 60S | — | Citoplasmática | S | N | 16960 | 10.4 | 4 |
| PAAG_05233 | Proteína ribossomal L26 60S | — | Citoplasmática | N | N | 15139 | 10.8 | 5 |
| PAAG_01939 | Proteína ribossomal L27a 60S | — | Citoplasmática | S | N | 15660 | 10.5 | 4 |
| PAAG_08847 | Proteína ribossomal L28 60S | — | Citoplasmática | S | N | 16725 | 10.5 | 5 |
| PAAG_01050 | Proteína ribossomal L30 60S | — | Citoplasmática | S | N | 11719 | 9.9 | 2 |
| PAAG_08888 | Proteína ribossomal L4a 60S | — | Citoplasmática | S | N | 40192 | 10.7 | 8 |
| PAAG_03019 | Proteína ribossomal L6 60S | — | Citoplasmática | S | N | 23016 | 10.2 | 7 |
| PAAG_04998 | Proteína ribossomal L8 60S | — | Citoplasmática | S | N | 29187 | 10.3 | 6 |
| PAAG_03028 | Fator de alongação 1-beta | — | Citoplasmática | S | N | 25950 | 4.8 | 4 |
| PAAG_03556 | Fator de alongação 1-gama 1 | — | Citoplasmática | S | N | 45912 | 8.2 | 7 |
| PAAG_00594 | Fator de alongação 2 | — | Citoplasmática | N | N | 92748 | 6.5 | 15 |
| PAAG_02921 | Fator de alongação Tu | — | Mitocondrial | N | N | 48743 | 6.1 | 7 |
| PAAG_04958 | Fator de iniciação da tradução eucariótica 6 | — | Citoplasmática | N | N | 27327 | 4.8 | 3 |

Aminoacil-tRNA-sintetases

| | | | | | | | | |
|--|---|--------------|--------------------------|---|---|--------|------|----|
| PAAG_03951 | Protil-tRNA sintetase | EC 6.1.1.15 | Citoplasmática | S | N | 71741 | 6.8 | 8 |
| DESTINO DA PROTEÍNA (DOBRADURA, MODIFICAÇÃO, MODIFICAÇÃO DE DESTINO) | | | | | | | | |
| PAAG_00238 | Ubiquitina | — | Nuclear | S | N | 25232 | 10.1 | 5 |
| PAAG_00655 | Aminopectidase | EC 3.4.11.10 | Extracelular | S | S | 55208 | 5.4 | 5 |
| PAAG_07467 | Dipeptidil peptidase 3 | EC 3.4.14.4 | Mitocondrial | N | N | 86603 | 8.0 | 9 |
| PAAG_04038 | Dipeptidil peptidase | EC 3.4.14.4 | Extracelular | S | N | 78849 | 5.5 | 15 |
| PAAG_05417 | Peptidase Mitocondrial subunidade beta | EC 3.4.24.64 | Mitocondrial | N | N | 53121 | 5.8 | 9 |
| PAAG_06996 | Complexo da proteína G, subunidade beta, CpcB | — | Citoplasmática | S | N | 35504 | 6.6 | 7 |
| PAAG_04651 | Proteína nuclear ligante de GTP, GSP1/Ran | — | Citoplasmática | N | N | 24098 | 6.9 | 6 |
| PAAG_02466 | Proteína ativadora de GTPase, específica de Ran | — | Citoplasmática e nuclear | N | N | 18361 | 5.3 | 5 |
| PAAG_06344 | Rab inibidor de dissociação de GDP | — | Citoplasmática | N | N | 52571 | 5.4 | 6 |
| PAAG_06536 | Ubiquitin-Proteína ribossomal 40S (Proteína de fusão S31) | — | Citoplasmática e nuclear | S | N | 17867 | 9.8 | 4 |
| PAAG_00770 | 26S protease, subunidade regulatória | — | Citoplasmática e nuclear | N | N | 39654 | 5.3 | 4 |
| PROTEÍNA COM FUNÇÃO DE LIGAÇÃO OU REQUISITO DE COFATOR (ESTRUTURAL OU CATALÍTICO) | | | | | | | | |
| Ligação de RNA | | | | | | | | |
| PAAG_04913 | Proteína contendo domínios RNP | — | Citoplasmática e nuclear | S | N | 35118 | 7.9 | 7 |
| TRANSPORTE CELULAR, FACILITAÇÃO DO TRANSPORTE E ROTAS DE TRANSPORTES | | | | | | | | |
| PAAG_07564 | Porina, Proteína de membrana externa de mitocôndria | — | Mitocondrial | S | N | 30283 | 9.0 | 10 |
| PAAG_07335 | Proteína de resistência a múltiplas drogas MDR | — | Membrana plasmática | N | N | 150633 | 6.0 | 20 |
| PAAG_06065 | Aminoácido permease, inda1 | — | Membrana plasmática | N | N | 63105 | 8.0 | 4 |
| PAAG_03965 | Permease de alta afinidade por aminoácidos básicos | — | Membrana plasmática | N | N | 59032 | 9.5 | 6 |
| PAAG_00552 | Permease específica para lisina | — | Membrana plasmática | N | N | 61132 | 9.1 | 5 |
| PAAG_08472 | Transportador de monossacarídeos MFS | — | Membrana plasmática | N | N | 59353 | 8.8 | 6 |
| PAAG_00512 | Transporte de carboidratos | — | Membrana plasmática | N | N | 72786 | 8.0 | 10 |
| PAAG_02277 | Superfamília Sec1 | — | Nuclear | N | N | 76282 | 8.5 | 1 |
| PAAG_04276 | Fosfatidilinositol transportador | — | Citoplasmática | S | N | 49229 | 5.2 | 5 |
| PAAG_08620 | Proteína transportadora ADP, ATP | — | Mitocondrial | N | N | 33655 | 9.8 | 8 |
| PAAG_04281 | Mitocondrial Oxa1p | — | Mitocondrial | S | N | 71438 | 9.9 | 6 |

| Transporte de cátions (H⁺, Na⁺, K⁺, Ca²⁺, NH₄⁺, etc.) | | | | | | | | |
|--|--|--------------|--------------------------|---|---|--------|-----|----|
| PAAG_08082 | ATPase de membrana plasmática | EC 3.6.3.6 | Membrana plasmática | N | N | 101029 | 5.2 | 19 |
| PAAG_05329 | ATPase transporte de sódio | — | Membrana plasmática | N | N | 111708 | 5.9 | 12 |
| PAAG_00481 | Proteína de biogênese de membrana Yop1 | — | Membrana plasmática | N | N | 19403 | 8.8 | 3 |
| Transporte nuclear | | | | | | | | |
| PAAG_01854 | Fator de transporte Nuclear 2 | — | Citoplasmática e nuclear | S | N | 13998 | 4.8 | 1 |
| COMUNICAÇÃO CELULAR/MECANISMO DE TRANSDUÇÃO DE SINAL | | | | | | | | |
| PAAG_02351 | GTPase, RasA subunidade monomérica menor | EC 3.6.5.2 | Membrana plasmática | N | N | 24452 | 5.0 | 5 |
| PAAG_01280 | Família da fosfatase Ser/Thr | — | Citoplasmática e nuclear | S | N | 71141 | 9.3 | 8 |
| PAAG_08247 | Calmodulina | — | Citoplasmática | N | N | 17013 | 4.1 | 6 |
| PAAG_01500 | Proteína de ligação ao GTP (SAS1) | — | Citoplasmática e nuclear | N | N | 23173 | 6.3 | 4 |
| PAAG_08093 | Proteína de ligação ao GTP (YPT3) | — | Citoplasmática e nuclear | N | N | 24864 | 6.2 | 5 |
| PAAG_02458 | Proteína de ligação ao GTP (YPT7) | — | Mitocondrial | S | N | 23241 | 4.8 | 4 |
| PAAG_08028 | Proteína de ligação ao GTP (YPT1) | — | Citoplasmática e nuclear | N | N | 22520 | 5.1 | 5 |
| PAAG_07175 | Proteína de ligação ao GTP (YPT52) | — | Extracelular | S | N | 30575 | 4.9 | 4 |
| PAAG_07702 | Fator de ribosilação do ADP | — | Citoplasmática | N | N | 20999 | 5.8 | 6 |
| PAAG_07634 | GTPase, RhoA | — | Citoplasmática | N | N | 21986 | 6.1 | 9 |
| RESGATE CELULAR, DEFESA E VIRULÊNCIA | | | | | | | | |
| PAAG_02364 | Tiorredoxina | EC 1.8.1.8 | Citoplasmática | S | N | 12892 | 5.2 | 3 |
| PAAG_01553 | Catalase B | EC 1.11.1.6 | Extracelular | N | S | 82409 | 6.8 | 25 |
| PAAG_03216 | Peroxiredoxina mitocondrial PRX1 | EC 1.11.1.15 | Mitocondrial | N | N | 24897 | 5.3 | 10 |
| PAAG_06175 | Proteína da matriz peroxissomal | EC 1.11.1.15 | Peroxissomal | S | N | 18096 | 5.6 | 3 |
| PAAG_00986 | Dissulfeto-isomerase Pdi1 | EC 5.3.4.1 | Extracelular | S | S | 59341 | 4.8 | 24 |
| PAAG_02482 | Dissulfeto-isomerase tga | EC 5.3.4.1 | Peroxissomal | N | N | 94874 | 7.0 | 12 |
| PAAG_00871 | Proteína de choque térmico Hsp30 (Hsp30) | — | Citoplasmática e nuclear | S | N | 28657 | 9.7 | 5 |
| PAAG_05142 | Proteína de choque térmico Hsp10, mitocondrial (Hsp10) | — | Mitocondrial | N | N | 11197 | 8.8 | 7 |
| PAAG_08059 | Proteína de choque térmico Hsp60, mitocondrial (Hsp60) | — | Mitocondrial | N | N | 62304 | 5.5 | 22 |
| PAAG_05679 | Proteína de choque térmico Hsp90 (Hsp90) | — | Citoplasmática | N | N | 78698 | 4.9 | 14 |

| | | | | | | | | |
|------------|--|---|--------------------------|---|---|--------|-----|----|
| PAAG_07750 | Proteína de choque térmico Hsp88 (Hsp80) | — | Citoplasmática | N | N | 80734 | 4.9 | 10 |
| PAAG_07775 | Proteína de choque térmico Hsp SSB1 (SSB1) | — | Citoplasmática | S | N | 60730 | 5.5 | 7 |
| PAAG_01339 | Proteína de choque térmico Hsp SSC1 (SSC1) | — | Mitocondrial | N | N | 73866 | 5.9 | 18 |
| PAAG_02116 | Proteína de choque térmico Hsp70 (Hsp70) | — | Extracelular | S | S | 107147 | 6.1 | 9 |
| PAAG_01262 | Proteína semelhante a Hsp70 | — | Citoplasmática | N | S | 68898 | 5.4 | 15 |
| PAAG_08003 | Proteína semelhante a Hsp70 | — | Citoplasmática | N | N | 70963 | 5.1 | 20 |
| PAAG_05226 | Co-chaperona ligação à Hsp90 (Sba1) | — | Citoplasmática | N | N | 21313 | 4.2 | 3 |
| PAAG_06255 | Co-chaperona mitocondrial GrpE | — | Mitocondrial | N | N | 28529 | 8.9 | 5 |
| PAAG_06068 | Proteína do complexo-T 1 subunidade beta | — | Citoplasmática | N | N | 60014 | 5.8 | 9 |
| PAAG_09083 | Proteína da família TCTP | — | Citoplasmática | N | N | 20298 | 4.8 | 2 |
| PAAG_04089 | Proteína principal corpo de Woronin | — | Citoplasmática e nuclear | N | N | 24495 | 7.3 | 6 |

BIÓGENESE DOS COMPONENTES CELULARES

Parede celular

| | | | | | | | | |
|------------|--|-------------|--------------|---|---|-------|-----|----|
| PAAG_05245 | β -1,3-glucanosiltransferase gel 2 | EC 2.4.1.- | Extracelular | S | S | 52012 | 5.3 | 7 |
| PAAG_03849 | Quitinase | EC 3.2.1.14 | Extracelular | N | N | 39205 | 9.6 | 4 |
| PAAG_01139 | Glucanase da parede celular | — | Extracelular | S | S | 44815 | 5.1 | 5 |
| PAAG_06779 | Glucanase da parede celular (Utr2) | — | Extracelular | S | N | 47361 | 7.1 | 5 |
| PAAG_07670 | Proteína de parede celular ECM33 | — | Extracelular | S | S | 41346 | 5.5 | 10 |
| PAAG_03701 | Proteína contendo domínios BAR | — | Mitocondrial | S | N | 33714 | 5.5 | 6 |

Não classificadas

| | | | | | | | | |
|------------|--------------------------------|---|--------------------------|---|---|--------|------|----|
| PAAG_07434 | Proteína hipotética | — | Extracelular | S | N | 11269 | 5.0 | 1 |
| PAAG_02431 | Proteína hipotética | — | Citoplasmática | N | N | 117582 | 5.1 | 1 |
| PAAG_06412 | Proteína hipotética | — | Mitocondrial | S | N | 13341 | 9.6 | 3 |
| PAAG_02841 | Proteína hipotética | — | Nuclear | S | N | 13363 | 10.5 | 3 |
| PAAG_02434 | Proteína hipotética | — | Nuclear | S | N | 14344 | 6.8 | 2 |
| PAAG_05019 | Proteína hipotética | — | Citoplasmática | N | N | 15300 | 6.6 | 3 |
| PAAG_07158 | Proteína hipotética | — | Citoplasmática e nuclear | S | N | 22986 | 3.9 | 1 |
| PAAG_03092 | Proteína hipotética | — | Nuclear | S | N | 62034 | 5.4 | 10 |
| PAAG_00003 | Proteína hipotética conservada | — | Nuclear | S | N | 124203 | 9.1 | 1 |
| PAAG_00340 | Proteína hipotética conservada | — | Citoplasmática | S | N | 19214 | 8.6 | 5 |
| PAAG_01938 | Proteína hipotética conservada | — | Nuclear | N | N | 221063 | 5.0 | 1 |
| PAAG_05351 | Proteína hipotética conservada | — | Extracelular | S | S | 21983 | 5.4 | 5 |
| PAAG_00663 | Proteína hipotética conservada | — | Citoplasmática | N | N | 23730 | 6.8 | 4 |

| | | | | | | | | |
|------------|---|---|--------------------------|---|---|--------|------|----|
| PAAG_05173 | Proteína hipotética conservada | — | Mitocondrial | S | N | 23221 | 11.0 | 3 |
| PAAG_05650 | Proteína hipotética conservada | — | Membrana plasmática | S | N | 35572 | 9.3 | 6 |
| PAAG_09048 | Proteína hipotética conservada | — | Citoplasmática e nuclear | S | N | 37788 | 5.8 | 7 |
| PAAG_06714 | Proteína hipotética conservada | — | Nuclear | S | N | 41454 | 8.1 | 7 |
| PAAG_02597 | Proteína hipotética conservada | — | Nuclear | S | N | 44581 | 7.2 | 7 |
| PAAG_04364 | Proteína hipotética conservada | — | Nuclear | S | N | 44609 | 7.7 | 8 |
| PAAG_08781 | Proteína hipotética conservada | — | Nuclear | S | N | 44613 | 7.2 | 7 |
| PAAG_08032 | Proteína hipotética conservada | — | Nuclear | S | N | 51485 | 6.7 | 9 |
| PAAG_02283 | Proteína hipotética conservada | — | Mitocondrial | N | N | 65139 | 5.6 | 2 |
| PAAG_02314 | Proteína da família DUF221 | — | Membrana plasmática | N | N | 95206 | 8.8 | 12 |
| PAAG_06083 | Proteína da família diene lactona hidrolase | — | Citoplasmática | N | N | 26742 | 5.8 | 5 |
| PAAG_04983 | Proteína de formação de filamento | — | Citoplasmática e nuclear | N | N | 224507 | 5.4 | 1 |
| PAAG_01243 | Fenilacetona monooxigenase | — | Peroxisomal | N | N | 68225 | 6.0 | 10 |
| PAAG_03309 | Suaprgal | — | Mitocondrial | S | N | 34724 | 4.5 | 8 |
| PAAG_03624 | Subunidade do complexo Arp2/3, Arc16 | — | Citoplasmática | N | N | 36176 | 5.9 | 5 |
| PAAG_03776 | Inositol 3-Fosfato Sintase | — | Citoplasmática | S | N | 58463 | 6.3 | 9 |
| PAAG_04328 | Receptor de carga endosomal ERP3 | — | Retículo endoplasmático | N | S | 24267 | 6.0 | 3 |
| PAAG_06917 | Proteína ligante de RNA com domínio KH | — | Citoplasmática e nuclear | S | N | 38703 | 6.0 | 4 |
| PAAG_01298 | Proteína de repetição da proteína M | — | Nuclear | S | N | 134731 | 4.9 | 20 |
| PAAG_03717 | Cadeia regulatória leve de miosina cdc4 | — | Citoplasmática e nuclear | N | N | 15528 | 4.5 | 6 |
| PAAG_08856 | Nicotinato-nucleotídeo pirofosforilase | — | Citoplasmática | N | N | 33780 | 6.6 | 5 |
| PAAG_04949 | Proteína de reparo de excisão UV (RadW) | — | Citoplasmática e nuclear | S | N | 40033 | 4.5 | 7 |

¹Categoria funcional – baseada no banco de dados de categoria funcional MIPS (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/yeast/listSearch.html?order=entry>);

²Número de acesso da proteína no banco de dados de *P. brasiliensis* (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html);

³Número EC – Número de acesso das enzimas no banco de dados KEEG (<http://www.genome.jp/kegg/>);

⁴Localização subcelular das proteínas – Predição de localização subcelular pelo software WoLF PSORT (<http://wolfsort.seq.cbrc.jp/>);

⁵Predição de secreção de acordo com o servidor SecretomeP 2.0. O número corresponde à rede neural que excedeu um valor de 0.5 (NN-score \geq 0.50)

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>);

⁶Predição de secreção de acordo com o servidor de SignalP 4.1. O número corresponde aos valores que excede um valor de 0.5 (NN-score \geq 0.50) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>);

⁷Massa molecular teórica (kDa) – massa molecular teórica calculada a partir da sequência de aminoácidos da proteína identificada;

⁸Ponto isoelétrico teórico – pI teórico disponibilizado pelo banco de dados PEDANT 3 *database* (<http://pedant.qsf.de/>);

⁹Número de peptídeos encontrados (MS/MS) – número de peptídeos correspondente às massas da proteína encontrada.

A classificação das proteínas segundo os processos metabólicos dos quais participam foram realizadas utilizando-se como referência o banco de dados *FunCAT2*. Foi possível observar que 21% das proteínas identificadas eram referentes à síntese proteica e 17% relacionados à energia (Figura 7). Dentre as proteínas de síntese proteica, destacam-se as proteínas ribossomais e fatores de alongação. Os processos de geração de energia para célula, destacam-se proteínas relacionadas a via glicolítica tais como enolase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, piruvato quinase, proteínas relacionadas ao ciclo do ácido cítrico como malato desidrogenase, succinil CoA ligase, bem como proteínas relacionadas a β -oxidação como metilcitrate sintase e malato sintase que estão relacionadas ao ciclo do metilcitrate e ciclo do glioxilato, respectivamente. Enzimas como transaldolase e transcetolase ligadas à via das pentoses fosfato também foram descritas no proteoma de conídios.

No que se refere às proteínas relacionadas ao metabolismo foram caracterizadas 12% referentes a esta classe funcional. Dentre estas, se destacam as vias de metabolismo de aminoácidos, metabolismo de nitrogênio, metabolismo de carboidratos e compostos de carbono, metabolismo de lipídeos e biossíntese de vitaminas e cofatores enzimáticos.

Outra classe funcional que foi representativa no proteoma de conídios foi a relacionada aos processos de resposta ao estresse celular, defesa e virulência, representando o total de 9% das proteínas caracterizadas. Neste grupo nota-se a presença de proteínas relacionadas ao estresse térmico e aos processos antioxidantes da célula, tais como proteínas HSP88, HSP70, HSP90 e tioredoxina, catalase B, peroxiredoxina mitocondrial PRX1, respectivamente.

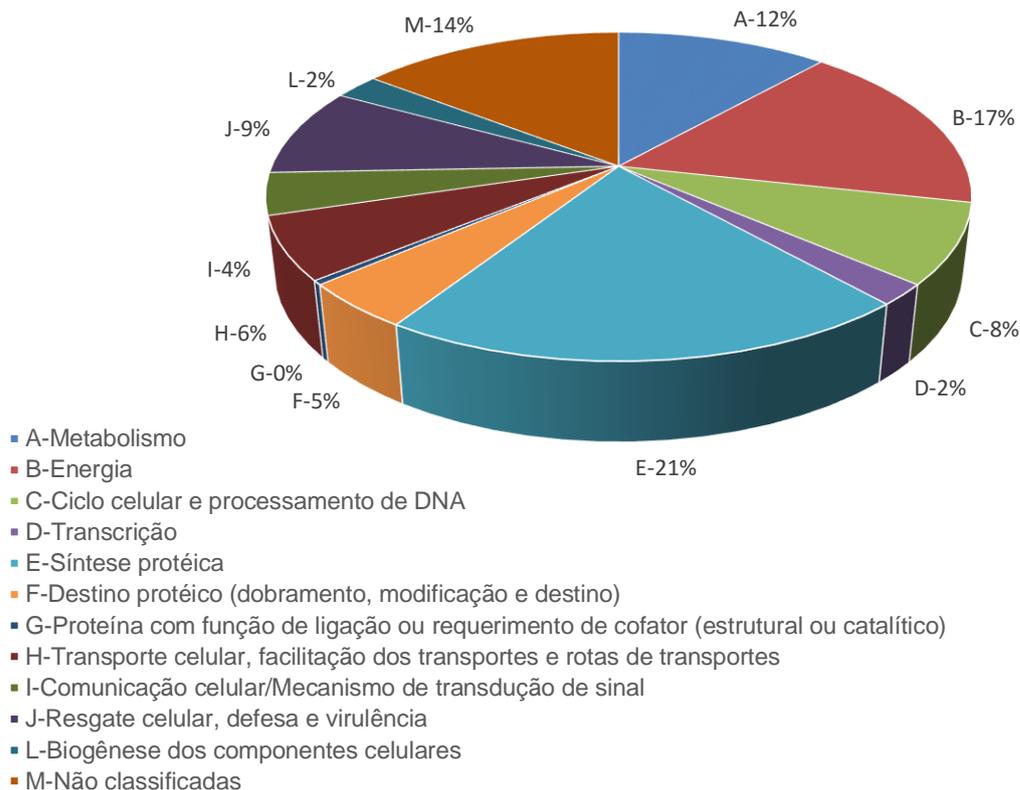


Figura 7: Classificação Funcional das proteínas de conídios de *Paracoccidioides sp*, isolado 01. A imagem demonstra o percentual de proteínas preditas em conídios de *Pb01*, de acordo com a função biológica. Um total de 242 proteínas foram classificadas em 12 categorias baseadas em FunCat2.

Diante desse panorama de proteínas expressas por conídios foi elaborado um modelo metabólico adaptado de Osherov e May (2001) demonstrando os possíveis mecanismos moleculares presentes nos conídios (Figura 8). Foram identificadas proteínas relacionadas a adesão através de glicoproteínas como: ECM33 e β 1,3 glicosiltransferase Gel2. Proteínas das vias de sinalização foram identificadas, como a calmodulina, RasA GTPase e RhoA GTPase. Adesinas tais como enolase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, triosefosfato isomerase, malato sintase foram significativas no proteoma de conídios. Proteínas relacionadas ao estresse térmico e antioxidantes foram identificadas, como, HSP90, HSP70, catalase B e peroxirredoxina mitocondrial PRX1. Foram identificadas proteínas relacionadas as vias de produção de energia, tais como, glicólise, ciclo do ácido cítrico e da fosforilação oxidativa. A β oxidação de lipídeos foi representada pela presença da metilcitrato sintase, através do ciclo do metilcitrato e da malato sintase pelo ciclo do glioxilato. A via das pentoses fosfato foi representada pela indução da transcetolase e da transaldolase.

A maior classe funcional de proteínas foi relacionada a síntese proteica, onde grande parte das proteínas identificadas eram ribossomais.

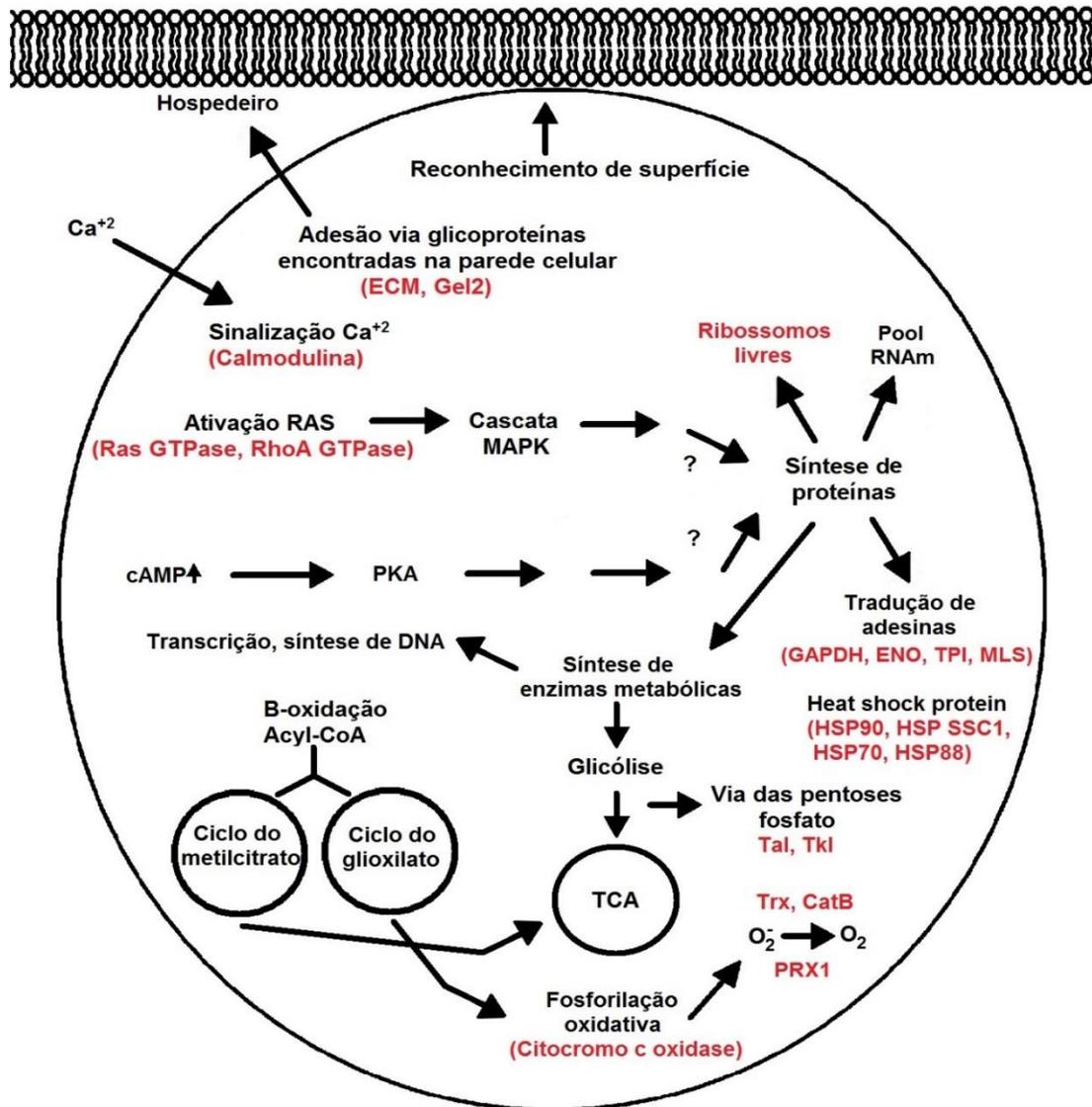


Figura 8: Modelo metabólico de conídios de *Paracoccidioides sp*, isolado 01. ECM-ECM33; Gel2- β 1,3-glicosiltransferase Gel2; GAPDH-Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; Eno-Enolase; Tpi-Triosefosfato isomerase; Mls-Malato sintase; HSP-proteína de choque térmico; PRX1-Mitocondrial peroxidase 1; Trx-Tioredoxina; CatB-Catalase B; Tal-Transaldolase; Tkl-Transcetolase. Adaptado de Oshero & May, (2001)

5.6. Predição de localização subcelular das proteínas de conídios de *Paracoccidioides sp*, isolado 01

As análises de predição de localização subcelular foram realizadas utilizando-se a ferramenta de bioinformática *WoLF PSORT* (Horton et al. 2007), para predição de localização subcelular das proteínas de conídios (Figura 9). Através desta ferramenta, foi possível verificar que a maior porcentagem das proteínas identificadas tem a localização predita na região citoplasmática, representando um total de 43%. Em seguida, se destaca a região mitocondrial representando um total de 20% das proteínas de conídios preditas para este compartimento. Em menores quantidades, foram preditas proteínas de acordo com as seguintes localizações: Nuclear (12%), extracelular (7%), membrana plasmática (6%), peroxissomal (3%), proteínas que atuam em dois ou mais compartimentos como localização citoplasmática e nuclear (9%) e em menor quantidade proteínas que apresentaram outras localizações.

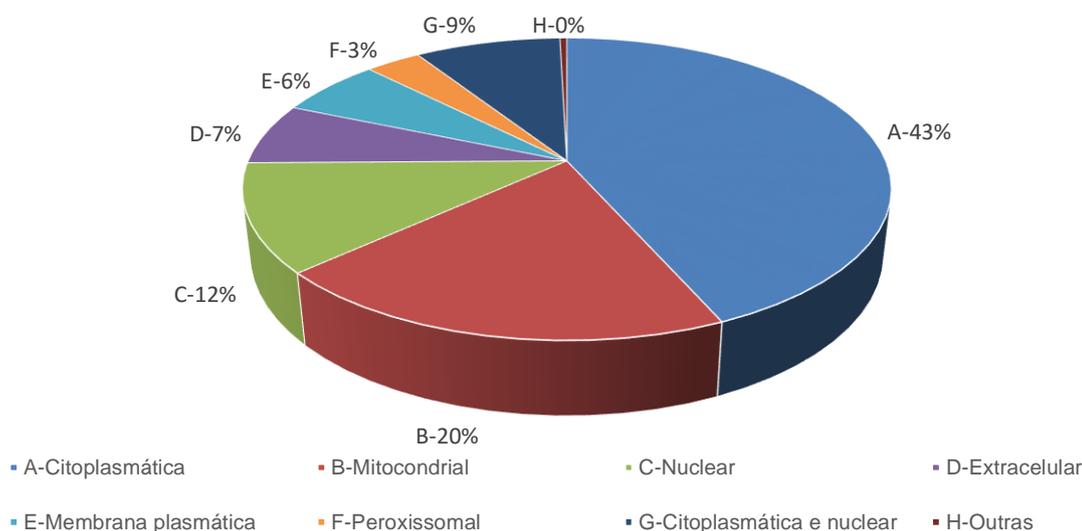


Figura 9: Análise *in silico* da distribuição das proteínas de conídios de *Paracoccidioides sp*, isolado 01 pela localização subcelular. 242 proteínas foram classificadas de acordo com o programa *WoLF PSORT*, e distribuídas em 8 compartimentos celular distintos.

5.7. Predição de proteínas secretadas em conídios de *Paracoccidioides sp*, isolado 01

Utilizando *softwares*, foram identificadas proteínas preditas para serem secretadas em conídios de *Paracoccidioides sp*, isolado 01. Dentre as 242 proteínas que foram analisadas, foi possível verificar que 48% das proteínas

apresentavam peptídeo sinal para secreção tanto por vias clássicas ou não clássicas de secreção (Tabela 1).

Um dos *softwares* empregados foi o *SignalP* 4.1. Esta ferramenta prediz a presença e a localização dos sítios de clivagem dos peptídios sinais, predizendo se a proteína é secretada por vias clássicas. O outro *software* utilizado foi o *SecretomeP* 2.0 que prediz se a proteína é secretada por via não-clássica, ou seja, não possui o peptídeo sinal para desencadear a secreção de proteínas. Os valores de referência estipulados para as análises variam entre 0 e 1. Para cada uma das proteínas analisadas o *software* considera os valores acima de 0,5 como indicativo de secreção.

Utilizando o *software* *SignalP* 4.1 foi possível verificar que 11 proteínas (5%), do total, exibiam sequências de peptídeos sinais putativos e seriam secretadas por via clássica. No entanto, utilizando o *software* *SecretomeP*, verificou-se que 105 proteínas (43%), do total identificado, são preditas para serem secretadas por vias não-clássicas pelo conídio (Figura 10).

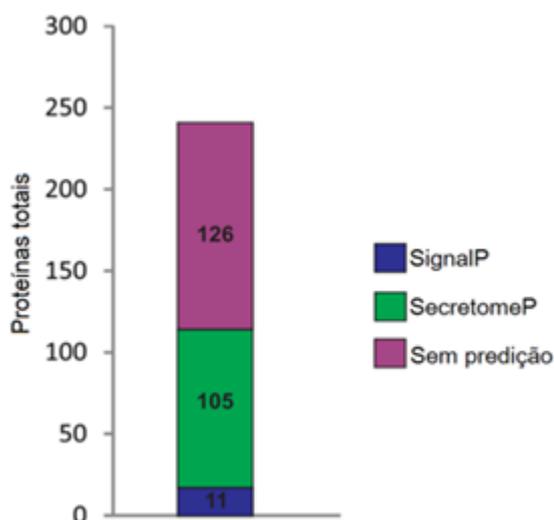


Figura 10: Classificação das proteínas preditas como secretadas durante o proteoma de conídios de *Paracoccidioides sp*, isolado 01. Em lilás foram descritas proteínas que não apresentaram predição para secreção. Em verde foram descritas proteínas que apresentam predição de secreção por vias não clássicas, de acordo com o *software* *SecretomeP*. Em azul foram descritas proteínas secretadas por via clássica, de acordo com o *software* *SignalP*. Para as análises de predição foram considerados valores acima de ≥ 0.5 .

De acordo com *Fungal Secretome Database (FSD)*, 58% das proteínas expressas no genoma de *Paracoccidioides sp*, isolado 01, são preditas para serem secretadas por vias não clássicas. 14% foram preditas para secreção

por via clássica e 28% não apresentaram predição para essas vias, demonstrando que os dados encontrados durante as análises estão de acordo com os do banco de dados.

5.8. Predição de fatores de virulência em conídios de *Paracoccidioides*

Para identificar os fatores de virulência presentes em conídios de *Paracoccidioides sp*, isolado 01, foram realizadas busca no banco de dados *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), visando a identificação dos fatores de virulência já descritos em outros fungos patogênicos na literatura.

Das 242 proteínas analisadas, 21 proteínas foram descritas em outros organismos patogênicos para serem fatores de virulência (Tabela 2).

Tabela 2- identificação de proteínas de conídios de *Paracoccidioides* sp, isolado 01 relacionadas a virulência

| Número de acesso ¹ | Descrição da proteína | Organismo referência | Referência |
|-------------------------------|--|--------------------------------------|--|
| PAAG_07335 | Proteína de resistência a múltiplas drogas MDR | <i>Candida albicans</i> | (Hameed & Fatima 2013) |
| PAAG_00655 | Aminopeptidase | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | (Stames & O'Toole 2013) |
| PAAG_00771 | Enolase | <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> | (Nogueira et al. 2010) |
| PAAG_01339 | Proteína de choque térmico Hsp SSC1 (SSC1) | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | (Lewrenz et al. 2013) |
| PAAG_01553 | Catalase B | <i>Beauveria bassiana</i> | (Wang et al. 2013) |
| PAAG_02116 | Proteína de choque térmico Hsp70 (Hsp70) | <i>Cryptococcus neoformans</i> | (Silveira et al. 2013) |
| PAAG_02351 | RasA GTPase | <i>Aspergillus fumigatus</i> | (Fortwendel et al. 2008) |
| PAAG_02364 | Tioredoxina | <i>Botrytis cinerea</i> | (Viefhues et al. 2014) |
| PAAG_02585 | Triose-fosfato isomerase | <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> | (Pereira et al. 2007) |
| PAAG_03216 | Peroxirredoxina mitocondrial PRX1 | <i>Candida albicans</i> | (Srinivasa et al. 2012) |
| PAAG_03849 | Quitinase | <i>Candida albicans</i> | (Drakulovski et al. 2011) |
| PAAG_04089 | Proteína principal corpo de Woronin | <i>Aspergillus fumigatus</i> | (Beck et al. 2013) |
| PAAG_04542 | Malato sintase | <i>Arthrotrichum oligospora</i> | (Zhao et al. 2014) |
| PAAG_05679 | Proteínas de choque térmico HSP90 | <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> | (Matos et al. 2013) |
| PAAG_07467 | Dipeptidil peptidase 3 | <i>Candida lusitanae</i> | (Sabra et al. 2014) |
| PAAG_07634 | GTPase RhoA | <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> | (Shankar et al. 2011) |
| PAAG_08059 | Proteína de choque térmico Hsp60, mitocondrial (Hsp60) | <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> | (de Bastos Ascenco Soares et al. 2008) |
| PAAG_08247 | Calmodulina | <i>Colletotrichum trifolii</i> | (Dickman et al. 1995) |
| PAAG_08468 | Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase | <i>Penicillium marneffeii</i> | (Lau et al. 2013) |
| PAAG_09083 | Proteína da família TCTP | <i>Aspergillus nidulans</i> | (Oh et al. 2013) |
| PAAG_07670 | ECM33 | <i>Aspergillus nidulans</i> | (Levdansky et al. 2010) |

¹Número de acesso da proteína no banco de dados de *P. brasiliensis* (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html);

5.9. Predição de adesinas presentes em conídios de *Paracoccidioides* sp, isolado 01

Para a predição de adesinas presentes em conídios de *Paracoccidioides* sp, isolado 01, foi utilizado o software *FungalRV* e busca por adesinas homologas e ortólogas descritas na revisão bibliografia.

O software *fungaRV* é uma ferramenta designada para prever adesinas de fungos patogênicos humanos. Esta ferramenta analisa as sequências protéicas e produz uma pontuação. A proteína que apresentar uma pontuação acima de 0,5, é predita como uma proteína com funções de adesina.

Das 242 proteínas identificadas em conídios, 9 foram preditas como adesinas (Tabela 3). Dentre essas, 6 já foram descritas/preditas em *Paracoccidioides* spp, como adesinas, ou seja, se ligam a componentes presentes na matriz extracelular e a parede celular das células do hospedeiro. Algumas já foram comprovadas com função de adesina em *Paracoccidioides* spp. como a: Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase, triose-fosfato isomerase, enolase, malato sintase, proteína de choque térmico HSP30, co-chaperona ligação à Hsp90 (Sba1), e outras 5 proteínas foram preditas como possíveis adesinas utilizando o software de predição de adesinas, como: proteína de choque térmico HSP70, proteína actina VIP1 e proteína de choque térmico HSP60, mitochondrial.

Tabela 3 - Proteínas identificadas durante o proteoma de conídios de *Paracoccidioides* sp, isolado 01 relacionadas à adesão

| Número de acesso ¹ | Descrição da proteína | Processo metabólico ² | Organismo | Referência | FungalRV ≥ 0.5 ³ |
|-------------------------------|--|--------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|----------------------------------|
| PAAG_08468 | Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase | Glicólise | <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> | (Barbosa et al. 2006) | S |
| PAAG_02585 | Triose-fosfato isomerase | Glicólise | <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> | (Pereira et al. 2007) | S |
| PAAG_00771 | Enolase | Glicólise | <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> | (Marcos et al. 2012) | S |
| PAAG_04542 | Malato sintase | Ciclo do glioxilato | <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> | (da Silva Neto et al. 2009) | N |
| PAAG_00871 | Proteína de choque térmico Hsp30 (Hsp30) | Defesa celular e virulência | <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> | (Andreotti et al. 2005) | N |
| PAAG_05226 | Co-chaperona ligação à Hsp90 (Sba1) | Defesa celular e virulência | <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> | (Bailao et al. 2012) | N |
| PAAG_02116 | Proteína de choque térmico Hsp70 (Hsp70) | Defesa celular e virulência | <i>Cryptococcus neoformans</i> | (Silveira et al. 2013) | N |
| PAAG_01347 | Proteína do citoesqueleto de actina VIP1 | Ciclo celular e processamento de DNA | <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> | — | S |
| PAAG_08059 | Proteína de choque térmico Hsp60, mitocondrial (Hsp60) | Defesa celular e virulência | <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> | — | S |

¹Número de acesso da proteína no banco de dados de *P. brasiliensis* (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html);

²Categoria funcional – baseada no banco de dados de categoria funcional MIPS (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/yeast/listSearch.html?order=entry>);

³FungalRV – Proteínas adesinas preditas pelo servidor web FungalRV (<http://fungalrv.igib.res.in/>)

5.10. Abundância relativa das proteínas identificadas durante as análises proteômicas de conídios de *Paracoccidioides sp*, isolado 01

Para verificar abundância das proteínas expressas em conídios de *Paracoccidioides sp*, isolado 01, foram realizadas a distribuição relativa das quantidades proteicas em femtomoles (fmol) de todas as proteínas identificadas. O valor total em femtomoles da distribuição das proteínas foi de 51.560 (100%). Foram analisadas as proteínas referentes às classes funcionais de: síntese proteica, resposta ao estresse, defesa e virulência e aos processos energéticos (Figura 11). Dentre estas, a classe funcional que apresentou a maior abundância relativa, representando um total de 8.810 fmol (17%) foi referente aos processos energéticos da célula. Em seguida, representando 8.240 fmol (16%) foram relacionadas proteínas envolvidas nos processos de síntese proteica. E por último, com 7.139 fmol (14%) foram analisadas proteínas envolvidas nos processos de resposta ao estresse, defesa e virulência.

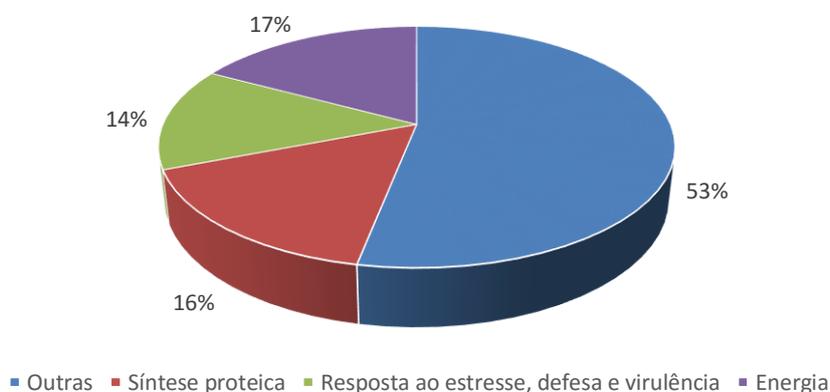


Figura 11: Abundância relativa das proteínas identificadas durante as análises proteômicas de conídios de *Paracoccidioides sp*, isolado 01. Em lilás, com 17% da abundância relativa, foram consideradas proteínas relacionadas aos processos energéticos. Em vermelho foram consideradas proteínas relacionadas aos processos de síntese de proteínas, representando um total de 16%. Em verde, com 14%, representa a abundancia relativa de proteínas relacionadas aos processos de resposta aos estresse, defesa e virulência. Em azul representa as outras classes funcionais com um total de 53%.

Por conseguinte, foram realizadas também análises da abundância relativa de proteínas preditas como fatores de virulência, afim de, verificar a quantidade destas em relação ao total de proteínas identificadas durante o proteoma (Figura 12). O valor total da distribuição das proteínas foi de 13.540 fmol (26%). A maioria dos fatores de virulências descritos estão relacionados

aos processos energéticos da célula e aos processos de resposta ao estresse, defesa celular e virulência.

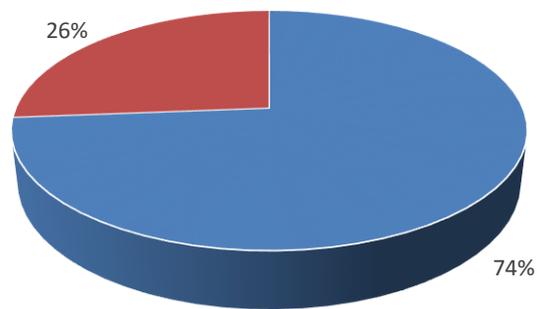


Figura 12: Abundância relativa das proteínas preditas como fatores de virulência durante as análises proteômicas de conídios de *Paracoccidioides* sp, isolado 01. Em vermelho, com 26%, representa as proteínas preditas como fatores de virulência. Em azul representa proteínas que foram preditas como fatores de virulência com um total de 74%.

6. DISCUSSÃO

Atualmente têm sido realizados estudos proteômicos de conídios de fungos patogênicos em *Aspergillus fumigatus*, *Magnaporthe oryzae*, *Penicillium marneffe* (Gokce et al. 2012; Lau et al. 2013; Suh et al. 2012). No entanto, estes estudos ainda não foram realizados em conídios de *Paracoccidioides* spp. Nesse sentido, foi realizado o proteoma de conídios de *Paracoccidioides* sp, isolado 01 com o intuito de identificar e caracterizar as proteínas expressas nessa fase morfológica de propagação do fungo. A caracterização do proteoma dos conídeos de *Pb01* permitiu elucidar moléculas potencialmente envolvidas na adesão, virulência e em mecanismos de interação entre a célula conidial infectante com as células do hospedeiro.

6.1. Proteínas das vias de sinalização potencialmente relacionadas ao processos de transição dimórfica.

Proteínas relacionadas as vias de transdução de sinais são indispensáveis para as células, pois controlam a proliferação, as mudanças morfológicas, metabolismo, e decisões de quando ocorrerá o desenvolvimento da célula frente a estímulos e condições externas (Jungbluth et al. 2012).

Neste contexto, a proteína Ras (*Rat sarcoma*) é proeminente na regulação das vias de transdução de sinais que medeiam mudanças adaptativas, Ras pertence a uma grande família de proteínas de baixo peso molecular (21 kDa) com atividade de GTPase, que estão ativas quando ligadas a GTP (Guanosina trifosfato) e inativas quando ligadas a GDP (Guanosina difosfato) (Haniu et al. 2013). Neste estudo, foram identificadas duas proteínas da família Ras relacionadas a processos das vias de transdução de sinais, a RasA GTPase e a RhoA GTPase, ambas encontradas durante o proteoma de conídios.

Em *A. fumigatus* a deleção do gene *RasA* levou a uma redução na germinação da fase filamentosa e nas taxas de crescimento radial, envolvendo, também, graves defeitos na morfologia das hifas (Fortwendel et al. 2008). Estudos feitos por Oshero & May (2000) demonstraram que o conídio mutante

de *Aspergillus nidulans* RasA^{G17V} que superexpressa a proteína RasA foi submetido a meios com privação de glicose, no qual foi possível observar o aumento das células, reorganização celular e a adesão. Por outro lado, os conídios do tipo selvagem não sofreram mudanças morfológicas nessas condições. Entretanto, a inclusão de glicose nos meios resultou no crescimento normal de ambas as cepas (Osherov & May 2000). Esses resultados indicam que a via de sinalização de Ras desempenha um papel importante nos processos iniciais de germinação de conídios. Esta proteína foi identificada durante o proteoma de conídios de *Paracoccidioides* presente na membrana plasmática e possivelmente poderá estar relacionada aos processos de transição dimórfica do fungo.

Outra proteína envolvida na transdução de sinal, organização do citoesqueleto e no crescimento polarizado da célula é a RhoA GTPase (Proteína homóloga à RAS), foi identificada durante as análises. Em estudos realizados para verificar os estágios iniciais de transição *P. brasiliensis* micélio para levedura na presença do hormônio estradiol, Shankar et al. (2011) observaram uma redução nos transcritos das proteínas RhoA GTPase e palmitoiltransferase 'erf2', envolvidas em vias de sinalização, ocasionando a diminuição da expressão dessas proteínas, inibindo a diferenciação da fase filamentosa para a fase leveduriforme (Shankar et al. 2011). Desta forma, provavelmente, estas proteínas estão vinculadas a mudanças morfológicas necessárias para a transição de conídios de *Paracoccidioides* para a fase leveduriforme.

Durante as análises foi identificada também a calmodulina, outra proteína que desempenha funções referentes as vias de sinalização celular. A calmodulina (CaM) contem quatro motivos de ligação ao Ca²⁺, e sofre uma mudança conformacional sobre a ligação de Ca²⁺, resultando no complexo Ca²⁺/CaM. Esta ligação tem como função regular um número de proteínas efetoras incluindo proteínas cinases dependente de Ca²⁺/CaM (Chin & Means 2000; Soderling & Stull 2001).

Em experimentos realizados por Dickman et al. (1995), utilizaram uma antagonista da calmodulina em conídios do *Colletotrichum trifolii*. Através destas análises, foi possível verificar a inibição completa da germinação e formação de oressório dos conídios a uma concentração de 3 µM de solução

antagonista, sugerindo que a calmodulina está envolvida nos processos de transição dimórfica deste fungo (Dickman et al. 1995). Com base nesses dados, sugerimos que a calmodulina desempenha um possível papel nos processos de mudanças morfológicas em conídios de *Paracoccidioides*, uma vez que, essa proteína está relacionada a mudanças morfológicas em outros fungos dimórficos.

A quebra da dormência em conídios de fungos filamentos necessita da presença de nutrientes como açúcares, aminoácidos ou moléculas inorgânicas (Osherov & May 2001). Onde essas condições ambientais são sinalizadas para a célula através das vias de transdução de sinais por receptores Ras/MAPK e cAMP/PKA (van Leeuwen et al. 2013). Segundo Garcia et al. (2010), ao analisarem a expressão gênica e *P. brasiliensis* observaram uma alta porcentagem, em média 27% dos genes preditos estavam relacionados a sequências de transdução de sinais (Garcia et al. 2010).

6.2. Glicoproteínas preditas como adesinas encontradas na parede celular de conídios de *Paracoccidioides*

A germinação em conídios é caracterizada pelo aumento de suas propriedades adesivas, onde a adesão inicial é resultante de uma pré-camada existente de glicoproteínas da parede celular (Osherov & May 2001). A glicoproteína ECM33 foi identificada durante as análises.

Em estudos realizados por Levdansky et al. (2010) em conídios de *A. fumigatus*, foi realizada a deleção de 2 genes, o *cspA* e *ECM33*, afim de verificar a adesão de conídios em células epiteliais alveolares humanas A549. Durante os experimentos, as células mutantes apresentaram uma redução na adesão em relação às células do tipo selvagem. Além disso, através de microscopia de transmissão eletrônica, foi possível visualizar nos conídios mutantes uma formação irregular da parede celular. Contudo, isto sugere que os conídios da cepa mutante com dupla deleção podem ter sofrido modificações estruturais graves que diminuíram a sua capacidade de adesão à componentes da matriz extracelular (Levdansky et al. 2010). Com base nesse dado, a identificação dessa proteína em conídios de *Paracoccidioides* sugere,

uma possível função de adesão das células conidiais nos momentos iniciais de contato com as células do hospedeiro.

A β -1,3-glucanosiltransferase Gel2 também foi identificada durante as análises proteômicas de conídios de *Paracoccidioides*. Em estudos realizados por Mouyna et al. (2005), foi feito um mutante da Gel2, resultando na diminuição do conteúdo de β -1,3-glucana, no crescimento mais lento, na atenuação da virulência e na anormalidade de conídios durante a conidiogênese (Mouyna et al. 2005). A identificação desta proteína durante as análises, sugere sua importante função nos processos iniciais de produção dos conídios de *Paracoccidioides* durante a conidiogênese.

6.3. Proteínas de adesão para invasão das células hospedeiras.

Um dos processos principais para o estabelecimento da infecção nos pulmões, levando subsequentemente a disseminação do patógeno para outros órgãos é a adesão de células fúngicas às células do hospedeiro (Coulot et al. 1994). Em estudos realizados com adesinas, proteínas da matriz extracelular estão diretamente envolvidas na aderência de uma variedade de patógenos, tais como, os conídios de *A. fumigatus* e leveduras de *P. brasiliensis* (Barbosa et al. 2006; Gil et al. 1996).

Em nossos estudos foram identificadas algumas proteínas que já foram descritas na literatura relacionadas a adesão do fungo a componentes da matriz extracelular, tais como: Enolase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, malato sintase e triose-fosfato isomerase.

Algumas dessas enzimas estão relacionadas à glicólise, como enolase, fosfoglucomutase e gliceraldeído-3-fosfato, que em estudos anteriores foram preferencialmente induzidas durante o processo de transição da fase miceliana para a fase leveduriforme. Estudos feitos por Rezende et al. (2012) constataram o aumento dos níveis de transcritos que codificam a enzima enolase durante a transição micélio-levedura e conídio-levedura. O aumento dos níveis desses transcritos, possivelmente, podem estar relacionados com o aumento da expressão das proteínas, como demonstrado por análises proteômicas (Rezende et al. 2011). Desta maneira, conídios de

Paracoccidioides sp, isolado 01, provavelmente, pode expressar essas enzimas durante o processo de transição para levedura, ou para micélio, sendo uma forma de adaptação tanto ao meio ambiente, quanto ao ambiente hospedeiro.

A enolase também foi identificada durante as análises e tem sido descrita como uma proteína que pode exercer várias funções, além de participar da via glicolítica em vários organismos. Em *P. brasiliensis*, a enzima apresenta múltiplas localizações celulares, quando localizada na parede celular ou secretada, potencialmente desempenha um papel no estabelecimento da PCM sugerindo um envolvimento na patogênese de *P. brasiliensis*, e mediando à ligação do fungo ao plasminogênio (Nogueira et al. 2010). A enolase também foi descrita como ligante de plasminogênio em outros organismos como *C. neoformans* (Stie et al. 2009) e *Candida albicans* (Jong et al. 2003). Desta maneira, a enolase identificada nas análises proteômicas de conídios de *Paracoccidioides*, possivelmente estão relacionados aos mecanismos de adesão deste às células do hospedeiro, bem como também atua na via glicolítica para a oxidação da glicose.

Foi encontrada também, no proteoma dos conídios de *Paracoccidioides* a enzima triosefosfato isomerase, que em leveduras se liga à laminina e à fibronectina (Pereira et al. 2007), a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), que se liga à fibronectina, colágeno do tipo I e à laminina (Barbosa et al. 2006), e a malato sintase que também atua ligando-se à fibronectina e ao colágeno tipo I e IV sendo que estas também se encontraram na parede celular fúngica de *P. brasiliensis* para mediar a adesão de células cultivadas *in vitro* (da Silva Neto et al. 2009) e estas, podem estar relacionadas a adesão dos conídios às células do hospedeiro nos estágios iniciais da infecção.

A GAPDH é importante nos estágios precoces da infecção fúngica e foi identificada durante as análises proteômicas de micélio, levedura e também identificada no proteoma de conídios de *Paracoccidioides*. Barbosa et al. (2006) trataram pneumócitos com rGAPDH e incubaram células leveduriformes de *P. brasiliensis* com o anticorpo policlonal anti-GAPDH, isso resultou na inibição da adesão e da infecção das células epiteliais (Barbosa et al. 2006).

Em 2004, Barbosa et al. demonstraram a presença de GAPDH em maiores quantidades na fase leveduriforme de *P. brasiliensis* do que na fase

miceliana, sugerindo um possível papel de GAPDH na fase parasitária deste fungo. Além disso, estudos demonstraram que esta proteína está localizada na parede celular de *P. brasiliensis* e foi capaz de interagir com os componentes da MEC, como laminina, fibronectina e colágeno tipo I, e que *P. brasiliensis* parece ter várias proteínas envolvidas em sua adesão (Nogueira et al. 2010).

Hernandez et al. (2011), verificaram que a expressão de GAPDH em conídios de *Paracoccidioides* eram diferencialmente reguladas durante a transição conídio-levedura. De 1 a 3 horas, eles observaram o aumento dos níveis de GAPDH, com declínio gradual na sua expressão de 6-48 horas. Após 72 horas observou-se um aumento sustentado até que a transição para a fase leveduriforme fosse completada (Hernandez et al. 2011).

Neste trabalho, GAPDH foi uma das proteínas encontradas durante o proteoma de conídios. Nesses propágulos ela provavelmente poderá exercer uma possível função de adesina sendo importante durante os primeiros contatos do patógeno com a célula do hospedeiro.

6.4. Proteínas relacionadas aos estresse oxidativo

Enzimas como catalase, superoxidase, tioredoxina tem a função de proteger as células conidiais do estresse oxidativo que pode ocorrer durante o transporte desses propágulos pelo ar ou após o início da germinação (van Leeuwen et al. 2013).

Durante as análises de proteínas de conídios, proteínas como, tioredoxina, peroxirredoxina mitocondrial PRX1 e catalase B foram identificadas e possivelmente estão relacionadas ao estresse oxidativo causado devido aos mecanismos de defesa do hospedeiro.

Um dos mais importantes mecanismos de defesa contra os micro-organismos que o hospedeiro produz é a formação de intermediários reativos de oxigênio (ROI) e nitrogênio (RNI) e constitui um dos principais fatores de virulência entre as espécies resistentes aos ROS (espécies reativas ao oxigênio) (Nathan & Shiloh 2000). Os danos oxidativos exercidos sobre os lipídios da membrana plasmática pelo H₂O₂ podem resultar na perda da integridade da membrana, ocasionando mudanças na sua conformação devido

a ROS, conduzindo à formação de peróxidos lipídicos que, quando degradados, geram aldeídos de cadeia curta (Esterbauer et al. 1990; Halliwell & Gutteridge 2007).

Em estudos realizados em nosso laboratório por Rezende et al. (2012), foi identificada uma proteína antioxidante de defesa contra os ROS, peroxirredoxina mitocondrial PRX1, abundante na fase miceliana. Neste sentido a enzima peroxirredoxina mitocondrial PRX1 encontrada em conídios de *Paracoccidioides* sp, isolado 01, possivelmente poderá exercer funções antioxidantes durante os processos iniciais de infecção no hospedeiro.

Em trabalho realizado por Arruda Grossklaus et al. (2013), leveduras de *P. brasiliensis* tiveram uma significativa indução de proteínas como catalase e tioredoxina em resposta ao tratamento com H₂O₂ entre o período de 2 a 6 horas. O aumento na expressão dessas proteínas antioxidantes, tais como peroxissomal catalase e tioredoxina, demonstraram ser capaz de combater o estresse oxidativo gerado pelo H₂O₂ desde o início do tratamento até o término, sugerindo que em conídios de *Paracoccidioides* essas proteínas podem atuar como moléculas antioxidante.

Estudos realizados com conídios de *B. bassiana* por Wang et al. (2013), observaram que em mutantes do gene catalase a atividade antioxidante da células diminuía em 89% (Δ catB) e 56% (Δ catP) comparado ao tipo selvagem. Todos os mutantes *knockout* apresentaram uma redução significativa na capacidade antioxidante de seus conídios, seguido por alterações fenotípicos notáveis (Wang et al. 2013).

A detecção da catalase B durante nossas análises, sugere uma possível função de proteção do conídio de *Paracoccidioides* sp, isolado 01, em que a expressão dessas enzimas antioxidantes podem ser importantes na ativação de dos mecanismos de defesa antes do processo inicial de interação com o hospedeiro.

6.5. Proteínas relacionadas aos estresse térmico

A expressão de proteínas relacionadas à defesa celular e virulência, eventualmente estão relacionadas às condições adversas que o fungo está

submetido. Essas proteínas são expressas quando o organismo se encontra em constantes mudanças de temperatura, ou em contato com moléculas que o hospedeiro produz em busca da destruição do patógeno (JAKOB & BUCHNER, 1994; LINDQUIST & CRAIG, 1988). Durante as análises das proteínas dos conídios de *Paracoccidioides*, constatamos a presença de duas proteínas relacionadas ao estresse térmico: A HSP90 e HSP70.

Uma das características mais importantes da HSP90 é sua atividade de ATPase, permitindo as funções de chaperona desta proteína. (Nadeau et al. 1993). Estudos em *P. brasiliensis* encontraram grande quantidade de HSP90 tanto na fase leveduriforme, quanto na fase miceliana (Goldman et al. 2003; Rappleye & Goldman 2006). Nicola et al. (2008) constataram que, em *C. albicans*, o papel de HSP90 é requerida para a transição de levedura-micélio, uma adaptação essencial para a virulência do patógeno (Nicola et al. 2008). Tais evidências indicam que possivelmente essas proteínas são importantes para adaptação térmica de conídios de *Paracoccidioides* ao ambiente hospedeiro, especialmente após as primeiras horas de contato e, posteriormente, na sua transição para a fase leveduriforme dentro do hospedeiro.

Outra proteína identificada durante as análises proteômicas foi a HSP70. A HSP70 é uma proteína citoplasmática que pode ser detectada também na superfície celular de fungos. Quando ligadas a membrana plasmática, as proteínas HSP70 podem ativar macrófagos e estar relacionadas aos mecanismos de adesão celular, o tráfico molecular e internalização macromolécula (Asea et al. 2000; Guimaraes et al. 2011; Vega et al. 2008).

Silveira et al. (2013) realizaram estudos de virulência em *Cryptococcus neoformans* com o objetivo de avaliar o papel de adesão da HSP70 e a sua capacidade de estimular a fagocitose. Inicialmente os macrófagos foram tratados com a rHSP70 do fungo com posterior incubação das células fúngica nos meios contendo os macrófagos tratados. Após etapa observou-se uma redução na produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos tratados. Eles consideraram que rHsp70 poderia reduzir a produção de NO e inibir a ativação de macrófagos, evitando a morte de células fúngicas pelo mecanismo oxidativo da célula fagocítica (Silveira et al. 2013). Em nossas análises a HSP70 foi predita como secretada e provavelmente está relacionada aos processos

iniciais de interação patógeno-hospedeiro, onde pode atuar nos primeiros mecanismos de defesa da célula fúngica.

6.6. Conídios de *Paracoccidioides* sp, isolado 01 possuem grandes quantidades de proteínas ribossomais.

Durante as análises proteômicas de conídios de *Paracoccidioides* sp, isolado 01, verificou-se que 21% das proteínas identificadas estavam relacionadas à síntese proteica. Para compreender melhor o alto índice de proteínas relacionadas a síntese proteica, utilizou-se a análise de abundância relativa das proteínas. Através desta análise, foi possível constatar que 16% do total de proteínas conidiais estão relacionadas aos processos de síntese proteica, confirmando ser uma classe funcional abundante em proteínas. Este grupo é composto, em sua maioria, por proteínas ribossomais e fatores de alongação.

Em 1970, Hollomon sugeriu que os processos de síntese proteica são essenciais para a germinação em *A. fumigatus* e *N. crassa*, mais não em outros fungos como *F. solani* (Hollomon 1970). Mirkes em 1974, descreveu que os conídios possuem grandes níveis de ribossomos livres, e quando na presença de uma fonte de carbono associam-se a RNAm e em 15 minutos ocorrem a formação de polirribossomos (Mirkes 1974). Esses resultados, segundo Osherov & May (2001) sugerem que os conídios contém um pool pré-existent de ribossomos e RNAm, e quando em presença de nutrientes leva uma rápida ativação e tradução proteínas (Osherov & May 2001).

Desta maneira, os grandes índices de proteínas ribossomais presentes em conídios de *Paracoccidioides* sp, isolado 01, podem estar relacionados a uma rápida ativação do conídio, quando em tecidos hospedeiros, levando a síntese de proteínas essenciais para as mudanças morfológicas e ocasionando o estabelecimento da interação patógeno-hospedeiro.

6.7. Metabolismo em conídios

Vários eventos moleculares ocorrem quando o conídio alcança um meio com ar, água ou nutrientes, ele rapidamente sofre mudanças nas propriedades de suas membranas o que pode ser evidenciado pelo aumento de proteínas de adesão. Ao mesmo tempo, várias vias metabólicas são ativadas tais como respiração, síntese de RNA e proteína e mudanças ocorrem na composição da sua parede celular, no entanto há uma certa dificuldade para diferenciar entre os verdadeiros eventos de sinalização e o aumento essencial do metabolismo e atividades *housekeeping* que ocorrem durante o início do processo de germinação (Osherov & May 2001).

No presente estudo várias vias relacionadas à produção aeróbia de energia como a glicólise, ciclo do ácido cítrico, fosforilação oxidativa, via das pentoses-fosfato e β -oxidação de lipídios foram descritas no proteoma de conídios. Essa condição é esperada, uma vez que o conídio é uma célula metabolicamente dormente, o que reflete em suas propriedades adaptativas.

Os fungos filamentosos podem usar a glicólise como fonte de carbono e essa habilidade reflete em um importante papel metabólico na patogenicidade (Roumelioti et al. 2010). A indução da via glicolítica pode ser representada pela expressão de enzimas como a piruvato quinase, enolase, entre outras proteínas da via.

A indução da via das pentoses-fosfato foi demonstrada com a expressão da transaldolase e transcetolase. Esta é a principal via para reciclar o NADP⁺ para NADPH e para a produção da ribose-5-fostato, onde a transaldolase é a enzima chave nessa via não-oxidativa (Rezende et al. 2011). Adicionalmente, o estresse oxidativo regula a produção de NADPH. Esse agente redutor é importante para a biossíntese e mantém um ambiente necessário para a atividade da célula, o que sugere que este ambiente redutor foi necessário para responder as condições quiescentes do conídio, uma vez que a indução dessas enzimas podem refletir um estágio de resposta que pode ser

ativado/induzido quando o fungo estiver em contato com o hospedeiro (Rui et al. 2010).

A β -oxidação de lipídios ocorre através da ativação do ciclo do glioxilato com a expressão das proteínas malato sintase, e aconitase, e do ciclo do metilcitrato com a expressão da metilcitrato sintase e malato desidrogenase. De acordo com Rezende et al. (2011), o metabolismo de lipídios pode fornecer fontes de carbono e energia para *P. brasiliensis* durante os eventos de transição dimórfica de micélio para levedura (Lorenz & Fink 2002; Munoz-Elias et al. 2006).

Diante desse exposto, o metabolismo de conídio de *Paracoccidioides* está ativado durante esta fase, de forma que a célula está com um arsenal de proteínas expressas, tais como proteínas antioxidantes, proteínas de choque térmico, adesinas, fatores de virulência o que o habilitaria a viver no meio ambiente e facilitaria a sua adaptação nos processos iniciais de contato com os tecidos hospedeiros.

7. CONCLUSÕES

Com métodos para a produção e purificação de conídios de *Paracoccidioides* sp, juntamente com a identificação de peptídeos e análises de bioinformática foi possível caracterizar o proteoma da forma de propagação do fungo. Este estudo foi o primeiro a utilizar a caracterização de proteínas em conídios de *Paracoccidioides*. Do total de proteínas identificadas em conídios de *Pb01*, duzentas e quarenta e duas proteínas foram classificadas funcionalmente, envolvidas em processos como: Produção de energia, resposta ao estresse e síntese de proteínas. Durante análises, a classe funcional referente a síntese proteica foi a que apresentou maior abundância de proteínas, sugerindo que o conídio de *Paracoccidioides* em resposta a um estímulo é ativado ocasionando uma síntese proteica eficiente para a diferenciação celular. Foram encontradas proteínas relacionadas aos processos de estresses, demonstrando que conídio é altamente adaptado para viver tanto no meio ambiente quanto ao ambiente hospedeiro. Também foram identificados vários fatores de virulência, tais como, adesinas e proteínas relacionadas a vias de transdução de sinais; Ambas descritas na literatura como sendo essenciais para o estabelecimento da infecção.

Esses resultados proteômicos de conídios de *Pb01* são de grande importância, devido a fornecer informações adicionais para a compreensão do metabolismo do conídio e sobre a biologia do fungo.

8. PERSPECTIVAS

- Realizar análises proteômicas de diferenciação celular conídio para leveduras em diferentes tempos de crescimento;
- Simular o processo de infecção e analisar a resposta do conídio frente a essas condições adversas.
- Caracterizar o proteoma de outros isolados de *Paracoccidioides brasiliensis* e fazer comparações com os resultados presente estudo.

9. ANEXOS

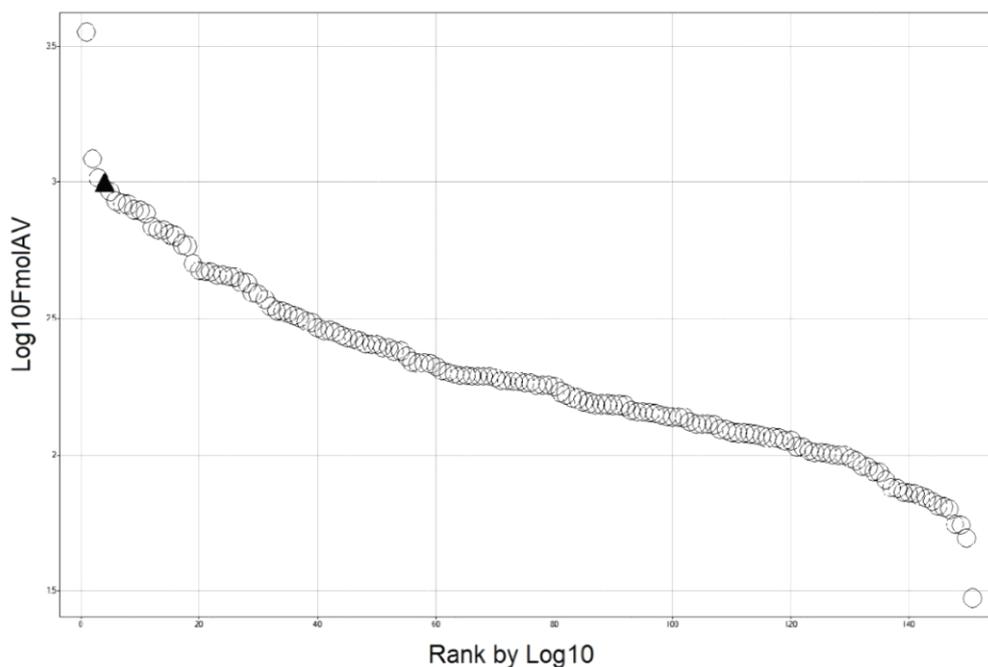


Figura suplementar 1: Faixa de detecção dinâmica das proteínas de conídios de *Pb01*. Os gráficos mostram a faixa de detecção das proteínas de acordo com sua abundância e peso molecular em conídios de *Pb01*. Proteínas identificadas de forma regular (circulo) e o padrão endógeno, PHB (triângulo) são mostrados.

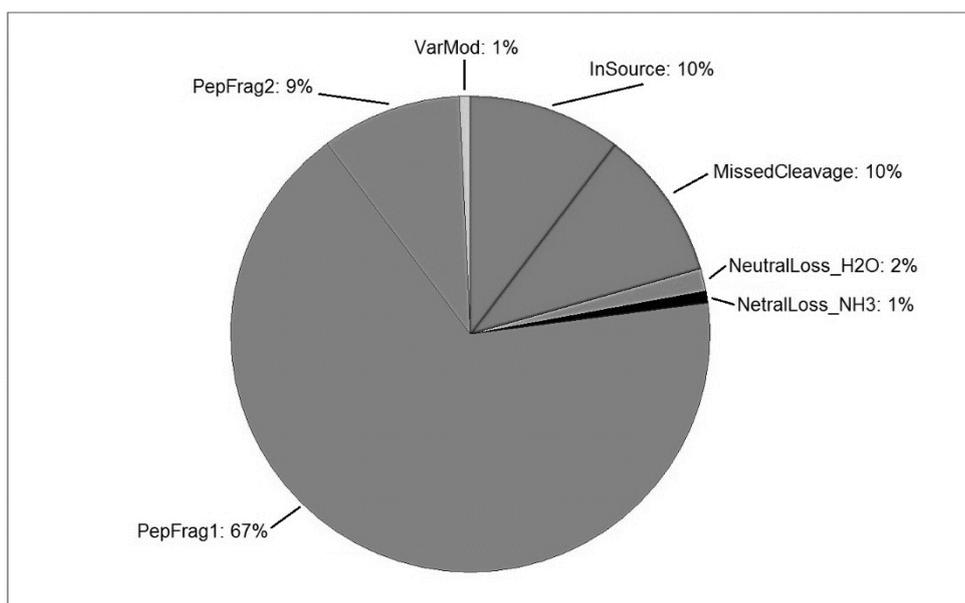


Figura suplementar 2: Tipo de detecção dos peptídeos. O gráfico de pizza mostram as porcentagens do tipo de detecção dos peptídeos em conídios de *Pb01*. PepFrag1 e PepFrag2 indica o tipo de correspondência na identificação quando comparados ao banco dados do *Paracoccidoides* pelo PLGS; VarMod, modificações variáveis; InSource, corresponde a fragmentação ocorrida na fonte de ionização; MissedCleavage, perda de clivagem pela tripsina; NeutralLoss H2O, NH3 e H3PO4, correspondente às perdas de precursores de água, amônia e ácido fosfórico, respectivamente.

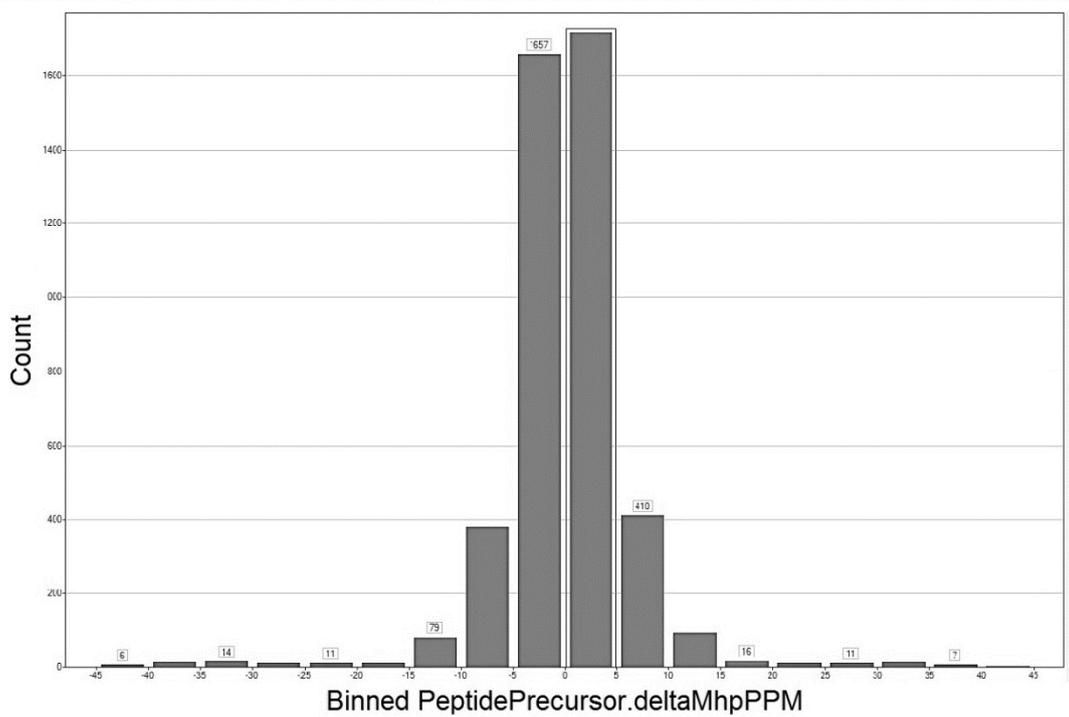


Figura suplementar 3: Análise de precisão na detecção de massa. Os gráficos mostram acurácia na detecção das massas dos peptídeos em conídios de *Pb01*.

REFERÊNCIAS

Ajello L, Polonelli L 1985. Imported paracoccidioidomycosis: a public health problem in non-endemic areas. *European journal of epidemiology*, 1, 160-165.

Andreotti PF, Monteiro da Silva JL, Bailao AM, Soares CM, Benard G, Soares CP, Mendes-Giannini MJ 2005. Isolation and partial characterization of a 30 kDa adhesin from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 7, 875-881.

Asea A, Kraeft SK, Kurt-Jones EA, Stevenson MA, Chen LB, Finberg RW, Koo GC, Calderwood SK 2000. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nature medicine*, 6, 435-442.

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. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 6, 344-351.

Bagagli E, Franco M, Bosco Sde M, Hebelers-Barbosa F, Trinca LA, Montenegro MR 2003. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. *Medical mycology*, 41, 217-223.

Bailao AM, Nogueira SV, Rondon Caixeta Bonfim SM, de Castro KP, de Fatima da Silva J, Mendes Giannini MJ, Pereira M, de Almeida Soares CM 2012. Comparative transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* during in vitro adhesion to type I collagen and fibronectin: identification of potential adhesins. *Research in microbiology*, 163, 182-191.

Barbosa MS, Bao SN, Andreotti PF, de Faria FP, Felipe MS, dos Santos Feitosa L, Mendes-Giannini MJ, Soares CM 2006. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. *Infection and immunity*, 74, 382-389.

Barrozo LV, Mendes RP, Marques SA, Benard G, Silva ME, Bagagli E 2009. Climate and acute/subacute paracoccidioidomycosis in a hyper-endemic area in Brazil. *International journal of epidemiology*, 38, 1642-1649.

Beck J, Echtenacher B, Ebel F 2013. Woronin bodies, their impact on stress resistance and virulence of the pathogenic mould *Aspergillus fumigatus* and their anchoring at the septal pore of filamentous Ascomycota. *Molecular microbiology*, 89, 857-871.

Bhadauria V, Zhao WS, Wang LX, Zhang Y, Liu JH, Yang J, Kong LA, Peng YL 2007. Advances in fungal proteomics. *Microbiological research*, 162, 193-200.

Bialek R, Ibricevic A, Aepinus C, Najvar LK, Fothergill AW, Knobloch J, Graybill JR 2000. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in tissue samples by a nested PCR assay. *Journal of clinical microbiology*, 38, 2940-2942.

Bocca AL, Amaral AC, Teixeira MM, Sato PK, Shikanai-Yasuda MA, Soares Felipe MS 2013. Paracoccidioidomycosis: eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. *Future microbiology*, 8, 1177-1191.

Bohmer M, Colby T, Bohmer C, Brautigam A, Schmidt J, Bolker M 2007. Proteomic analysis of dimorphic transition in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Proteomics*, 7, 675-685.

Borelli D 1961. Hipótesis sobre la ecología de *Paracoccidioides*. *Dermatol. Venezolana* 3, 130-132.

Brummer E, Castaneda E, Restrepo A 1993. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clinical microbiology reviews*, 6, 89-117.

Bruneau JM, Magnin T, Tagat E, Legrand R, Bernard M, Diaquin M, Fudali C, Latge JP 2001. Proteome analysis of *Aspergillus fumigatus* identifies

glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins associated to the cell wall biosynthesis. *Electrophoresis*, 22, 2812-2823.

Bustamante-Simon B, McEwen JG, Tabares AM, Arango M, Restrepo-Moreno A 1985. Characteristics of the conidia produced by the mycelial form of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sabouraudia*, 23, 407-414.

Carrero LL, Nino-Vega G, Teixeira MM, Carvalho MJ, Soares CM, 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 genetics and biology : FG & B*, 45, 605-612.

Catano JC, Aguirre HD 2013. Disseminated paracoccidioidomycosis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 88, 407-408.

Chaudhuri R, Ansari FA, Raghunandan MV, Ramachandran S 2011. FungalRV: adhesin prediction and immunoinformatics portal for human fungal pathogens. *BMC genomics*, 12, 192.

Chin D, Means AR 2000. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends in cell biology*, 10, 322-328.

Cole GT, Sun SH 1985. Arthroconidium-spherule-endospore transformation in *Coccidioides immitis*. In PJ Szaniszlo (ed) *Fungal Dimorphism*, 282-333.

Colombo AL, Tobon A, Restrepo A, Queiroz-Telles F, Nucci M 2011. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. *Medical mycology*, 49, 785-798.

Conant NF, Howell A 1942. The similarity of the fungi causing South American Blastomycosis (paracoccidioidomycosis) and North American blastomycosis (Gilchrist disease). *J Investigat Dermatol*, 5, 353-370.

Conti Dias IA 2007. On the unknown ecological niche of *Paracoccidioides brasiliensis*: our hypothesis of 1989: present status and perspectives. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 49, 131-134.

Corredor GG, Peralta LA, Castano JH, Zuluaga JS, Henao B, Arango M, Tabares AM, Matute DR, McEwen JG, Restrepo A 2005. The naked-tailed armadillo *Cabassous centralis* (Miller 1899): a new host to *Paracoccidioides brasiliensis*. Molecular identification of the isolate. *Medical mycology*, 43, 275-280.

Coulot P, Bouchara JP, Renier G, Annaix V, Planchenault C, Tronchin G, Chabasse D 1994. Specific interaction of *Aspergillus fumigatus* with fibrinogen and its role in cell adhesion. *Infection and immunity*, 62, 2169-2177.

Coutinho ZF, Silva D, Lazera M, Petri V, Oliveira RM, Sabroza PC, Wanke B 2002. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cadernos de saude publica*, 18, 1441-1454.

da Silva Neto BR, de Fatima da Silva J, Mendes-Giannini MJ, Lenzi HL, de Almeida Soares CM, Pereira M 2009. The malate synthase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a linked surface protein that behaves as an anchorless adhesin. *BMC microbiology*, 9, 272.

da Silva SP, Borges-Walmsley MI, Pereira IS, Soares CM, Walmsley AR, Felipe MS 1999. Differential expression of an hsp70 gene during transition from the mycelial to the infective yeast form of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Molecular microbiology*, 31, 1039-1050.

De Albornoz MB 1971. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. *Sabouraudia*, 9, 248-253.

de Bastos Ascenco Soares R, Gomez FJ, de Almeida Soares CM, Deepe GS, Jr. 2008. Vaccination with heat shock protein 60 induces a protective immune response against experimental *Paracoccidioides brasiliensis* pulmonary infection. *Infection and immunity*, 76, 4214-4221.

Desjardins CA, Champion MD, Holder JW, Muszewska A, Goldberg J, Bailao AM, Brigido MM, Ferreira ME, Garcia AM, Grynberg M, Gujja S, Heiman DI, Henn MR, Kodira CD, Leon-Narvaez H, Longo LV, Ma LJ, Malavazi I, Matsuo AL, Morais FV, Pereira M, Rodriguez-Brito S, Sakthikumar S, Salem-Izacc SM, Sykes SM, Teixeira MM, Vallejo MC, Walter ME, Yandava C, Young S, Zeng Q, Zucker J, Felipe MS, Goldman GH, Haas BJ, McEwen JG, Nino-Vega G, Puccia R, San-Blas G, Soares CM, Birren BW, Cuomo CA 2011. Comparative genomic analysis of human

fungal pathogens causing paracoccidioidomycosis. *PLoS genetics*, 7, e1002345.

Dickman MB, Buhr TL, Warwar V, Truesdell GM, Huang CX 1995. Molecular Signals during the Early Stages of Alfalfa Anthracnose. *Can J Bot*, 73, S1169-S1177.

Drakulovski P, Dunyach C, Bertout S, Reynes J, Mallie M 2011. A *Candida albicans* strain with high MIC for caspofungin and no FKS1 mutations exhibits a high chitin content and mutations in two chitinase genes. *Medical mycology*, 49, 467-474.

Espunhardi KC, Souza VC, Filho RB, Filho MA 2010. Eficácia do controle farmacológico da paracoccidioidomicose no município de Cacoal – RO. *Uningá Review*, 3, n. 4, 56 – 64.

Esterbauer H, Zollner H, Schaur RJ 1990. Membrane Lipid Oxidation. *CRC Press, Inc., Boca Raton*.

Fagundes-Pereyra WJ, Carvalho GT, Goes AM, das Chagas Lima e Silva F, de Sousa AA 2006. [Central nervous system paracoccidioidomycosis: analysis of 13 cases]. *Arquivos de neuro-psiquiatria*, 64, 269-276.

Fava-Netto C 1955. Estudos quantitativos sobre a fixação do complemento na Blastomicose Sul-Americana com antígenos polissacarídicos. *Arquivos de Cirurgia Clínica*, 18, 197-254.

Fortwendel JR, Fuller KK, Stephens TJ, Bacon WC, Askew DS, Rhodes JC 2008. *Aspergillus fumigatus* RasA regulates asexual development and cell wall integrity. *Eukaryotic cell*, 7, 1530-1539.

Franco M 1987. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *Journal of medical and veterinary mycology : bi-monthly publication of the International Society for Human and Animal Mycology*, 25, 5-18.

Franco M, Montenegro MR, Mendes RP, Marques SA, Dillon NL, Mota NG 1987. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 20, 129-132.

Franco M, Peracoli MT, Soares A, Montenegro R, Mendes RP, Meira DA 1993. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *Current topics in medical mycology*, 5, 115-149.

Franco M, Sano A, Kera K, Nishimura K, Takeo K, Miyaji M 1989. Chlamydospore formation by *Paracoccidioides brasiliensis* mycelial form. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 31, 151-157.

Garcia AM, Hernandez O, Aristizabal BH, De Souza Bernardes LA, Puccia R, Naranjo TW, Goldman GH, Goldman MH, Cano LE, Restrepo A, McEwen JG 2010. Gene expression analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* transition from conidium to yeast cell. *Medical mycology*, 48, 147-154.

Geromanos SJ, Vissers JP, Silva JC, Dorschel CA, Li GZ, Gorenstein MV, Bateman RH, Langridge JI 2009. The detection, correlation, and comparison of peptide precursor and product ions from data independent LC-MS with data dependant LC-MS/MS. *Proteomics*, 9, 1683-1695.

Gil ML, Penalver MC, Lopez-Ribot JL, O'Connor JE, Martinez JP 1996. Binding of extracellular matrix proteins to *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infection and immunity*, 64, 5239-5247.

Gokce E, Franck WL, Oh Y, Dean RA, Muddiman DC 2012. In-depth analysis of the *Magnaporthe oryzae* conidial proteome. *Journal of proteome research*, 11, 5827-5835.

Goldman GH, dos Reis Marques E, Duarte Ribeiro DC, de Souza Bernardes LA, Quiapin AC, Vitorelli PM, Savoldi M, Semighini CP, de Oliveira RC, Nunes LR, Travassos LR, Puccia R, Batista WL, Ferreira LE, Moreira JC, Bogossian AP, Tekaia F, Nobrega MP, Nobrega FG, Goldman MH 2003. Expressed sequence tag analysis of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase: identification of putative homologues of *Candida albicans* virulence and pathogenicity genes. *Eukaryotic cell*, 2, 34-48.

Graves PR, Haystead TA 2002. Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 66, 39-63; table of contents.

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

Guimaraes AJ, Nakayasu ES, Sobreira TJ, Cordero RJ, Nimrichter L, Almeida IC, Nosanchuk JD 2011. Histoplasma capsulatum heat-shock 60 orchestrates the adaptation of the fungus to temperature stress. *PloS one*, 6, e14660.

Halliwell B, Gutteridge JM 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, Oxford.

Hameed S, Fatima Z 2013. Novel Regulatory Mechanisms of Pathogenicity and Virulence to Combat MDR in *Candida albicans*. *International journal of microbiology*, 2013, 240209.

Haniu AE, Maricato JT, Mathias PP, Castilho DG, Miguel RB, Monteiro HP, Puccia R, Batista WL 2013. Low concentrations of hydrogen peroxide or nitrite induced of *Paracoccidioides brasiliensis* cell proliferation in a Ras-dependent manner. *PloS one*, 8, e69590.

Hernandez O, Garcia AM, Almeida AJ, Tamayo D, Gonzalez A, Restrepo A, McEwen JG 2011. Gene expression during activation of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Yeast*, 28, 771-781.

Hollomon DW 1970. Ribonucleic acid synthesis during fungal spore germination. *Journal of general microbiology*, 62, 75-87.

Jong AY, Chen SH, Stins MF, Kim KS, Tuan TL, Huang SH 2003. Binding of *Candida albicans* enolase to plasmin(ogen) results in enhanced invasion of human brain microvascular endothelial cells. *Journal of medical microbiology*, 52, 615-622.

Joseph EA, Mare A, Irving WR, Jr. 1966. Oral South American blastomycosis in the United States of America. Report of a case. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology*, 21, 732-737.

Jungbluth M, Mosch HU, Taxis C 2012. Acetate regulation of spore formation is under the control of the Ras/cyclic AMP/protein kinase A

pathway and carbon dioxide in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic cell*, 11, 1021-1032.

Kim Y, Nandakumar MP, Marten MR 2007. Proteomics of filamentous fungi. *Trends in biotechnology*, 25, 395-400.

— 2008. The state of proteome profiling in the fungal genus *Aspergillus*. *Briefings in functional genomics & proteomics*, 7, 87-94.

Lacaz CS 1994. *Paracoccidioides brasiliensis*: morphology, evolutionary cycle; maintenance during saprophytic life; biology, virulence, taxonomy. *Ed Paracoccidioidomycosis*, Boca Raton, CRC Press, 13-22.

Lacaz CS, Porto E, Martins CJE 1984. *Micologia médica*. Sarvier, Editores, São Paulo, 190-191.

Lacaz CS, Porto E, Martins JEC 2002. *Tratado de Micología Medica. Paracoccidioidomycose*, 9th Ed. Sao Paulo: Sarvier Publishers, 639-729.

Lau SK, Tse H, Chan JS, Zhou AC, Curreem SO, Lau CC, Yuen KY, Woo PC 2013. Proteome profiling of the dimorphic fungus *Penicillium marneffe* extracellular proteins and identification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as an important adhesion factor for conidial attachment. *The FEBS journal*, 280, 6613-6626.

Leclerc MC, Philippe H, Gueho E 1994. Phylogeny of dermatophytes and dimorphic fungi based on large subunit ribosomal RNA sequence comparisons. *Journal of medical and veterinary mycology : bi-monthly publication of the International Society for Human and Animal Mycology*, 32, 331-341.

Levdansky E, Kashi O, Sharon H, Shadkchan Y, Osherov N 2010. The *Aspergillus fumigatus* cspA gene encoding a repeat-rich cell wall protein is important for normal conidial cell wall architecture and interaction with host cells. *Eukaryotic cell*, 9, 1403-1415.

Lewrenz I, Rietzschel N, Guiard B, Lill R, van der Laan M, Voos W 2013. The functional interaction of mitochondrial Hsp70s with the escort protein Zim17 is critical for Fe/S biogenesis and substrate interaction at the inner

membrane preprotein translocase. *The Journal of biological chemistry*, 288, 30931-30943.

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, 899-909.

Lima Pde S, Casaletti L, Bailao AM, de Vasconcelos AT, Fernandes Gda R, Soares CM 2014. Transcriptional and proteomic responses to carbon starvation in *Paracoccidioides*. *PLoS neglected tropical diseases*, 8, e2855.

Lorenz MC, Fink GR 2002. Life and death in a macrophage: role of the glyoxylate cycle in virulence. *Eukaryotic cell*, 1, 657-662.

Machado JM, Teixeira GA 1965. Das sequelas da blastomicose Sul-Americana. *Hospital*, 68, 141-147.

Mann M, Hendrickson RC, Pandey A 2001. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annual review of biochemistry*, 70, 437-473.

Marcos CM, de Fatima da Silva J, de Oliveira HC, Moraes da Silva RA, Mendes-Giannini MJ, Fusco-Almeida AM 2012. Surface-expressed enolase contributes to the adhesion of *Paracoccidioides brasiliensis* to host cells. *FEMS yeast research*, 12, 557-570.

Marques-da-Silva SH, Rodrigues AM, de Hoog GS, Silveira-Gomes F, Camargo ZP 2012. Occurrence of *Paracoccidioides lutzii* in the Amazon region: description of two cases. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 87, 710-714.

Marques SA 1998. Paracoccidioidomicose. *Anais brasileiros de dermatologia*, 73, 455-469.

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. *Molecular biology and evolution*, 23, 65-73.

McEwen JG, Bedoya V, Patino MM, Salazar ME, Restrepo A 1987. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. *Journal of medical and veterinary mycology : bi-monthly publication of the International Society for Human and Animal Mycology*, 25, 165-175.

McEwen JG, Garcia AM, Ortiz BL, Botero S, Restrepo A 1995. In search of the natural habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Archives of medical research*, 26, 305-306.

Mirkes PE 1974. Polysomes, ribonucleic acid, and protein synthesis during germination of *Neurospora crassa* conidia. *Journal of bacteriology*, 117, 196-202.

Morejon KM, Machado AA, Martinez R 2009. Paracoccidioidomycosis in patients infected with and not infected with human immunodeficiency virus: a case-control study. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 80, 359-366.

Mouyna I, Morelle W, Vai M, Monod M, Lechenne B, Fontaine T, Beauvais A, Sarfati J, Prevost MC, Henry C, Latge JP 2005. Deletion of GEL2 encoding for a beta(1-3)glucanosyltransferase affects morphogenesis and virulence in *Aspergillus fumigatus*. *Molecular microbiology*, 56, 1675-1688.

Munoz-Elias EJ, Upton AM, Cherian J, McKinney JD 2006. Role of the methylcitrate cycle in *Mycobacterium tuberculosis* metabolism, intracellular growth, and virulence. *Molecular microbiology*, 60, 1109-1122.

Murad AM, Souza GH, Garcia JS, Rech EL 2011. Detection and expression analysis of recombinant proteins in plant-derived complex mixtures using nanoUPLC-MS(E). *Journal of separation science*, 34, 2618-2630.

Nadeau K, Das A, Walsh CT 1993. Hsp90 chaperonins possess ATPase activity and bind heat shock transcription factors and peptidyl prolyl isomerases. *The Journal of biological chemistry*, 268, 1479-1487.

Nathan C, Shiloh MU 2000. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 8841-8848.

Neves JA, Bogliolo L 1951. Researches on the etiological agents of the American blastomycosis. I Morphology and Systematic of the Lutz's Disease Agent. *Mycopathologia et mycologia applicata*, 5, 133-142.

Nicola AM, Andrade RV, Dantas AS, Andrade PA, Arraes FB, Fernandes L, Silva-Pereira I, Felipe MS 2008. The stress responsive and morphologically regulated hsp90 gene from *Paracoccidioides brasiliensis* is essential to cell viability. *BMC microbiology*, 8, 158.

Nogueira SV, Fonseca FL, Rodrigues ML, Mundodi V, Abi-Chacra EA, Winters MS, Alderete JF, de Almeida Soares CM 2010. *Paracoccidioides brasiliensis* enolase is a surface protein that binds plasminogen and mediates interaction of yeast forms with host cells. *Infection and immunity*, 78, 4040-4050.

Oakley BR, Kirsch DR, Morris NR 1980. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Analytical biochemistry*, 105, 361-363.

Oh YT, Ahn CS, Kim JG, Ro HS, Lee CW, Kim JW 2010. Proteomic analysis of early phase of conidia germination in *Aspergillus nidulans*. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 47, 246-253.

Oshero N, May G 2000. Conidial germination in *Aspergillus nidulans* requires RAS signaling and protein synthesis. *Genetics*, 155, 647-656.

Oshero N, May GS 2001. The molecular mechanisms of conidial germination. *FEMS microbiology letters*, 199, 153-160.

Parente AF, de Rezende TC, de Castro KP, Bailao AM, Parente JA, Borges CL, Silva LP, Soares CM 2013. A proteomic view of the response of *Paracoccidioides* yeast cells to zinc deprivation. *Fungal biology*, 117, 399-410.

Pereira LA, Bao SN, Barbosa MS, da Silva JL, Felipe MS, de Santana JM, Mendes-Giannini MJ, de Almeida Soares CM 2007. Analysis of the *Paracoccidioides brasiliensis* triosephosphate isomerase suggests the potential for adhesin function. *FEMS yeast research*, 7, 1381-1388.

Peterson SW, Sigler L 1998. Molecular genetic variation in *Emmonsia crescens* and *Emmonsia parva*, etiologic agents of adiaspiromycosis, and their phylogenetic relationship to *Blastomyces dermatitidis* (*Ajellomyces dermatitidis*) and other systemic fungal pathogens. *Journal of clinical microbiology*, 36, 2918-2925.

Pigosso LL, Parente AF, Coelho AS, Silva LP, Borges CL, Bailao AM, Soares CM 2013. Comparative proteomics in the genus *Paracoccidioides*. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 60, 87-100.

Pitarch A, Sanchez M, Nombela C, Gil C 2003. Analysis of the *Candida albicans* proteome. I. Strategies and applications. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 787, 101-128.

Plumb RS, Johnson KA, Rainville P, Smith BW, Wilson ID, Castro-Perez JM, Nicholson JK 2006. UPLC/MS(E); a new approach for generating molecular fragment information for biomarker structure elucidation. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*, 20, 1989-1994.

Pollak L 1971. Aleuriospores of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathologia et mycologia applicata*, 45, 217-219.

Prado M, Silva MB, Laurenti R, Travassos LR, Taborda CP 2009. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, 513-521.

Queiroz-Telles F 1994. *Paracoccidioides brasiliensis* ultrastructural Wndings. *Paracoccidioidomycosis. London, CRC Press*, 27-44.

Ramos ESM, Saraiva LE 2008. Paracoccidioidomycosis. *Dermatologic clinics*, 26, 257-269, vii.

Rappleye CA, Goldman WE 2006. Defining virulence genes in the dimorphic fungi. *Annual review of microbiology*, 60, 281-303.

Restrepo A 1970. A reappraisal of the microscopical appearance of the mycelial phase of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sabouraudia*, 8, 141-144.

— 1978. Paracoccidioidomycosis. *Acta. Med. Colomb*, 3, 33-36.

— 1985. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *Sabouraudia*, 23, 323-334.

— 1988. Immune response to *Paracoccidioides brasiliensis* in human and animal hosts. *Current topics in medical mycology*, 2, 239-277.

Restrepo A, Benard G, de Castro CC, Agudelo CA, Tobon AM 2008. Pulmonary paracoccidioidomycosis. *Seminars in respiratory and critical care medicine*, 29, 182-197.

Restrepo A, Jimenez BE 1980. Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase in a chemically defined culture medium. *Journal of clinical microbiology*, 12, 279-281.

Restrepo A, McEwen JG, Castaneda E 2001. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Medical mycology*, 39, 233-241.

Restrepo A, Moncada LH, Quintero M 1969. Effect of hydrogen ion concentration and of temperature on the growth of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil extracts. *Sabouraudia*, 7, 207-215.

Restrepo A, Salazar ME, Cano LE, Patino MM 1986. A technique to collect and dislodge conidia produced by *Paracoccidioides brasiliensis* mycelial form. *Journal of medical and veterinary mycology : bi-monthly publication of the International Society for Human and Animal Mycology*, 24, 247-250.

Restrepo A, Salazar ME, Cano LE, Stover EP, Feldman D, Stevens DA 1984. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infection and immunity*, 46, 346-353.

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. *Journal of proteomics*, 75, 572-587.

Richini-Pereira VB, Bosco Sde M, Griese J, Theodoro RC, Macoris SA, da Silva RJ, Barrozo L, Tavares PM, Zancope-Oliveira RM, Bagagli E 2008. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed wild animals. *Medical mycology*, 46, 35-40.

Rivitti EA, Aoki V 1999. Deep fungal infections in tropical countries. *Clinics in dermatology*, 17, 171-190; discussion 105-176.

Rotilio D, Della Corte A, D'Imperio M, Coletta W, Marccone S, Silvestri C, Giordano L, Di Michele M, Donati MB 2012. Proteomics: bases for protein complexity understanding. *Thrombosis research*, 129, 257-262.

Roumelioti K, Vangelatos I, Sophianopoulou V 2010. A cryptic role of a glycolytic-gluconeogenic enzyme (aldolase) in amino acid transporter turnover in *Aspergillus nidulans*. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 47, 254-267.

Rubinstein P, Negroni R 1981. Micosis Broncopulmonares del Adulto y del Niño. *Editorial Beta, S.R.L., Buenos Aires, Argentina*, 2nd edn, 197-198.

Rui B, Shen T, Zhou H, Liu J, Chen J, Pan X, Liu H, Wu J, Zheng H, Shi Y 2010. A systematic investigation of *Escherichia coli* central carbon metabolism in response to superoxide stress. *BMC systems biology*, 4, 122.

Sabra A, Bessoule JJ, Atanasova-Penichon V, Noel T, Dementhon K 2014. Host-pathogen interaction and signaling molecule secretion are modified in the dpp3 knockout mutant of *Candida lusitanae*. *Infection and immunity*, 82, 413-422.

San-Blas G 1985. *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall glucans, pathogenicity, and dimorphism. *Current topics in medical mycology*, 1, 235-257.

San-Blas G, Nino-Vega G 2008. *Paracoccidioides brasiliensis*: chemical and molecular tools for research on cell walls, antifungals, diagnosis, taxonomy. *Mycopathologia*, 165, 183-195.

San-Blas G, Nino-Vega G, Iturriaga T 2002. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis,

diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Medical mycology*, 40, 225-242.

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 = Japanese journal of medical mycology*, 40, 1-8.

Santos GD, Ferri PH, Santos SC, Bao SN, Soares CM, Pereira M 2007. Oenothrin B inhibits the expression of PbFKS1 transcript and induces morphological changes in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Medical mycology*, 45, 609-618.

Schmit JC, Brody S 1976. Biochemical Genetics of *Neurospora-Crassa* Conidial Germination. *Bacteriol Rev*, 40, 1-41.

Shankar J, Wu TD, Clemons KV, Monteiro JP, Mirels LF, Stevens DA 2011. Influence of 17beta-estradiol on gene expression of *Paracoccidioides* during mycelia-to-yeast transition. *PloS one*, 6, e28402.

Shikanai-Yasuda MA, Telles Filho Fde Q, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML 2006. [Guidelines in paracoccidioidomycosis]. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 39, 297-310.

Silva-Vergara ML, Martinez R, Chadu A, Madeira M, Freitas-Silva G, Leite Maffei CM 1998. Isolation of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibia, State of Minas Gerais, Brazil. *Medical mycology*, 36, 37-42.

Silveira CP, Piffer AC, Kmetzsch L, Fonseca FL, Soares DA, Staats CC, Rodrigues ML, Schrank A, Vainstein MH 2013. The heat shock protein (Hsp) 70 of *Cryptococcus neoformans* is associated with the fungal cell surface and influences the interaction between yeast and host cells. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 60, 53-63.

Soderling TR, Stull JT 2001. Structure and regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinases. *Chemical reviews*, 101, 2341-2352.

Srinivasa K, Kim NR, Kim J, Kim M, Bae JY, Jeong W, Kim W, Choi W 2012. Characterization of a putative thioredoxin peroxidase prx1 of *Candida albicans*. *Molecules and cells*, 33, 301-307.

Stames EM, O'Toole JF 2013. Mitochondrial aminopeptidase deletion increases chronological lifespan and oxidative stress resistance while decreasing respiratory metabolism in *S. cerevisiae*. *PloS one*, 8, e77234.

Stie J, Bruni G, Fox D 2009. Surface-associated plasminogen binding of *Cryptococcus neoformans* promotes extracellular matrix invasion. *PloS one*, 4, e5780.

Suh MJ, Fedorova ND, Cagas SE, Hastings S, Fleischmann RD, Peterson SN, Perlin DS, Nierman WC, Pieper R, Momany M 2012. Development stage-specific proteomic profiling uncovers small, lineage specific proteins most abundant in the *Aspergillus Fumigatus* conidial proteome. *Proteome science*, 10, 30.

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. *Molecular phylogenetics and evolution*, 52, 273-283.

Tercarioli GR, Bagagli E, Reis GM, Theodoro RC, Bosco Sde M, Macoris SA, Richini-Pereira VB 2007. Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. *BMC microbiology*, 7, 92.

Teutschbein J, Albrecht D, Potsch M, Guthke R, Amanianda V, Clavaud C, Latge JP, Brakhage AA, Kniemeyer O 2010. Proteome profiling and functional classification of intracellular proteins from conidia of the human-pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Journal of proteome research*, 9, 3427-3442.

Theodoro RC, Bagagli E, Oliveira C 2008. Phylogenetic analysis of PRP8 intein in *Paracoccidioides brasiliensis* species complex. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 45, 1284-1291.

Theodoro RC, Teixeira Mde M, Felipe MS, Paduan Kdos S, Ribolla PM, San-Blas G, Bagagli E 2012. Genus *paracoccidioides*: Species recognition and biogeographic aspects. *PloS one*, 7, e37694.

- Uribe F, Zuluaga AI, Leon W, Restrepo A 1987. Histopathology of cutaneous and mucosal lesions in human paracoccidioidomycosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 29, 90-96.
- Van Damme PA, Bierenbroodspot F, Telgts DS, Kwakman JM, De Wilde PC, Meis JF 2006. A case of imported paracoccidioidomycosis: an awkward infection in The Netherlands. *Medical mycology*, 44, 13-18.
- van Leeuwen MR, Krijgsheld P, Bleichrodt R, Menke H, Stam H, Stark J, Wosten HA, Dijksterhuis J 2013. Germination of conidia of *Aspergillus niger* is accompanied by major changes in RNA profiles. *Studies in mycology*, 74, 59-70.
- Vega VL, Rodriguez-Silva M, Frey T, Gehrman M, Diaz JC, Steinem C, Multhoff G, Arispe N, De Maio A 2008. Hsp70 translocates into the plasma membrane after stress and is released into the extracellular environment in a membrane-associated form that activates macrophages. *Journal of immunology*, 180, 4299-4307.
- Viefhues A, Heller J, Temme N, Tudzynski P 2014. Redox systems in botrytis cinerea: impact on development and virulence. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 27, 858-874.
- Vieira Gde D, Alves Tda C, Lima SM, Camargo LM, Sousa CM 2014. Paracoccidioidomycosis in a western Brazilian Amazon State: clinical-epidemiologic profile and spatial distribution of the disease. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 47, 63-68.
- Wang ZL, Zhang LB, Ying SH, Feng MG 2013. Catalases play differentiated roles in the adaptation of a fungal entomopathogen to environmental stresses. *Environmental microbiology*, 15, 409-418.
- Weber SS, Parente AF, Borges CL, Parente JA, Bailao AM, de Almeida Soares CM 2012. Analysis of the secretomes of *Paracoccidioides mycelia* and yeast cells. *PloS one*, 7, e52470.
- Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF, Williams KL 1996. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnology & genetic engineering reviews*, 13, 19-50.

Wittmann-Liebold B, Graack HR, Pohl T 2006. Two-dimensional gel electrophoresis as tool for proteomics studies in combination with protein identification by mass spectrometry. *Proteomics*, 6, 4688-4703.