

5.2.2. Proteoma da fração 2 de parede celular de *P. lutzii* após cultivo na presença de hemoglobina

A fração 2 (F2) de parede celular foi obtida por tratamento de extratos de parede com NaOH 30 mM, de forma que proteínas que são retidas por ligações álcali-sensíveis à parede celular foram extraídas. A Figura 24 consiste em SDS-PAGE dos extratos F2 de parede celular obtidos na presença de hemoglobina e na privação de Fe.

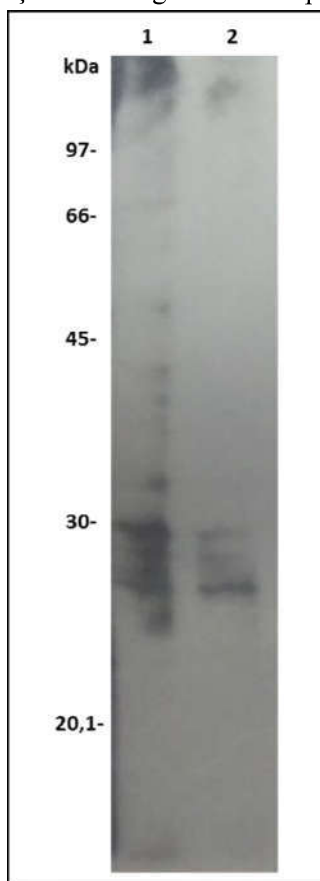


Figura 24. Extratos de fração 2 (F2) de parede celular. Após 48h de cultivo de *P. lutzii* (Pb01) em meio contendo hemoglobina (tratado) ou na privação de Fe (controle) e obtenção da F1 de parede celular, os sedimentos residuais foram tratados com NaOH 30 mM, a 4°C, por 18 horas. Os sobrenadantes foram coletados, os quais correspondem aos extratos de proteínas associadas à parede celular por ligações álcali-sensíveis. Os extratos foram submetidos a SDS-PAGE 12% (v/v): 1 – F2 Hemoglobina; 2 – privação de Fe. Marcador de peso molecular à esquerda. kDa: Quilo Dalton. Gel corado por prata.

Os extratos de F2 também passaram por digestão triptica, cromatografia líquida de alta resolução, em nano escala, acoplada a espectrometria de massas com aquisição independente de dados e, posteriormente, análises de expressão diferencial. As Tabelas 4 e 5 apresentam as proteínas identificadas que apresentaram regulação positiva e negativa, respectivamente.

Tabela 4. Proteínas reguladas positivamente após tratamento de células leveduriformes de *P. lutzii* com hemoglobina durante 48 horas, identificadas na Fração 2 (F2) de parede celular, extraídas por tratamento com NaOH 30 mM.

Código de acesso ^a	Descrição da Proteína ^b	Score ^c	log ₂ Ratio ^d	p ^e	E.C. ^f	Sítio para GPI ^g	Secretome P ≥ 0,6 ^h	Signal P ≥ 0,45 ⁱ
METABOLISMO E ENERGIA								
PAAAG_04401	Aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada	406,17	-	-	2.6.1.42	-	-	-
PAAAG_02354	Serina 3-desidrogenase	636,55	-	-	1.1.1.381 1.1.1.-	-	0,603	-
PAAAG_07339	Complexo E3 ubiquitina ligase SCF, subunidade sconC	7706,19	-	-	-	-	0,706	-
PAAAG_00053	Malato desidrogenase	697,65	-	-	1.1.1.37	-	0,651	-
PAAAG_01534	Piruvato desidrogenase, componente E1, subunidade beta	1123,6	-	-	1.2.4.1	-	0,733	-
PAAAG_02050	Piruvato descarboxilase	451,15	-	-	4.1.1.1	-	-	-
PAAAG_02869	Fosfoglicerato quinase	1927,93	-	-	2.7.2.3	-	-	-
PAAAG_00417	Succinil-CoA ligase, subunidade alfa	1025,23	-	-	6.2.1.4 6.2.1.5	-	0,624	-
PAAAG_06796	Citocromo c oxidase mitocondrial, subunidade 4	699,17	-	-	-	-	-	-
PAAAG_12153	Citocromo c1 mitocondrial, hemoproteína	315,69	-	-	-	-	-	-
PAAAG_00953	NADH-citocromo b5 redutase 2	651,02	-	-	1.6.2.2	-	-	-
PAAAG_04570	ATP sintase, subunidade D	4987,15	-	-	-	-	-	-
PAAAG_04931	Flavoproteína transferidora de elétrons, subunidade beta	381,5	-	-	-	-	-	-
PAAAG_08037	ATP sintase, subunidade beta	6954,59	-	-	3.6.3.14	-	-	-
PAAAG_08088	Complexo citocromo b-c1, subunidade 2	574,84	-	-	-	-	-	-

CICLO CELULAR E PROCESSAMENTO DE DNA									
PAAG_00773	Proteína epsilon da família 14-3-3	1319,17	-	-	-	-	-	-	-
PAAG_12620	Proteína de montagem de nucleossomos	825,76	-	-	-	-	-	-	-
PAAG_08918	Histona H2B	4094,88	-	-	-	-	-	-	-
SÍNTESE PROTÉICA									
PAAG_01050	Proteína ribossomal 60S L30	493,63	-	-	-	-	-	-	-
PAAG_01785	Proteína ribossomal 40S	1145,18	-	-	-	-	-	-	-
ENDEREÇAMENTO DE PROTEÍNAS (DOBRAMENTO, MODIFICAÇÃO E ENDEREÇAMENTO)									
PAAG_00986	Proteína com domínio de dissulfeto-isomerase	2350,93	-	-	5.3.4.1	-	-	-	0,772
PAAG_02686	Co-chaperona Hsp90 AHA1	3165,3	-	-	-	-	-	-	-
PAAG_03334	Peptidil-prolil cis-trans isomerase D	1809,42	-	-	5.2.1.8	-	-	-	-
PAAG_05226	Co-chaperona (Sba1) de ligação a Hsp90	994,92	-	-	-	-	-	-	-
PAAG_07037	Calnexina	259,53	-	-	-	-	-	-	0,826
PAAG_07775	Proteína hsp75-like	456,92	-	-	2.3.2.23	-	-	-	-
PAAG_04901	Enzima de conjugação de ubiquitina	2080,88	-	-	-	-	-	0,883	-
PROTEÍNAS COM FUNÇÃO DE LIGAÇÃO OU REQUERIMENTO (ESTRUTURAL OU CATALÍTICO) DE COFATOR									
PAAG_01591	Profilina	1563,75	-	-	-	-	-	0,867	-
PAAG_08058	Cofilina	1226,93	-	-	-	-	-	-	-
PAAG_00244	Proteína de ligação a poliadenilato, citoplasmática e nuclear	267,68	-	-	-	-	-	-	-
PAAG_08247	Calmodulina	4560,75	-	-	-	-	-	-	-
PAAG_08093	Proteína ypt de ligação a GTP	2209,49	-	-	-	-	-	-	-

REGULAÇÃO DO METABOLISMO E FUNÇÃO PROTEÍCA						
PAAAG_06344	Inibidor da dissociação de rab-GDP	858,71	-	-	-	-
TRANSPORTE CELULAR						
PAAAG_01265	Citocromo b5	1200,58	-	-	-	-
RESGATE CELULAR, DEFESA E VIRULÊNCIA						
PAAAG_06811	Proteína de choque térmico STII	1012,68	-	-	-	0,664
PAAAG_00871	Proteína de choque térmico de 30 kDa	779,47	-	-	-	-
PAAAG_12076	NAD(P)H-quinona oxidoreductase, tipo IV	711,21	-	-	1.6.5.2	0,786
PAAAG_05249	Aldeído desidrogenase	631,62	-	-	1.2.1.3	-
OUTROS						
PAAAG_12063	Transportador de proteínas SEC23	234,93	-	-	-	-
PAAAG_11679	Protease Clp ATP-dependente, subunidade de ligação a ATP	264,44	-	-	-	-

^aCódigo de acesso da proteínas no NCBI, disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>.

^bDescrição da proteína no bando de dados de *Paracoccidiotides* spp. disponível em <https://www.broadinstitute.org/fungal-genome-initiative/paracoccidiotides-genome-project>.

^cScore de identificação da proteína.

^dlog2 ratio na condição hemoglobina X privação de Fe; foram consideradas reguladas proteínas com diferenças (*fold change*) $\pm 0,5$ entre a quantificação no extrato obtido na presença de hemoglobina x privação de Fe; valores $\geq 0,58$ indicam proteínas reguladas positivamente; (-) indica que a proteína foi identificada apenas na presença de hemoglobina, portanto, regulada positivamente.

^eValores $\geq 0,95$ indicam proteínas reguladas positivamente; (-) indica que a proteína foi identificada apenas na presença de hemoglobina, portanto, regulada positivamente.

^fNomenclatura de enzimas, disponível em <http://www.genome.jp/kegg/>.

^gPredição de sítios para adição de GPI (glicosilfosfatidilinositol), cuja positividade é indicada pelo termo "sim"; predição realizada pela ferramenta big-PI Fungal Predictor disponível em http://mendel.imp.ac.at/gpi/fungi_server.html.

^hPredição de secreção por via não-clássica, cujo *score* deve ser igual ou maior que 0,5 (bacgramneg) ou 0,6 (mamifero); predição realizada pela ferramenta SecretomeP 2,0 disponível em <http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>.

ⁱPredição de peptídeo sinal, cujo score deve ser igual ou maior que 0,45; predição realizada pela ferramenta SignalP 4.1 Server disponível em <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>.

Tabela 5. Proteínas reguladas negativamente após tratamento de células leveduriformes de *P. lutzii* com hemoglobina durante 48 horas, identificadas na Fração 2 (F2) de parede celular, extraídas por tratamento com NaOH 30 mM.

Código de acesso ^a	Descrição da Proteína ^b	Score ^c	log ₂ Ratio ^d	p ^e	E.C. ^f	Sítio para GPI ^g	Secretome P ≥ 0,6 ^h	Signal P ≥ 0,45 ⁱ
METABOLISMO E ENERGIA								
PAAG_11169	Enolase	867,33	-1,20	0	4.2.1.11	-	-	-
CICLO CELULAR E PROCESSAMENTO DE DNA								
PAAG_03532	Actina	617,59	-0,95	0	-	-	-	-
PAAG_01647	Tubulina, cadeia alfa-2	293,53	-2,06	0	-	-	-	-
SÍNTESE PROTÉICA								
PAAG_09083	Proteína da família TCTP	219,08	-	-	-	-	-	-
PAAG_11418	Fator de elongação 1-alfa	734,69	-1,67	0	-	-	-	-
PAAG_00689	RNA helicase eIF4A ATP-dependente	381,42	-1,64	0	-	-	-	-
PROTEÍNAS COM FUNÇÃO DE LIGAÇÃO OU REQUERIMENTO (ESTRUTURAL OU CATALÍTICO) DE COFATOR								
PAAG_01321	Oxidoredutase 2-nitropropano dioxigenase	602,69	-1,76	0	-	-	0,707	-
TRANSPORTE CELULAR								
PAAG_08620	Proteína carreadora de ADP, ATP	1084,5	-1,67	0	-	-	-	-

^aCódigo de acesso da proteínas no NCBI, disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>.

^bDescrição da proteína no bando de dados de *Paracoccidioides* spp. disponível em <https://www.broadinstitute.org/fungal-genome-initiative/paracoccidioides-genome-project>.

^cScore de identificação da proteína.

^dlog₂ ratio na condição hemoglobina X privação de Fe; foram consideradas reguladas proteínas com diferenças (*fold change*) ± 0,5 entre a quantificação no extrato obtido na presença de hemoglobina x privação de Fe; valores ≤ -0,58 indicam proteínas reguladas negativamente; (-) indica que a proteína foi identificada apenas na privação de Fe, portanto, regulada negativamente.

^eValores ≤ 0,05 indicam proteínas reguladas negativamente; (-) indica que a proteína foi identificada apenas na privação de Fe, portanto, regulada negativamente.

^fNomenclatura de enzimas, disponível em <http://www.genome.jp/kegg/>.

^gPredição de sítios para adição de GPI (glicosilfosfatidilinositol), cuja positividade é indicada pelo termo "sim"; predição realizada pela ferramenta big-PI Fungal Predictor disponível em http://mendel.imp.ac.at/gpi/fungi_server.html.

^hPredição de secreção por via não-clássica, cujo score deve ser igual ou maior que 0,6; predição realizada pela ferramenta SecretomeP 2.0 disponível em <http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>.

ⁱPredição de peptídeo sinal, cujo score deve ser igual ou maior que 0,45; predição realizada pela ferramenta SignalP 4.1 Server disponível em <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>.

Das 40 proteínas reguladas positivamente na F2, incluem-se aquelas relacionadas a metabolismo celular, endereçamento de proteínas, síntese proteica, defesa e virulência, dentre outras. Metabolismo celular, tal qual ocorrido na F1, também foi a categoria com o maior número de proteínas induzidas, conforme Figura 25 A, que apresenta o gráfico das classificações funcionais atribuídas às proteínas reguladas positivamente identificadas na F2 de parede celular. Proteínas possivelmente localizadas na superfície também foram identificadas, conforme apresentado na Figura 25 B.

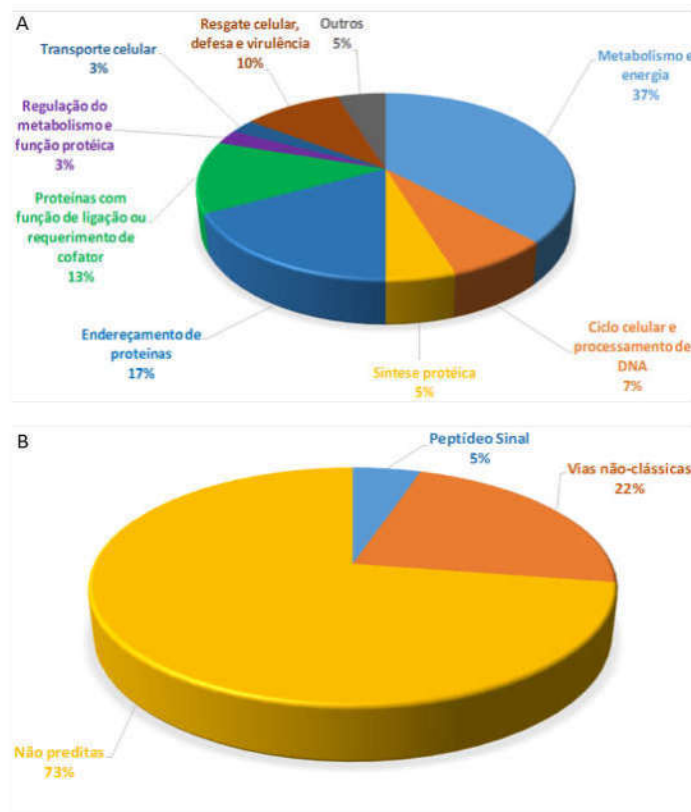


Figura 25. Categorias funcionais e predição de secreção de proteínas reguladas positivamente na presença de hemoglobina, identificadas na F2 de parede celular. A. Classificações funcionais atribuídas às proteínas reguladas positivamente identificadas na F2 após tratamento de células leveduriformes de *P. lutzii* com hemoglobina por 48h, com base na categorização funcional do MIPS (*Munich Information Center for Protein Sequences* – disponível em <http://mips.helmholtz-muenchen.de/funcatDB/>) **B.** Predição de secreção de proteínas reguladas positivamente identificadas na F2 após tratamento de células leveduriformes de *P. lutzii* com hemoglobina por 48h. As sequências das proteínas foram submetidas às ferramentas Signal P (para a predição de peptídeo sinal – via clássica de secreção - disponível em <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) e Secretome P (para a predição de vias não-clássicas de secreção, disponível em <http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>). Gráficos gerados pelo *software* Microsoft Excel Professional Plus 2016.

Apenas 8 proteínas reguladas negativamente foram identificadas na F2 de parede celular, as quais foram agrupadas funcionalmente nas categorias de metabolismo, ciclo celular, síntese proteica, proteínas com função de ligação e transporte celular. A Figura 26 A apresenta o gráfico das classificações funcionais atribuídas às proteínas reguladas negativamente identificadas na F2 de parede celular. Apenas uma proteína foi predita de ser secretada por via não-clássica, conforme apresentado na Figura 26 B.

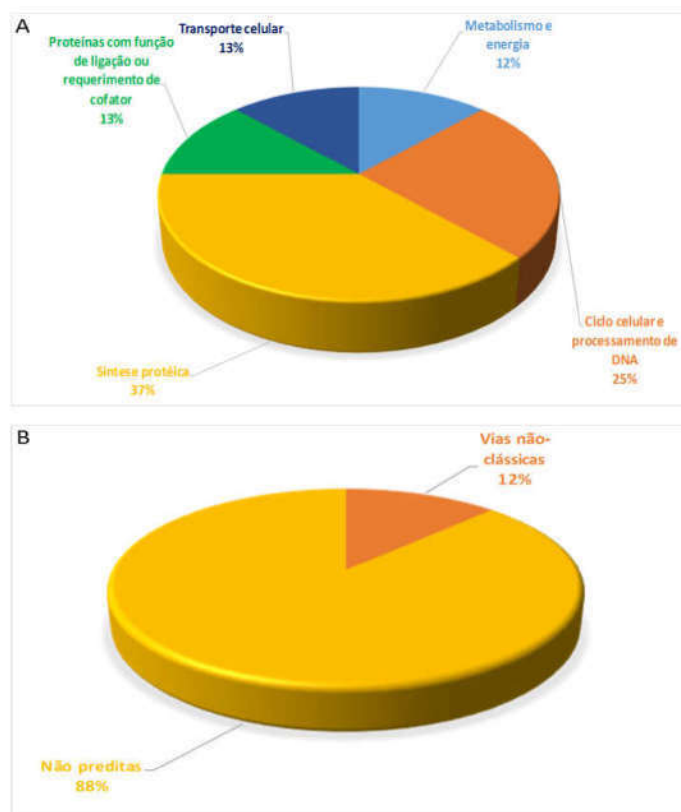


Figura 26. Categorias funcionais e predição de secreção de proteínas reguladas negativamente na presença de hemoglobina, identificadas na F2 de parede celular. A. Classificações funcionais atribuídas às proteínas reguladas negativamente identificadas na F2 após tratamento de células leveduriformes de *P. lutzii* com hemoglobina por 48h, com base na categorização funcional do MIPS (*Munich Information Center for Protein Sequences* – disponível em <http://mips.helmholtz-muenchen.de/funecatDB/>) **B.** Predição de secreção de proteínas reguladas negativamente identificadas na F2 após tratamento de células leveduriformes de *P. lutzii* com hemoglobina por 48h. As sequências das proteínas foram submetidas às ferramentas Signal P (para a predição de peptídeo sinal – via clássica de secreção - disponível em <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) e Secretome P (para a predição de vias não-clássicas de secreção, disponível em <http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>). Gráficos gerados pelo *software* Microsoft Excel Professional Plus 2016.

5.2.3. Proteoma de fração 3 de parede celular de *P. lutzii* após cultivo na presença de hemoglobina

Para a obtenção da fração 3 (F3) de parede celular, que consiste em extratos enriquecidos com proteínas GPI-ancoradas, *P. lutzii* foi cultivado na privação de Fe por 36h e, após, cultivado na presença de hemoglobina por 6h. O extrato de parede celular obtido passou por tratamento com HF-piridina. SDS-PAGE realizada após a obtenção do extrato evidenciou a pouca abundância de proteínas no extrato, conforme Figura 27.

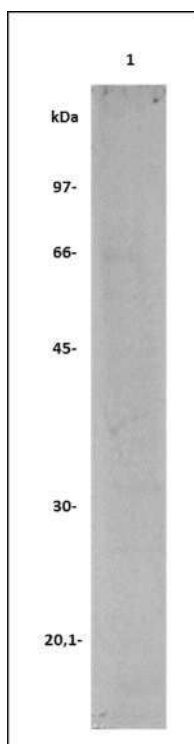


Figura 27. Extrato da fração 3 (F3) de parede celular. Após 6h de cultivo de *P. lutzii* (Pb01) em meio contendo hemoglobina e obtenção da F1 de parede celular, os sedimentos residuais foram tratados com fluoreto hidrogenado de piridina (HF-piridina) por 4 h a 0 °C. O sobrenadante posteriormente obtido foi precipitado com tampão de metanol [metanol 50% (v/v); Tris-HCl 50 mM, pH 7,8], por 2h a 0°C. Os sedimentos obtidos foram ressuspensos em água ultrapura gelada. A F3 consiste em extrato enriquecido com proteínas de parede celular GPI (glicosilfosfatidilinositol)-ancoradas. Os extratos foram submetidos a SDS-PAGE 12% (v/v): 1 – F3 Hemoglobina. Marcador de peso molecular à esquerda. kDa: Quilo Dalton. Gel corado por azul de *coomassie*.

Apesar da pouca abundância, o extrato de F3 também foi submetido à digestão triptica e cromatografia líquida de alta resolução, em nano escala, acoplada a espectrometria de massas com aquisição independente de dados. Análise descritiva foi realizada. A Tabela 6 apresenta as proteínas identificadas na F3.

Tabela 6. Proteínas identificadas na Fração 3 (F3) de parede celular após tratamento de células leveduriformes de *P. lutzii* com hemoglobina durante 6 horas, extraídas por tratamento com fluoreto hidrogenado (HF) de piridina.

Código de acesso ^a	Descrição da Proteína ^b	Score ^c	E.C. ^d	Sítio para GPI ^e	Secretome P ≥ 0,6 ^f	Signal P ≥ 0,45 ^g
METABOLISMO E ENERGIA						
PAAAG_03404	Redutoisomerase de cetol-ácido mitocondrial	174,07	1.1.1.86	-	0,915	-
PAAAG_08313	Proteína da família de endoribonucleases L-PSP (Hmfl)	222,93	-	-	0,874	-
PAAAG_03978	3-hidroxiisobutirato desidrogenase	155,54	1.1.1.31	-	0,603	-
PAAAG_01186	Proteína de controle de divisão celular	72,15	2.7.11.22	-	-	-
PAAAG_00053	Malato desidrogenase NAD-dependente	417,97	1.1.1.37	-	0,651	-
PAAAG_01178	6-fosfogliconato desidrogenase decarboxilase 1	220,86	1.1.1.44 - 1.1.1.343	-	-	-
PAAAG_01534	Piruvato desidrogenase componente E1, subunidade beta	138,86	1.2.4.1	-	0,733	-
PAAAG_11035	Complexo Piruvato desidrogenase dihidrolipoamida acetiltransferase	309,07	2.3.1.12	-	-	-
PAAAG_04166	Transaldolase	150,61	2.2.1.2	-	-	-
PAAAG_05048	Aconitato hidratase, mitocondrial	90,99	4.2.1.3	-	-	-
PAAAG_06473	Manitol-1-fosfato 5-desidrogenase	112,04	1.1.1.17	-	0,661	-
PAAAG_01995	Frutose-bisfosfato aldolase 1	297,87	4.1.2.13	-	-	-
PAAAG_01390	Proteína de retículo endoplasmático	78,25	-	-	0,726	0,658
PAAAG_11169	Enolase	131,67	4.2.1.11	-	-	-
PAAAG_08468	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	932,13	1.2.1.12	-	0,668	0,532
PAAAG_08075	Citrato sintase, mitocondrial	210,68	2.3.3.1	-	-	-
PAAAG_04820	ATP sintase subunidade alfa mitocondrial	175,12	-	-	-	-

PAAAG_06796	Citocromo c oxidase mitocondrial, subunidade 4	547,53	-	-	-	-
PAAAG_08037	ATP sintase mitocondrial, subunidade beta	73,75	3.6.3.14	-	-	-
CICLO CELULAR E PROCESSAMENTO DE DNA						
PAAAG_04458	Proibitina-1	103,66	-	-	-	-
PAAAG_01041	Proibitina-2	149,79	-	-	-	-
PAAAG_12620	Proteína de montagem de nucleossomos	328,34	-	-	-	-
PAAAG_03532	Actina	581,53	-	-	-	-
TRANSCRIÇÃO						
PAAAG_05224	Proteína com domínio de ligação ao RNA	220,32	-	-	-	-
PAAAG_00126	Histona H4.2	643,66	-	-	0,733	0,792
PAAAG_04571	Complexo associado a polipeptídeo nascente, subunidade alfa	1758,80	-	-	0,786	-
PAAAG_07098	Histone H4.1	412,51	-	-	-	-
PAAAG_04662	Fator de especificidade para clivagem e poliadenilação, subunidade 5	87,53	-	-	-	-
SÍNTESE PROTÉICA						
PAAAG_04998	Proteína ribossomal 60S L8-B	319,31	-	-	-	-
PAAAG_08888	Proteína ribossomal L4-A	253,45	-	-	0,690	-
PAAAG_00724	Proteína ribossomal 60S L11	352,58	-	-	-	-
PAAAG_01433	Proteína ribossomal 40S S14	368,48	-	-	-	-
PAAAG_01785	Proteína ribossomal 40S S3	1083,87	-	-	-	-
PAAAG_03513	Proteína ribossomal 40S S18	568,32	-	-	-	-
PAAAG_03827	Proteína ribossomal 60S L21-A	249,54	-	-	0,854	-
PAAAG_04965	Proteína ribossomal 60S L31	244,57	-	-	0,888	-
PAAAG_05017	Proteína ribossomal 40S S10-A	270,52	-	-	-	-
PAAAG_06367	Proteína ribossomal 40S S11	89,71	-	-	-	-
PAAAG_06487	Proteína ribossomal 60S L7	258,81	-	-	0,619	-

PAAAG_06536	Ubiquitina	73,39	-	-	0,834	-
PAAAG_11074	Ubiquitina-Proteína ribossomal 60S L40	81,12	-	-	-	-
PAAAG_07182	Proteína ribossomal 40S S7	149,70	-	-	0,944	-
PAAAG_07841	Proteína ribossomal acídica 60S P1	484,03	-	-	-	-
PAAAG_07955	Proteína ribossomal 60S L18-B	148,28	-	-	-	-
PAAAG_08634	Proteína ribossomal 40S S12	284,63	-	-	-	-
PAAAG_09043	Proteína ribossomal 40S S2	116,15	-	-	-	-
PAAAG_00376	Fator de iniciação de tradução 3 eucariótico, subunidade F	157,25	-	-	-	-
PAAAG_11418	Fator de elongação 1-alfa	284,70	-	-	-	-
PAAAG_00594	Fator de elongação 2	167,82	-	-	-	-
ENDEREÇAMENTO DE PROTEÍNAS (DOBRAMENTO, MODIFICAÇÃO E ENDEREÇAMENTO)						
PAAAG_00986	Disulfeto-isomerase Pdi1	78,04	5.3.4.1	-	-	0,772
PAAAG_01572	DnaJ <i>like</i> -subfamília C, membro 2	138,10	-	-	0,673	-
PAAAG_05142	Proteína de choque térmico de 10 kDa, mitocondrial	3987,94	-	-	-	-
PAAAG_05679	Proteína Hsp90- <i>like</i>	893,56	-	-	-	-
PAAAG_11262	Proteína Hsp7- <i>like</i>	653,11	-	-	-	-
PAAAG_08059	Proteína Hsp60- <i>like</i>	809,72	-	-	-	-
PAAAG_07080	Poliubiquitina	73,39	-	-	-	-
PAAAG_05417	Peptidase de processamento mitocondrial, subunidade beta	212,66	3.4.24.64	-	0,674	-
PROTEÍNAS COM FUNÇÃO DE LIGAÇÃO OU REQUERIMENTO (ESTRUTURAL OU CATALÍTICO) DE COFATOR						
PAAAG_06356	Proteína hipotética	75,10	2.1.1.268	-	-	-
PAAAG_07750	Proteína de choqueHsp88	124,15	-	-	-	-
PAAAG_04913	Proteína com domínio RRM	335,42	-	-	0,837	-

PAAAG_06574	Proteína de ligação ao DNA, 42 kDa	91,25	-	-	-	-
RESGATE CELULAR, DEFESA E VIRULÊNCIA						
PAAAG_01262	Chaperona DnaK	243,28	-	-	0,659	0,864
PAAAG_06811	Proteína de choque térmico STII	151,80	-	-	-	-
PAAAG_08003	Proteína Hsp72-like	676,95	-	-	-	-
PAAAG_00871	Proteína de choque térmico de 30 kDa	760,38	-	-	0,786	-
PAAAG_04164	Superoxido dismutase [Cu-Zn]	132,48	1.15.1.1	-	0,620	-
BIOGÊNESE DE COMPONENTES CELULARES						
PAAAG_01139	Glucanase de parede celular	466,98	-	Sim	0,736	0,858
PAAAG_06779	Glucanase de parede celular (Utr2)	130,53	-	Sim	-	-
OUTROS						
PAAAG_12063	Transportador de proteínas SEC23	77,95	-	-	-	-
PAAAG_12262	Proteína hipotética	103,34	-	-	0,744	-
PAAAG_12425	Proteína de membrana externa mitocondrial, porina	261,67	-	-	-	-

^aCódigo de acesso da proteínas no NCBI, disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>.

^bDescrição da proteína no bando de dados de *Paracoccidioides* spp. disponível em <https://www.broadinstitute.org/fungal-genome-initiative/paracoccidioides-genome-project>.

^cScore de identificação da proteína.

^dNomenclatura de enzimas, disponível em <http://www.genome.jp/kegg/>.

^ePredição de sítios para adição de GPI (glicosilfosfatidilinositol), cuja positividade é indicada pelo termo "sim"; predição realizada pela ferramenta big-PI Fungal Predictor disponível em http://mendel.imp.ac.at/gpi/fungi_server.html.

^fPredição de secreção por via não-clássica, cujo score deve ser igual ou maior que 0,5 (bacgramneg) ou 0,6 (mamífero); predição realizada pela ferramenta SecretomeP 2,0 disponível em <http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>.

^gPredição de peptídeo sinal, cujo score deve ser igual ou maior que 0,45; predição realizada pela ferramenta SignalP 4.1 Server disponível em <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>.

Na fração 3 (F3) de parede celular após tratamento de células leveduriformes com hemoglobina por 6h, foram identificadas 71 proteínas, também relacionadas com metabolismo celular, ciclo celular, síntese protéica, defesa e virulência, dentre outros. A figura 28 A apresenta o gráfico das classificações funcionais atribuídas às proteínas identificadas. Salienta-se que na F3 exclusivamente foram identificadas 2 proteínas relacionadas com a biogênese de componentes celulares, sendo essas preditas como sendo GPI-ancoradas, conforme esperado na F3. Na F3 também foram preditas proteínas com possível localização na superfície, conforme apresentado na figura 28 B.

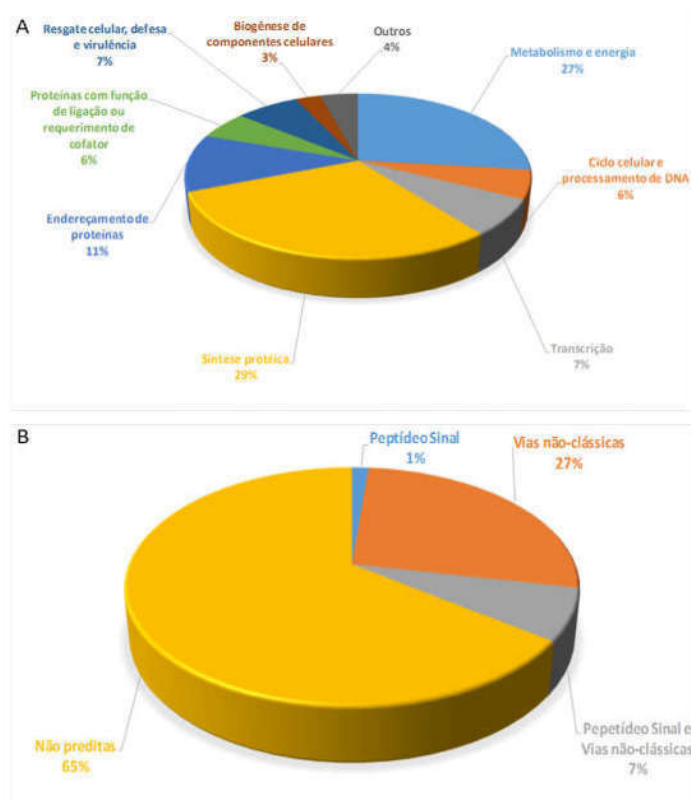


Figura 28. Categorias funcionais e predição de secreção de proteínas identificadas na F3 de parede celular. **A.** Classificações funcionais atribuídas às proteínas identificadas na F3 após tratamento de células leveduriformes de *P. lutzii* com hemoglobina por 6 h, com base na categorização funcional do MIPS (*Munich Information Center for Protein Sequences* – disponível em <http://mips.helmholtz-muenchen.de/funccatDB/>) **B.** Predição de secreção de proteínas identificadas na F3 após tratamento de células leveduriformes de *P. lutzii* com hemoglobina por 6 h. As sequências das proteínas foram submetidas às ferramentas Signal P (para a predição de peptídeo sinal – via clássica de secreção - disponível em <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) e Secretome P (para a predição de vias não-clássicas de secreção, disponível em <http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>). Gráficos gerados pelo software Microsoft Excel Professional Plus 2016.

5.2.4. Potenciais adesinas

Dentre as diversas proteínas encontradas na parede celular de fungos, as adesinas consistem em importantes moléculas relacionadas com o processo de interação com o hospedeiro, sendo por isso que vários estudos que investigam o papel dessas proteínas como atributos de virulência para *Paracoccidioides* têm sido conduzidos (PEREIRA et al., 2007; DA SILVA NETO et al., 2009; DE OLIVEIRA et al., 2015). Dada a importância dessa classe de proteínas e, que a adição de hemoglobina ao meio de cultivo do fungo mimetiza o ambiente encontrado no hospedeiro, verificou-se através da ferramenta online FaaPred (*Fungal Adhesins and Adhesin-like proteins Predictor*) a presença de possíveis adesinas. Dentre as proteínas reguladas positivamente identificadas nas frações F1 e F2, além das proteínas identificadas na F3 de parede celular após tratamento de células leveduriformes de *P. lutzii* com hemoglobina, algumas proteínas foram preditas como possíveis adesinas, conforme Tabela 7.

Tabela 7. Proteínas identificadas preditas como possíveis adesinas

Código de acesso ^a	Descrição da Proteína ^b	FaaPred ≥ -0,8 ^c	Fração ^d
PAAG_01870	3-oxoacil-(acil-proteína carreadora) redutase	-0,43	F1
PAAG_00403	Álcool desidrogenase 1	-0,54	F1
PAAG_07037	Calnexina	-0,56	F2
PAAG_03292	Citocromo c peroxidase, mitocondrial	-0,62	F1
PAAG_02686	Co-chaperona Hsp90 AHA1	-0,50	F2
PAAG_04571	Complexo associado a polipeptídeo nascente, subunidade alfa	-0,35	F3
PAAG_01572	DnaJ like-subfamília C, membro 2	-0,03	F3
PAAG_08468	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	-0,67	F3
PAAG_01139	Glucanase de parede celular	0,32	F3
PAAG_12076	NAD(P)H:quinona oxidoreductase, tipo IV	-0,71	F1, F2
PAAG_08100	O-acetilhomoserino (tiol)-liase	-0,63	F1
PAAG_01321	Oxidoreductase 2-nitropropano dioxigenase	-0,43	F1
PAAG_02769	Piruvato desidrogenase, componente X	-0,80	F1
PAAG_01591	Profilina	-0,73	F2
PAAG_01041	Proibitina-2	-0,54	F3
PAAG_11504	Proteína com domínio de dissulfeto-isomerase	-0,63	F1
PAAG_05224	Proteína com domínio de ligação ao RNA	-0,14	F3
PAAG_04913	Proteína com domínio RRM	-0,67	F3
PAAG_08313	Proteína da família de endoribonucleases L-PSP (Hmf1)	-0,32	F3
PAAG_00871	Proteína de choque térmico de 30 kDa	-0,39	F1, F2, F3

PAAG_06574	Proteína de ligação ao DNA, 42 kDa	-0,46	F3
PAAG_01390	Proteína de retículo endoplasmático	-0,57	F3
PAAG_07957	Proteína hipotética	0,38	F1
PAAG_08059	Proteína Hsp60- <i>like</i>	-0,76	F3
PAAG_02111	Proteína ribossomal 40S S0	-0,62	F1
PAAG_05017	Proteína ribossomal 40S S10-A	-0,62	F3
PAAG_01433	Proteína ribossomal 40S S14	-0,38	F3
PAAG_07182	Proteína ribossomal 40S S7	-0,72	F3
PAAG_00969	Proteína ribossomal 60S L15	-0,14	F1
PAAG_08888	Proteína ribossomal L4-A	-0,77	F3
PAAG_03900	Proteína YPT52 de ligação a GTP	-0,51	F1
PAAG_02354	Serina 3-desidrogenase	-0,54	F2

^aCódigo de acesso da proteínas no NCBI, disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>.

^bDescrição da proteína no bando de dados de *Paracoccidioides* spp. disponível em <https://www.broadinstitute.org/fungal-genome-initiative/paracoccidioides-genome-project>.

^cPredição de função de adesina, cujo *score* deve ser igual ou maior que -0,8; predição realizada pela ferramenta FaaPred disponível em <http://bioinfo.icgeb.res.in/faap/>.

^dFração ou frações de parede celular na qual a proteína foi identificada.

6. DISCUSSÃO

6.1. Desafios enfrentados na expressão heteróloga de *PbPga7* e o advento de perspectivas para o estudo da proteína

A utilização de heme/hemoglobina por *Paracoccidioides* spp. consiste em um importante atributo de virulência para o patógeno. Uma vez que o fungo é capaz de causar doença multifocal por disseminação hematogênica e é hábil para a lise de eritrócitos, a hemoglobina consiste em uma importante fonte de Fe que pode ser explorada pelo patógeno (MACKINNON, 1959; BAILÃO et al., 2014). *Paracoccidioides* spp. é capaz de captar heme/hemoglobina por um processo mediado por um receptor, denominado *PbRbt5* (em analogia ao receptor *Rbt5* descrito em *C. albicans*), o qual é localizado na parede celular e apresenta domínio CFEM, domínio esse recentemente descrito como ligante de heme (BAILÃO et al., 2014; NASSER et al., 2016).

Entretanto, o fato de mutantes para *PbRbt5* ainda apresentarem a capacidade de utilizar hemoglobina, associado à presença de sequências homólogas a outros componentes da família de receptores de heme/hemoglobina de *C. albicans*, os quais apresentam regulação positiva ao nível transcricional quando o fungo é cultivado na presença de hemoglobina, torna sugestiva a possibilidade de que não apenas *PbRbt5*, mas também outras proteínas atuem no processo de captação de heme/hemoglobina por *Paracoccidioides* spp., a exemplo do que ocorre em *C. albicans*, no qual uma rede de receptores participa do processo (BAILÃO et al., 2014; KUZNETS et al., 2014).

Tendo isso em vista, no presente trabalho, objetivou-se a expressão heteróloga da sequência PAAG_02225, sequência essa regulada positivamente em nível transcricional quando o fungo foi cultivado na presença de hemoglobina. Essa sequência gênica foi inicialmente denominada por BAILÃO et al., (2014), como *PbCsa1*, assim chamada por apresentar homologia para com a sequência de *Csa1* de *C. albicans*. Uma vez que o banco de dados do genoma de *Paracoccidioides* spp. passou por recentes atualizações, fez-se necessária nova análise de homologia entre as sequências (MUÑOZ et al., 2014, 2016). Novo alinhamento realizado (Figura 12) evidenciou a baixa similaridade entre as sequências PAAG_02225 (*P. lutzii*) e *Csa1* (*C. albicans*). Apesar de ambas as sequências apresentarem predição de peptídeo sinal, as mesmas divergem quanto à extensão (PAAG_02225, 281 resíduos de aminoácidos; *Csa1*, 1018 resíduos de aminoácidos), quantidade de domínios CFEM (PAAG_02225, 1 domínio CFEM; *Csa1*, 4 domínios

CFEM), além do fato de apenas PAAG_02225 apresentar sítio predito para a adição de GPI.

Csa1, apesar de inicialmente ter sido descrita como componente da família de receptores de heme/hemoglobina de *C. albicans*, a caracterização de mutantes para *csa1* não demonstrou papel deste para o evento de utilização de heme/hemoglobina pelo fungo (WEISSMAN; KORNITZER, 2004). Em contrapartida, outra sequência de *C. albicans*, Pga7, é de relevante importância para o evento de captação de heme/hemoglobina pelo fungo (KUZNETS et al., 2014). Tendo isso em vista, alinhamento entre a sequência PAAG_02225 e a sequência de Pga7 de *C. albicans* foi realizado (Figura 13). Foi verificada maior similaridade entre as sequências, uma vez que as sequências apresentam extensão aproximada (PAAG_02225, 281 resíduos de aminoácidos; Pga7, 219 resíduos de aminoácidos), a mesma quantidade de domínios CFEM (apenas 1 domínio, cada), além de ambas apresentarem predição de peptídeo sinal e de sítios para adição de âncora de GPI. Diante dos achados, sugere-se que a sequência PAAG_02225 passe a ser denominada *PbPga7*, e não mais *PbCsa1*. A proposta de alteração da denominação da sequência visa a adequação da literatura à real similaridade existente entre as sequências de *P. lutzii* e *C. albicans*, além de permitir que analogia seja feita ao processo de captação de heme/hemoglobina por *C. albicans*, uma vez que há a possibilidade de que mecanismo similar seja atuante em *Paracoccidioides* spp.

Seguindo-se à expressão heteróloga de *Pb01pga7*, o correto fragmento de DNA referente à *Pb01pga7*, confirmado por sequenciamento (Figuras 14A e 14B), foi obtido, o qual foi após inserido no vetor de expressão pGEX-4T-3 e a construção obtida utilizada para a transformação de células quimiocompetentes de *E. coli*. Apesar de colônias obtidas terem sido analisadas por PCR, atestando a positividade para a presença de *Pb01pga7* (Figura 15), diversos testes de indução de *Pb01pga7* não foram efetivos, de forma que apenas a GST (glutathione S-transferase), à qual *Pb01pga7* deveria ser expressa fusionada, foi induzida (Figura 16). A investigação do desenho dos oligonucleotídeos empregados no presente trabalho não evidenciou qualquer erro que poderia ser responsável por problemas como mudanças na fase de leitura, acarretando em tradução truncada, o que justificaria a ausência da indução de *Pb01pga7*.

Outra possibilidade levantada foi a de que alguma incompatibilidade no que tange ao uso de códons preferenciais fosse responsável pelo problema em questão, uma vez que dificuldades enfrentadas em expressão heteróloga decorrentes de incompatibilidade de códons presentes na sequência alvo e o uso de códons preferenciais utilizados pelos

organismos hospedeiros empregados na expressão heteróloga consistem em situações discutidas na literatura (KANE, 1995; MAKRIDES, 1996). Tendo isso em vista, foi feita análise da presença de códons raros para *E. coli* na sequência de *Pb01pga7*, o que foi confirmado (Figura 17). Foram identificados na sequência 21 códons raros para *E. coli*. Uma vez que no presente trabalho os oligonucleotídeos utilizados geraram 92,5% da sequência integral (a sequência começa no “segundo ATG” da sequência original), o primeiro códon raro identificado codifica para o 9º resíduo de aminoácido (CCC – prolina) a ser inserido no momento da tradução. No sistema pGEX de expressão, a proteína recombinante é expressa fusionada à GST, a qual é inicialmente traduzida (região N-terminal), seguida da tradução do alvo (C-terminal) (HARPER; SPEICHER, 2011). O fato de apenas GST ter sido induzida (Figura 16) associado à presença de códon raro para *E. coli* logo no início do alvo, sugere a situação da ocorrência de tradução truncada, ocasionada por incompatibilidade de códons presentes em *Pb01pga7* e os utilizados preferencialmente por *E. coli*.

Como forma de solucionar o problema, optou-se pela síntese química do gene, com otimização da sequência (isto é, adequação dos códons originais da sequência para os códons preferencialmente utilizados por *E. coli*) para expressão em *E. coli*, o que foi realizado por uma empresa especializada. O gene sintético, correspondente à sequência integral de *Pb01pga7*, foi obtido inserido no vetor de expressão pGEX-4T-1 (Figura 10). Células quimiocompetentes de *E. coli* foram transformadas e colônias obtidas foram submetidas a indução, a qual se mostrou efetiva (Figura 18), uma vez que foi perceptível a indução da expressão de uma proteína de 54,5 kDa, correspondente ao peso molecular predito para *Pb01Pga7* fusionada à GST. O alvo foi confirmado por nanoUPLC-MS^E (Tabela 1) e testes de otimização da indução da expressão de *Pb01pga7* também foram realizados, porém as diversas condições testadas não influenciaram significativamente os níveis de expressão (Figura 19). Em seguida, testes para a solubilização de *Pb01Pga7* foram realizados, uma vez que a proteína foi obtida em sua forma insolúvel, em corpos de inclusão. Para tanto, foi empregada uma combinação de tratamentos com lisozima, sonicação e tampão contendo ureia, um agente caotrópico, que resultou em solubilização parcial da proteína (Figura 20).

Não obstante, a obtenção da proteína recombinante *Pb01Pga7* abre perspectivas para estudos subsequentes que visem a caracterização da proteína quanto à investigação de sua função de ligante de heme, bem como à sua localização subcelular. O fato de a proteína apresentar diversas características (peptídeo sinal, domínio CFEM e âncora para

a adição de GPI) presentes em outros receptores descritos em *C. albicans* (Rbt5 e Pga7) e *Paracoccidioides* spp. (Rbt5), além de regulação positiva ao nível transcricional quando *P. lutzii* foi cultivado na presença de hemoglobina, coloca Pb01Pga7 em lugar de destaque como alvo de estudo, dada a possibilidade do mesmo atuar no evento de captação de heme/hemoglobina por *Paracoccidioides* spp.

6.2. Análise do proteoma de parede celular de *P. lutzii* evidencia a regulação positiva da expressão de adesinas e de sistemas antioxidantes após o tratamento do fungo com hemoglobina

A utilização de técnicas em proteômica para o estudo de processos biológicos consiste numa abordagem robusta que permite a realização de análises com relevante escala de amplitude. *Paracoccidioides* spp. tem sido alvo de estudos com esse tipo de abordagem, uma vez que análises do proteoma citoplasmático de diferentes isolados representantes das espécies filogenéticas que compõem o gênero, além de análises do secretoma de *P. lutzii* (Pb01), nas formas leveduriforme e de micélio, foram realizadas (WEBER et al., 2012; PIGOSSO et al., 2013). Adicionalmente, abordagens em proteômica também foram empregadas para o estudo das adaptações metabólicas que ocorrem em *Paracoccidioides* spp. quando o fungo é cultivado na privação de Fe ou na presença de hemoglobina, através do estudo do proteoma citoplasmático do patógeno (PARENTE et al., 2011; BAILÃO et al., 2014). Análise do proteoma de parede de diferentes isolados de *P. brasiliensis* também foi realizada, porém os extratos analisados foram oriundos de cultivo do fungo em condições não estressoras e tratamentos diferenciais não foram empregados no momento de extração das proteínas, o que pode ter limitado a amplitude dos resultados obtidos (LONGO et al., 2014).

Uma vez que a parede celular de *Paracoccidioides* spp. consiste na interface de contato do patógeno para com o hospedeiro, a elucidação do proteoma de parede celular é de relevante importância no que tange à busca por alvos que sejam imprescindíveis para o processo, o que deve ser feito preferencialmente em condições que mimetizem as enfrentadas pelo patógeno quando no hospedeiro. Como exemplo, o estudo do proteoma de parede celular de *C. albicans* após submissão do fungo à privação de Fe permitiu o achado da regulação positiva da expressão de diversas proteínas relacionadas com a captação de Fe de fontes do hospedeiro, inclusive os receptores de hemoglobina Rbt5 e

Pga7, o que demonstra a importância que pode ser atribuída a esse tipo de abordagem (SORGO et al., 2013).

Haja vista a complexidade do evento de captação de heme/hemoglobina por *Paracoccidioides* spp., objetivou-se então, no presente trabalho, a realização de análises proteômicas da parede celular do patógeno, após tratamento do mesmo com hemoglobina, utilizando a condição de privação de Fe como controle, de forma a investigar outras proteínas, além de *PbRbt5* (e provavelmente *PbPga7*) que poderiam atuar no processo. Para tanto, células leveduriformes de *P. lutzii* (*Pb01*) foram empregadas. Tendo em vista os diferentes tipos de interações que permitem a associação de proteínas à parede celular, tratamentos diferenciais para extração foram empregados, os quais resultaram em extratos proteicos de diferentes frações de parede celular, que foram após submetidos a nanoUPLC-MS^E (PITARCH; NOMBELA; GIL, 2008). As frações 1 e 2 (Tabelas 2-5) de parede celular foram submetidas a análises de expressão diferencial. Os resultados oriundos da fração 3 (Tabela 6), obtida apenas na presença de hemoglobina, foram submetidos a análise descritiva.

Quantidade substancial de proteínas identificadas como presentes na parede celular de *P. lutzii* estão relacionadas com processos classicamente caracterizados em nível citoplasmático (Tabelas 2-6 e Figuras 22 A, 23A, 25 A, 26 A e 28 A), como diversas proteínas ribossomais e fatores de tradução (relacionadas com síntese proteica), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e enolase (envolvidas na glicólise), além de histonas (relacionadas com o processamento de DNA e estrutura de nucleossomos), dentre diversas outras. Apesar de intrigantes, os resultados obtidos corroboram para com achados na literatura, uma vez que análises dos proteomas de parede celular de *P. brasiliensis* e *C. albicans* também evidenciaram a presença de proteínas na parede celular cuja localização é classicamente citoplasmática (PITARCH et al., 2002; LONGO et al., 2014).

Alguns autores discutem que a presença dessas proteínas na parede celular poderiam ser artefatos da metodologia empregada para a obtenção dos extratos a serem analisados, enquanto outros defendem que a ocorrência dessas proteínas seja devido ao fato delas serem bi ou multifuncionais (proteínas *moonlighting*), cujas funções são diferentes dependendo da localização subcelular (NOMBELA; GIL; CHAFFIN, 2006; KARKOWSKA-KULETA; KOZIK, 2015). O processo empregado no presente trabalho para a obtenção de proteínas de parede celular foi composto por extensivas lavagens dos extratos com soluções com decrescentes concentrações de NaCl, cujo objetivo consistiu

na remoção de contaminantes citoplasmáticos que por ventura poderiam, por interações inespecíficas, estarem associados à parede celular. O processo foi efetivo, conforme Figura 21, o que atesta que os extratos obtidos no presente estudo são enriquecidos com proteínas de parede celular (PITARCH; NOMBELA; GIL, 2008).

Em adição ao fato da ausência de contaminantes citoplasmáticos, as proteínas identificadas foram submetidas à análise de predição de secreção (por via clássica e/ou não clássica), as quais corroboraram para com a presença das proteínas identificadas na superfície celular. Dentre as proteínas reguladas positiva e negativamente, identificadas na F1, respectivamente 43% e 48% foram preditas como secretadas (Figuras 22 B e 23 B). Na F2, 27% e 12% das proteínas identificadas como reguladas positiva e negativamente, respectivamente, foram preditas como secretadas (Figuras 25 B e 26 B). Trinta e cinco por cento das proteínas identificadas na F3 foram preditas como secretadas (Figura 28 B). Em todas as frações analisadas, as proteínas preditas como secretadas agruparam-se principalmente ao grupo de proteínas secretadas por vias não clássicas. Eventos não clássicos de secreção de proteínas (ou seja, aqueles que independem da presença de peptídeo sinal na porção N-terminal da proteína) ainda não são compreendidos em sua totalidade, uma vez que se pode considerar que muitas proteínas não preditas como secretadas, na verdade seriam secretadas por mecanismos que ainda demandam elucidação e que, conseqüentemente, ainda não estão inseridos no algoritmo de busca da ferramenta utilizada no presente trabalho para essas análises (BENDTSEN et al., 2004; NOMBELA; GIL; CHAFFIN, 2006).

No que tange à utilização de heme/hemoglobina por *P. lutzii*, não foi possível a identificação de proteínas diretamente relacionadas com o evento de captação, como *PbRbt5* e *PbPga7*, o que era esperado principalmente na F3 de parede celular (Tabela 6), que corresponde à fração enriquecida com proteínas GPI-ancoradas (característica predita para *PbRbt5* e *PbPga7*). Na F3, apenas duas proteínas GPI-ancoradas foram identificadas, ambas glucanases de parede celular. A não identificação dos receptores de heme/hemoglobina, associada à identificação de apenas duas proteínas GPI-ancoradas pode estar relacionada com a pouca abundância dessas proteínas, uma vez que estudo preliminar baseado em análises *in silico* do transcrito de *P. brasiliensis* evidenciou transcritos codificantes para apenas 20 prováveis proteínas GPI-ancoradas (CASTRO et al., 2005).

Apesar da não identificação de *PbRbt5* e *PbPga7*, diversas proteínas reguladas positivamente na F1 e F2, além das identificadas na F3, foram preditas como potenciais

adesinas (Tabela 7). Dentre essas proteínas, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase foi descrita como adesina em *P. brasiliensis*, sendo apontada como de relevante importância no processo de infecção através de ensaios *in vitro* (BARBOSA et al., 2006). O fator de alongação Tu (EF-Tu), identificado como regulado positivamente na F1 (Tabela 2), apesar de não ter sido identificado como potencial adesina pela ferramenta utilizada no presente trabalho foi recentemente caracterizado como possuindo propriedades adesivas, sendo também importante no evento de interação com o hospedeiro (MARCOS et al., 2016). A regulação positiva da expressão de potenciais adesinas possibilita a inferência de que o tratamento do patógeno com hemoglobina mimetiza condições encontradas no hospedeiro, o que leva o fungo a empregar moléculas relacionadas com o evento de interação, uma vez que adesinas são de importância para tal (GONZALEZ; HERNANDEZ, 2016). *Paracoccidioides* spp. é hábil em causar a lise de eritrócitos, porém a capacidade do fungo se aderir a eritrócitos ainda não foi identificada (BAILÃO et al., 2014), a exemplo de *C. albicans* que apresenta a capacidade de aderir a eritrócitos e utilizar heme oriundo da hemoglobina como fonte de Fe (MOORS et al., 1992).

Outro achado importante foi o fato de que na F1 e F2, proteínas relacionadas com resgate celular, defesa e virulência foram identificadas apenas entre as reguladas positivamente após tratamento do fungo com hemoglobina (Tabelas 2 e 4), bem como na F3 (Tabela 6). Dentre essas proteínas, destacam-se as enzimas catalase, citocromo c peroxidase e superóxido dismutase, as quais estão relacionadas com a defesa contra estresse oxidativo (DANTAS et al., 2008; DE ARRUDA GROSSKLAUS et al., 2013; TAMAYO et al., 2016). O grupo heme apresenta potencial tóxico, uma vez que, quando livre, é capaz de levar a produção de espécies reativas de oxigênio (ASCENZI et al., 2005). Tendo em vista o potencial tóxico do grupo heme, a regulação positiva de proteínas relacionadas com a defesa contra estresse oxidativo, como catalase e citocromo c peroxidase, leva a inferência de que *P. lutzii* emprega mecanismos para contrapor a toxicidade provocada pelo grupo heme e, assim, possibilitar a utilização da molécula.

Não foi possível traçar relação entre o tratamento do fungo com hemoglobina e a regulação negativa de proteínas identificadas na F1 e F2 (Tabelas 3 e 5). Adicionalmente, diversas proteínas reguladas positivamente na F1 e F2 (Tabelas 2 e 4), além de outras identificadas na F3 (Tabela 6), também não puderam ser relacionadas diretamente com o evento de utilização de heme/hemoglobina por *P. lutzii*. Apesar disso, é possível inferir que essas proteínas possam de alguma forma estar relacionadas em eventos de interação com o hospedeiro, cuja regulação positiva ou negativa pode ter sido desencadeada pela

presença de hemoglobina, que promoveu a mimetização de condições encontradas no hospedeiro. Cabe ainda salientar que diversas proteínas podem estar associadas à parede celular de maneira transiente, por serem na verdade destinadas à secreção direta para o meio extracelular ou através de vesículas, conforme discutido na literatura (VALLEJO et al., 2012; WEBER et al., 2012; KARKOWSKA-KULETA; KOZIK, 2015).

Os achados do presente trabalho contribuíram para a ampliação do entendimento da parede celular de *P. lutzii*, além de terem alavancado interessantes perspectivas quanto ao estudo de diversas proteínas identificadas nessa estrutura, sobretudo as que potencialmente desempenham funções de adesinas e de detoxificação. Estas perspectivas são promissoras, tendo em vista que a possibilidade de descoberta de novas moléculas que sejam essenciais para o sucesso infectivo de *Paracoccidioides* spp. pode culminar no aprimoramento de métodos para diagnóstico, além de expor novos alvos para terapia da doença.

7. CONCLUSÕES

O presente trabalho propiciou o advento de importantes achados através de análises do proteoma de parede celular de *P. lutzii*, as quais evidenciaram que quando o fungo é tratado com hemoglobina, ocorre a regulação positiva de adesinas e de enzimas relacionadas à defesa contra espécies reativas de oxigênio. Cabe inferir que *in vivo* essas proteínas sejam essenciais para que o patógeno possa ter acesso à hemoglobina, ao aderir-se a eritrócitos e promover a lise desses e, adicionalmente, contrapor a toxicidade gerada pelo heme/hemoglobina liberados dos eritrócitos para, dessa forma, tornar permissiva a captação e utilização dessas moléculas.

A expressão heteróloga *Pb01Pga7* mostrou-se um tanto desafiadora, haja vista as características da proteína e os recursos empregados para a expressão da mesma. Apesar de não ter sido possível a realização da caracterização de *Pb01Pga7*, a obtenção da proteína recombinante abre perspectivas para estudos futuros que visem atestar a localização subcelular da proteína e sua capacidade de interagir com o grupo heme.

Os resultados obtidos no presente trabalho reiteram a complexidade do evento de interação entre patógeno e hospedeiro e, adicionalmente, levantam novos questionamentos quanto à composição e plasticidade da parede celular de *Paracoccidioides* spp., a qual contém alvos interessantes para futuros estudos, como as potenciais adesinas identificadas e que demandam investigação de suas precisas funções, o que logicamente poderá contribuir para a ampliação do conhecimento a respeito dessa estrutura extremamente importante: a parede celular.

8. PERSPECTIVAS

- Investigar a capacidade de *Pb01Pga7* se ligar à hemina e hemoglobina, através de ensaios de afinidade com resina de hemina-agarose;
- Definir a localização subcelular de *Pb01Pga7* por microscopia eletrônica de transmissão;
- Realizar estudo baseado em modelagem molecular das interações intermoleculares de *Pb01Pga7* e *Pb01Rbt5*;
- Identificar genes homólogos de *P. lutzii pga7* nas diferentes espécies filogenéticas de *P. brasiliensis* via análises *in silico*;
- Realizar análise transcricional dos genes candidatos a homólogos de *Pb01pga7* em *P. brasiliensis* que forem identificados via análises *in silico*;
- Obter mutante *knockdown* pela estratégia de RNA antisentido para *Pbpga7*;
- Promover ensaios de crescimento e sobrevivência e análises proteômicas do mutante *Pbpga7* obtido.

REFERÊNCIAS

AISEN, P.; ENNS, C.; WESSLING-RESNICK, M. Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 33, p. 940–959, 2001.

ALMEIDA, R. S.; BRUNKE, S.; ALBRECHT, A.; THEWES, S.; LAUE, M.; EDWARDS, J. E.; FILLER, S. G.; HUBE, B. The hyphal-associated adhesin and invasin Als3 of *Candida albicans* mediates iron acquisition from host ferritin. **PLoS Pathogens**, v. 4, p. 1–17, 2008.

ALMEIDA, R. S.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* iron acquisition within the host. **FEMS Yeast Research**, v. 9, n. 7, p. 1000–1012, 2009.

ANDREWS, N. C. Disorders of iron metabolism. **The New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 26, p. 1986–1995, 1999.

ARANGO, R.; RESTREPO, A. Growth and production of iron chelants by *Paracoccidioides brasiliensis* mycelial and yeast forms. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 26, p. 113–118, 1988.

ASCENZI, P.; BOCEDI, A.; VISCA, P.; ALTRUDA, F.; TOLOSANO, E.; BERINGHELLI, T.; FASANO, M. Hemoglobin and heme scavenging. **IUBMB life**, v. 57, n. 11, p. 749–759, 2005.

ASKWITH, C.; EIDE, D.; VAN HO, A.; BERNARD, P. S.; LI, L.; DAVIS-KAPLAN, S.; SIPE, D. M.; KAPLAN, J. The *FET3* gene of *S. cerevisiae* encodes a multicopper oxidase required for ferrous iron uptake. **Cell**, v. 76, p. 403–410, 1994.

BAGAGLI, E.; THEODORO, R. C.; BOSCO, S. M. G.; MCEWEN, J. G. *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4–5, p. 197–207, 2008.

BAILÃO, E. F. L. C.; LIMA, P. de S.; SILVA-BAILÃO, M. G.; BAILÃO, A. M.; FERNANDES, G. da R.; KOSMAN, D. J.; SOARES, C. M. de A. *Paracoccidioides* spp. ferrous and ferric iron assimilation pathways. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. JUL, p. 1–12, 2015.

BAILÃO, E. F. L. C.; PARENTE, J. A.; PIGOSSO, L. L.; DE CASTRO, K. P.; FONSECA, F. L.; SILVA-BAILÃO, M. G.; BÃO, S. N.; BAILÃO, A. M.; RODRIGUES, M. L.; HERNANDEZ, O.; MCEWEN, J. G.; SOARES, C. M. D. A. Hemoglobin uptake by *Paracoccidioides* spp. is receptor-mediated. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, p. 1–20, 2014.

BAKER, H. M.; BAKER, E. N. Lactoferrin and Iron: structural and dynamic aspects of binding and release. **BioMetals**, v. 17, p. 209–216, 2004.

BARBOSA, S. M.; BÁO, S. N.; ANDREOTTI, P. F.; FARIA, F. P. De; FELIPE, M. S. S.; FEITOSA, L. D. S.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; SOARES, C. M. D. A. 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**, v. 74, n. 1, p. 382–389, 2006.

BENDTSEN, J. D.; JENSEN, L. J.; BLOM, N.; VON HEIJNE, G.; BRUNAK, S. Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 17, n. 4, p. 349–356, 2004.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BRITO, W. de A.; REZENDE, T. C. V.; PARENTE, A. F.; RICART, C. A. O.; DE SOUSA, M. V. D.; BÁO, S. N.; SOARES, C. M. de A. Identification, characterization and regulation studies of the aconitase of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Fungal Biology**, v. 115, n. 8, p. 697–707, 2011.

BROWN, L.; WOLF, J. M.; PRADOS-ROSALES, R.; CASADEVALL, A. Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 10, p. 620–630, 2015.

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 4, p. 89–117, 1993.

CADIEUX, B.; LIAN, T.; HU, G.; WANG, J.; BIONDO, C.; TETI, G.; LIU, V.; MURPHY, M. E. P.; CREAGH, A. L.; KRONSTAD, J. W. The mannoprotein cig1 supports iron acquisition from heme and virulence in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 207, n. 8, p. 1339–1347, 2013.

CANO, L. E.; GOMEZ, B.; BRUMMER, E.; RESTREPO, A.; STEVENS, D. A. Inhibitory effect of deferoxamine or macrophage activation on transformation of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia ingested by macrophages: reversal by holotransferrin. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 4, p. 1494–1496, 1994.

CASSAT, J. E.; SKAAR, E. P. Iron in infection and immunity. **Cell Host Microbe**, v. 13, p. 509–519, 2013.

CASTANEDA, E.; BRUMMER, E.; PERLMAN, A. M. M.; MCEWEN, J. G. G.; STEVENS, D. a. a. A culture medium for *Paracoccidioides brasiliensis* with high plating efficiency, and the effect of siderophores. **Medical Mycology**, v. 26, n. 6, p. 351–358, 1988.

CASTRO, N. da S.; MAIA, Z. A.; PEREIRA, M.; SOARES, C. M. de A. Screening for glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 4, n. 2, p. 326–345, 2005.

CAZA, M.; KRONSTAD, J. W. Shared and distinct mechanisms of iron acquisition by bacterial and fungal pathogens of humans. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, p. 1–23, 2013.

DA SILVA NETO, B. R.; DE FÁTIMA DA SILVA, J.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; LENZI, H. L.; DE ALMEIDA SOARES, C. M.; PEREIRA, M. The malate synthase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a linked surface protein that behaves as an anchorless adhesin. **BMC microbiology**, v. 9, p. 272, 2009.

DANTAS, A. S.; ANDRADE, R. V.; DE CARVALHO, M. J.; FELIPE, M. S. S.; CAMPOS, É. G. Oxidative stress response in *Paracoccidioides brasiliensis*: assessing catalase and cytochrome c peroxidase. **Mycological Research**, v. 112, n. 6, p. 747–756, 2008.

DE ARRUDA GROSSKLAUS, D.; BAILÃO, A. M.; VIEIRA REZENDE, T. C.; BORGES, C. L.; DE OLIVEIRA, M. A. P.; PARENTE, J. A.; DE ALMEIDA SOARES, C. M. Response to oxidative stress in *Paracoccidioides* yeast cells as determined by proteomic analysis. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 15, n. 5, p. 347–64, 2013.

DE OLIVEIRA, H. C.; ASSATO, P. A.; MARCOS, C. M.; SCORZONI, L.; DE PAULA E SILVA, A. C. A.; DA SILVA, J. de F.; SINGULANI, J. de L.; ALARCON, K. M.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. *Paracoccidioides*-host interaction: an overview on recent advances in the paracoccidioidomycosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. NOV, p. 1–20, 2015.

DE SILVA, D. M.; ASKWITH, C. C.; EIDE, D.; KAPLAN, J. The *FET3* gene product required for high affinity iron transport in yeast is a cell surface ferroxidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 3, p. 1098 - 1101, 1995.

DE SOUSA LIMA, P.; BAILÃO, E. F. L. C.; SILVA, M. G.; CASTRO, N. D. S.; BÃO, S. N.; ORLANDI, I.; VAI, M.; DE ALMEIDA SOARES, C. M. Characterization of the *Paracoccidioides* beta-1,3-glucanosyltransferase family. **FEMS Yeast Research**, v. 12, n. 6, p. 685–702, 2012.

DIAS-MELICIO, L. A.; CALVI, S. A.; PERAÇOLI, M. T. S.; SOARES, Â. M. V. D. C. Inhibitory effect of deferoxamine on *Paracoccidioides brasiliensis* survival in human monocytes: reversal by holotransferrin not by apotransferrin. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 47, n. 5, p. 263–266, 2005.

DIX, D.; BRIDGHAM, J.; BRODERIUS, M. Characterization of the *FET4* protein of yeast. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 18, p. 11770–11777, 1997.

DIX, D. R.; BRIDGHAM, J. T.; BRODERIUS, M. a.; BYERSDORFER, C. a.; EIDE, D. J. The *FET4* gene encodes the low affinity Fe(II) transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 42, p. 26092–99, 1994.

DLOUHY, A. C.; OUTTEN, C. E. The iron methallome in eukaryotic organisms. **Metal Ions in Life Sciences**, v. 12, p. 241–278, 2013.

FISCHBACH, F. A.; ANDEREGG, J. W. An X-ray scattering study of ferritin and apoferritin. **Journal of Molecular Biology**, v. 14, p. 458–473, 1965.

FOSTER, L.-A. A. Utilization and cell-surface binding of hemin by *Histoplasma capsulatum*. **Canadian journal of microbiology**, v. 48, n. 5, p. 437–442, 2002.

GEORGATSOU, E.; ALEXANDRAKI, D. Two distinctly regulated genes are required for ferric reduction, the first step of iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and cellular biology**, v. 14, n. 5, p. 3065–3073, 1994.

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

GONZALEZ, A.; HERNANDEZ, O. New insights into a complex fungal pathogen: the case of *Paracoccidioides* spp. **Yeast**, v. 33, p. 113–128, 2016.

GUANGGAN, H.; CAZA, M.; CADIEUX, B.; BAKKEREN, E.; DO, E.; JUNG, W. H.; KRONSTAD, J. W. The ESCRT machinery influences haem uptake and capsule elaboration in *Cryptococcus neoformans*. **Molecular Microbiology**, v. 96, n. 5, p. 973–992, 2015.

HAAS, H. Molecular genetics of fungal siderophore biosynthesis and uptake: The role of siderophores in iron uptake and storage. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 62, n. 4, p. 316–330, 2003.

HAAS, H. Fungal siderophore metabolism with a focus on *Aspergillus fumigatus*. **Natural Product Reports**, v. 31, n. 10, p. 1266–1276, 2014.

HAAS, H.; EISENDLE, M.; TURGEON, B. G. Siderophores in fungal physiology and virulence. **Annual Review of Phytopathology**, v. 46, n. 1, p. 149–187, 2008.

HARPER, S.; SPEICHER, D. W. Purification of proteins fused to glutathione S-transferase. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 681, p. 259–280, 2011.

HENTZE, M. W.; MUCKENTHALER, M. U.; ANDREWS, N. C. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. **Cell**, v. 117, p. 285–297, 2004.

HEYMANN, P.; GERADS, M.; SCHALLER, M.; DROMER, F.; WINKELMANN, G.; ERNST, J. F. The siderophore iron transporter of *Candida albicans* (Sit1p/Arn1p) mediates uptake of ferrichrome-type siderophores and is required for epithelial invasion. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 5246–5255, 2002.

HOLZBERG, M.; ARTIS, W. M. Hydroxamate siderophore production by opportunistic and systemic fungal pathogens. **Infection and Immunity**, v. 40, n. 3, p. 1134–1139, 1983.

HU, G.; CAZA, M.; CADIEUX, B.; CHAN, V.; LIU, V.; KRONSTAD, J. *Cryptococcus neoformans* requires the ESCRT protein Vps23 for iron acquisition from heme, for

capsule formation, and for virulence. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 1, p. 292–302, 2013.

ISMAIL, A.; BEDELL, G.; LUPAN, D. Siderophore production by the pathogenic yeast, *Candida albicans*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 130, n. 2, p. 885–891, 1985.

JUNG, W. H.; KRONSTAD, J. W. Iron and fungal pathogenesis: A case study with *Cryptococcus neoformans*. **Cellular Microbiology**, v. 10, p. 277–284, 2008.

JUNG, W. H.; SHAM, A.; LIAN, T.; SINGH, A.; KOSMAN, D. J.; KRONSTAD, J. W. Iron source preference and regulation of iron uptake in *Cryptococcus neoformans*. **PLoS pathogens**, v. 4, p. 1–14, 2008.

KANE, J. F. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 6, n. suppl 7, p. 494–500, 1995.

KANETSUNA, F.; CARBONELL, L. M. Cell wall glucans of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Bacteriology**, v. 101, n. 3, p. 675–680, 1970.

KANETSUNA, F.; CARBONELL, L. M.; AZUMA, I.; YAMAMURA, Y. Biochemical studies on the thermal dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Bacteriology**, v. 110, n. 1, p. 208–218, 1972.

KARKOWSKA-KULETA, J.; KOZIK, A. Cell wall proteome of pathogenic fungi. **Acta Biochimica Polonica**, v. 62, n. 3, p. 339–351, 2015.

KLIS, F. M.; DE GROOT, P.; HELLINGWERF, K. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. **Medical Mycology**, v. 39, p. 1–8, 2001.

KNIGHT, S. a B.; VILAIRE, G.; LESUISSE, E.; DANCIS, A. Iron acquisition from transferrin by *Candida albicans* depends on the reductive pathway. **Infec**, v. 73, p. 5482–5492, 2005.

KOSMAN, D. J. Molecular mechanisms of iron uptake in fungi. **Molecular Microbiology**, v. 47, n. 5, p. 1185–1197, 2003.

KRAGL, C.; SCHRETTL, M.; ABT, B.; SARG, B.; LINDNER, H. H.; HAAS, H. EstB-mediated hydrolysis of the siderophore triacetylfusarinine C optimizes iron uptake of *Aspergillus fumigatus*. **Eukaryotic Cell**, v. 6, p. 1278–1285, 2007.

KULKARNI, R. D.; KELKAR, H. S.; DEAN, R. A. An eight-cysteine-containing CFEM domain unique to a group of fungal membrane proteins. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 28, p. 118–121, 2003.

KUZNETS, G.; VIGONSKY, E.; WEISSMAN, Z.; LALLI, D.; GILDOR, T.; KAUFFMAN, S. J.; TURANO, P.; BECKER, J.; LEWINSON, O.; KORNITZER, D. A relay network of extracellular heme-binding proteins drives *C. albicans* iron acquisition

from hemoglobin. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 10, p. 1–15, 2014.

LACAZ, C. da S. Historical evolution of the knowledge on paracoccidioidomycosis and its etiologic agent, *Paracoccidioides brasiliensis*. In: FRANCO M, LACAZ CS, RESTREPO-MORENO A, D. N. G. (Ed.). **Paracoccidioidomycosis**. [s.l.] Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 1–7.

LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P. A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, n. 21, p. 2947–2948, 2007.

LIAN, T.; SIMMER, M. I.; D’SOUZA, C. A.; STEEN, B. R.; ZUYDERDUYN, S. D.; JONES, S. J. M.; MARRA, M. A.; KRONSTAD, J. W. Iron-regulated transcription and capsule formation in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Molecular Microbiology**, v. 55, n. 5, p. 1452–1472, 2005.

LONGO, L. V. G.; DA CUNHA, J. P. C.; SOBREIRA, T. J. P.; PUCCIA, R. Proteome of cell wall-extracts from pathogenic *Paracoccidioides brasiliensis*: Comparison among morphological phases, isolates, and reported fungal extracellular vesicle proteins. **EuPA Open Proteomics**, v. 3, p. 216–228, 2014.

MACKINNON, J. E. Pathogenesis of south american blastomycosis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 53, n. 6, p. 487–494, 1959.

MANNS, J. M.; MOSSER, D. M.; BUCKLEY, H. R. Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 11, p. 5154–5156, 1994.

MARCOS, C. M.; DE OLIVEIRA, H. C.; DA SILVA, J. de F.; ASSATO, P. A.; YAMAZAKI, D. S.; DA SILVA, R. A. M.; SANTOS, C. T.; SANTOS-FILHO, N. A.; PORTUONDO, D. L.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; FUSCO-ALMEIDA, A. M. Identification and characterisation of elongation factor Tu, a novel protein involved in *Paracoccidioides brasiliensis*-host interaction. **FEMS Yeast Research**, v. 16, n. 7, 2016.

MARQUES, S. A. Paracoccidioidomycosis. **Clinics in Dermatology**, v. 30, n. 6, p. 610–615, 2012.

MARTÍNEZ, J. P.; BLANES, R.; CASANOVA, M.; VALENTÍN, E.; MURGUI, A.; DOMÍNGUEZ, Á. Null mutants of *Candida albicans* for cell-wall-related genes form fragile biofilms that display an almost identical extracellular matrix proteome. **FEMS Yeast Research**, v. 16, n. 7, 2016.

MATUTE, D. R.; MCEWEN, J. G.; PUCCIA, R.; MONTES, B. A.; SAN-BLAS, G.; BAGAGLI, E.; RAUSCHER, J. T.; RESTREPO, A.; MORAIS, F.; NIN, G.; TAYLOR, J. W.; NIÑO-VEGA, G.; TAYLOR, J. W. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 23, n. 1, p. 65–73, 2006.

MOORS, M. a; STULL, T. L.; BLANK, K. J.; BUCKLEY, H. R.; MOSSER, D. M. A role for complement receptor-like molecules in iron acquisition by *Candida albicans*.

The Journal of Experimental Medicine, v. 175, n. June, p. 1643–1651, 1992.

MUÑOZ, J. F.; FARRER, R. A.; DESJARDINS, C. A.; GALLO, J. E.; SYKES, S.; SAKTHIKUMAR, S.; MISAS, E.; WHISTON, E. A.; BAGAGLI, E.; SOARES, C. M. A.; TEIXEIRA, M. de M.; TAYLOR, J. W.; CLAY, O. K.; MCEWEN, J. G.; CUOMOC, C. A. Genome diversity, recombination, and virulence across the major lineages of *Paracoccidioides*. **mSphere**, v. 1, n. 5, p. 1–18, 2016.

MUÑOZ, J. F.; GALLO, J. E.; MISAS, E.; PRIEST, M.; IMAMOVIC, A.; YOUNG, S.; ZENG, Q.; CLAY, O. K.; MCEWEN, J. G.; CUOMO, C. A. Genome update of the dimorphic human pathogenic fungi causing paracoccidioidomycosis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 12, 2014.

MURAD, A. M.; SOUZA, G. H. M. F.; GARCIA, J. S.; RECH, E. L. Detection and expression analysis of recombinant proteins in plant-derived complex mixtures using nanoUPLC-MS^E. **Journal of Separation Science**, v. 34, n. 19, p. 2618–2630, 2011.

NAIRZ, M.; HASCHKA, D.; DEMETZ, E.; WEISS, G. Iron at the interface of immunity and infection. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5, 2014.

NASSER, L.; WEISSMAN, Z.; PINSKY, M.; AMARTELY, H.; DVIR, H.; KORNITZER, D. Structural basis of haem-iron acquisition by fungal pathogens. **Nature Microbiology**, n. September, p. 1 - 10, 2016.

NEILANDS, J. B. Siderophores. **Arquives of Biochemistry and Biophysics**, v. 302, p. 1–3, 1993.

NEMETH, E.; RIVERA, S.; GABAYAN, V.; KELLER, C.; TAUDORF, S.; PEDERSEN, B. K.; GANZ, T. IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of iron regulatory hormone hepcidin. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 113, p. 1271–1276, 2004.

NOMBELA, C.; GIL, C.; CHAFFIN, W. L. Non-conventional protein secretion in yeast. **Trends in Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 15–21, 2006.

OKAMOTO-SHIBAYAMA, K.; KIKUCHI, Y.; KOKUBU, E.; SATO, Y.; ISHIHARA, K. Csa2, a member of the Rbt5 protein family, is involved in the utilization of iron from human hemoglobin during *Candida albicans* hyphal growth. **FEMS Yeast Research**, v. 14, n. 4, p. 674–677, 2014.

PAPANIKOLAOU, G.; PANTOPOULOS, K. Iron metabolism and toxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 202, p. 199–211, 2005.

PARENTE, A. F. A.; BAILÃO, A. M.; BORGES, C. L.; PARENTE, J. A.; MAGALHÃES, A. D.; RICART, C. A. O.; SOARES, C. M. A. Proteomic analysis reveals that iron availability alters the metabolic status of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, 2011.

PENDRAK, M. L.; CHAO, M. P.; YAN, S. S.; ROBERTS, D. D. Heme oxygenase in *Candida albicans* is regulated by hemoglobin and is necessary for metabolism of

exogenous heme and hemoglobin to α -Biliverdin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 5, p. 3426–3433, 2004.

PENDRAK, M. L.; ROBERTS, D. D. Hemoglobin is an effective inducer of hyphal differentiation in *Candida albicans*. **Medical mycology**, v. 45, n. 1, p. 61–71, 2007.

PEREIRA, L. A.; BÃO, S. N.; BARBOSA, M. S.; DA SILVA, J. L. M.; FELIPE, M. S. S.; DE SANTANA, J. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; DE ALMEIDA SOARES, C. M. Analysis of the *Paracoccidioides brasiliensis* triosephosphate isomerase suggests the potential for adhesin function. **FEMS Yeast Research**, v. 7, n. 8, p. 1381–1388, 2007.

PÉREZ, A.; PEDRÓS, B.; MURGUI, A.; CASANOVA, M.; LÓPEZ-RIBOT, J. L.; MARTÍNEZ, J. P. Biofilm formation by *Candida albicans* mutants for genes coding fungal proteins exhibiting the eight-cysteine-containing CFEM domain. **FEMS Yeast Research**, v. 6, n. 7, p. 1074–1084, 2006.

PÉREZ, A.; RAMAGE, G.; BLANES, R.; MURGUI, A.; CASANOVA, M.; MARTÍNEZ, J. P. Some biological features of *Candida albicans* mutants for genes coding fungal proteins containing the CFEM domain. **FEMS Yeast Research**, v. 11, n. 3, p. 273–284, 2011.

PERUTZ, M. F.; ROSSMANN, M. G.; CULLIS, A. F.; MUIRHEAD, H.; WILL, G.; NORTH, A. C. T. Structure of Haemoglobin: A three-dimensional fourier synthesis at 5.5-Å resolution, obtained by X-ray analysis. **Nature**, v. 185, n. 4711, p. 416–422, 1960.

PIGOSSO, L. L.; PARENTE, A. F. A.; COELHO, A. S. G.; SILVA, L. P.; BORGES, C. L.; BAILÃO, A. M.; SOARES, C. M. de A. Comparative proteomics in the genus *Paracoccidioides*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 60, p. 87–100, 2013.

PISHCHANY, G.; SKAAR, E. P. Taste for blood: hemoglobin as a nutrient source for pathogens. **PLoS Pathogens**, v. 8, p. 1–4, 2012.

PITARCH, A.; NOMBELA, C.; GIL, C. Cell wall fractionation for yeast and fungal proteomics. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 425, p. 217–239, 2008.

PITARCH, A.; SÁNCHEZ, M.; NOMBELA, C.; GIL, C. Sequential fractionation and two-dimensional gel analysis unravels the complexity of the dimorphic fungus *Candida albicans* cell wall proteome. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 1, n. 12, p. 967–982, 2002.

PRADO, M.; DA SILVA, M. B.; LAURENTI, R.; TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: A review from 1996 to 2006. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 3, p. 513–521, 2009.

RESTREPO, A. M. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 23, n. 5, p. 323–334, 1985.

RESTREPO, A.; JIMÉNEZ, B. E. Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase in a chemically defined culture medium. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 12, n. 2, p. 279–81, 1980.

RESTREPO, A.; MCEWEN, J. G.; CASTAÑEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Medical Mycology**, v. 39, n. 3, p. 233–241, 2001.

SAN-BLAS, G. Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of medical and veterinary mycology**, v. 31, n. 2, p. 99–113, 1993.

SCHRETTL, M.; BIGNELL, E.; KRAGL, C.; JOEHL, C.; ROGERS, T.; ARST, H. N.; HAYNES, K.; HAAS, H. Siderophore biosynthesis but not reductive iron assimilation is essential for *Aspergillus fumigatus* virulence. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 200, n. 9, p. 1213–1219, 2004.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; TELLES FILHO, F. D. Q.; MENDES, R. P.; COLOMBO, A. L.; MORETTI, M. L.; KONO, A.; TRESOLDI, A. T.; WANKE, B.; CARVALHO, C. R.; BENARD, G.; SEVERO, L. C.; FERREIRA, M. S.; VERGARA, M. L. S.; MARTINEZ, R.; PEDRO, R. J.; MARQUES, S. A.; KHOURY, Z. Consenso em paracoccidioidomicose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 297–310, 2006.

SILVA, M. G.; SCHRANK, A.; BAILÃO, E. F. L. C.; BAILÃO, A. M.; BORGES, C. L.; STAATS, C. C.; PARENTE, J. A.; PEREIRA, M.; SALEM-IZACC, S. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; OLIVEIRA, R. M. Z.; SILVA, L. K. R. e; NOSANCHUK, J. D.; VAINSTEIN, M. H.; SOARES, C. M. de A. The homeostasis of iron, copper, and zinc in *Paracoccidioides brasiliensis*, *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, and *Cryptococcus gattii*: a comparative analysis. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, n. 3, p. 1–19, 2011.

SILVA-BAILÃO, M. G.; BAILÃO, E. F. L. C.; LECHNER, B. E.; GAUTHIER, G. M.; LINDNER, H.; BAILÃO, A. M.; HAAS, H.; SOARES, C. M. de A. Hydroxamate production as a high affinity iron acquisition mechanism in *Paracoccidioides* spp. **PLOS ONE**, v. 9, p. 1–14, 2014.

SOARES, C. M. A. .; MOLLINARI MADLUN, E. E. W. I. .; SILVA, S. P. .; PEREIRA, M. .; FELIPE, M. S. S. Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates by random amplified polymorphic DNA analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 505–507, 1995.

SOARES, M. P.; WEISS, G. The Iron age of host – microbe interactions. **EMBO Reports**, v. 16, n. 11, p. 1482–1500, 2015.

SORGO, A. G.; BRUL, S.; DE KOSTER, C. G.; DE KONING, L. J.; KLIS, F. M. Iron restriction-induced adaptations in the wall proteome of *Candida albicans*. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 159, n. 8, p. 1673–1682, 2013.

SORGO, A. G.; HEILMANN, C. J.; DEKKER, H. L.; BRUL, S.; KOSTER, C. G.; KLIS, F. M. Mass spectrometric analysis of the secretome of *Candida albicans*. **Yeast**, v. 27, p. 661–672, 2010.

STEARMAN, R.; YUAN, D. S.; YAMAGUCHI-IWAI, Y.; KLAUSNER, R. D.; DANCIS, a. A permease-oxidase complex involved in high-affinity iron uptake in yeast. **Science (New York, N.Y.)**, v. 271, n. 5255, p. 1552–1557, 1996.

TAMAYO, D.; MUÑOZ, J. F.; LOPEZ, Á.; URÁN, M.; HERRERA, J.; BORGES, C. L.; RESTREPO, Á.; SOARES, C. M.; TABORDA, C. P.; ALMEIDA, A. J.; MCEWEN, J. G.; HERNÁNDEZ, O. Identification and analysis of the role of superoxide dismutases isoforms in the pathogenesis of *Paracoccidioides* spp. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. 1–23, 2016.

TANAKA, W. T.; NAKAO, N.; MIKAMI, T.; MATSUMOTO, T. Hemoglobin is utilized by *Candida albicans* in the hyphal form but not yeast form. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 232, n. 2, p. 350–353, 1997.

TANDARA, L.; SALAMUNIC, I. Iron metabolism: current facts and future directions. **Biochimica Medica**, v. 22, p. 311–328, 2012.

TANGEN, K. L.; JUNG, W. H.; SHAM, A. P.; LIAN, T.; KRONSTAD, J. W. The iron- and cAMP-regulated gene *SIT1* influences ferrioxamine B utilization, melanization and cell wall structure in *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology**, v. 153, n. 1, p. 29–41, 2007.

TEIXEIRA, M. M.; THEODORO, R. C.; DE CARVALHO, M. J. A.; FERNANDES, L.; PAES, H. C.; HAHN, R. C.; MENDOZA, L.; BAGAGLI, E.; SAN-BLAS, G.; FELIPE, M. S. S. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 52, p. 273–283, 2009.

TEIXEIRA, M. M.; THEODORO, R. C.; NINO-VEGA, G.; BAGAGLI, E.; FELIPE, M. S. S. *Paracoccidioides* species complex: ecology, phylogeny, sexual reproduction, and virulence. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 10, p. 1–4, 2014.

TOMAZETT, P. K.; CRUZ, A. H. da S.; BONFIM, S. M. R. C.; SOARES, C. M. de A.; PEREIRA, M. The cell wall of *Paracoccidioides brasiliensis*: insights from its transcriptome. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 4, n. 2, p. 309–325, 2005.

UNTEREINER, W. A.; SCOTT, J. A.; NAVEAU, F. A.; SIGLER, L.; BACHEWICH, J.; ANGUS, A. The Ajellomycetaceae, a new family of vertebrate-associated Onygenales. **Mycologia**, v. 96, n. 4, p. 812–821, 2004.

VALLEJO, M. C.; NAKAYASU, E.; MATSUO, A.; SOBREIRA, T.; LONGO, L.; GANIKO, L.; ALMEIDA, I.; PUCCIA, R. Vesicle and vesicle-free extracellular proteome of *Paracoccidioides brasiliensis*: comparative analysis with other pathogenic fungi. **J Proteomics**, v. 11, n. 3, p. 1676–1685, 2012.

VAN HO, A.; WARD, D. M.; KAPLAN, J. Transition metal transport in yeast. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, p. 237–261, 2002.

WAGNER, G.; MOERTL, D.; ECKHARDT, A.; SAGEL, U.; WRBA, F.; DAM, K.; WILLINGER, B. Chronic paracoccidioidomycosis with adrenal involvement mimicking tuberculosis – a case report from Austria. **Medical Mycology Case Reports**, v. 14, n. November, p. 12–16, 2016.

WATANABE, T.; TAKANO, M.; MURAKAMI, M.; TANAKA, H.; MATSUHISA, A.; NAKAO, N.; MIKAMI, T.; SUZUKI, M.; MATSUMOTO, T. Characterization of a haemolytic factor from *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 145, n. 3, p. 689–694, 1999.

WEBER, S. S.; PARENTE, A. F. A.; BORGES, C. L.; PARENTE, J. A.; BAILÃO, A. M.; DE ALMEIDA SOARES, C. M.; SOARES, C. M. de A. Analysis of the secretomes of *Paracoccidioides mycelia* and yeast cells. **PLOS ONE**, v. 7, n. 12, 2012.

WEINBERG, E. D. Nutritional Immunity. **The Journal of the American Medical Association**, v. 231, n. 1, p. 39–41, 1975.

WEISSMAN, Z.; KORNITZER, D. A family of *Candida* cell surface haem-binding proteins involved in haemin and haemoglobin-iron utilization. **Molecular Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 1209–1220, 2004.

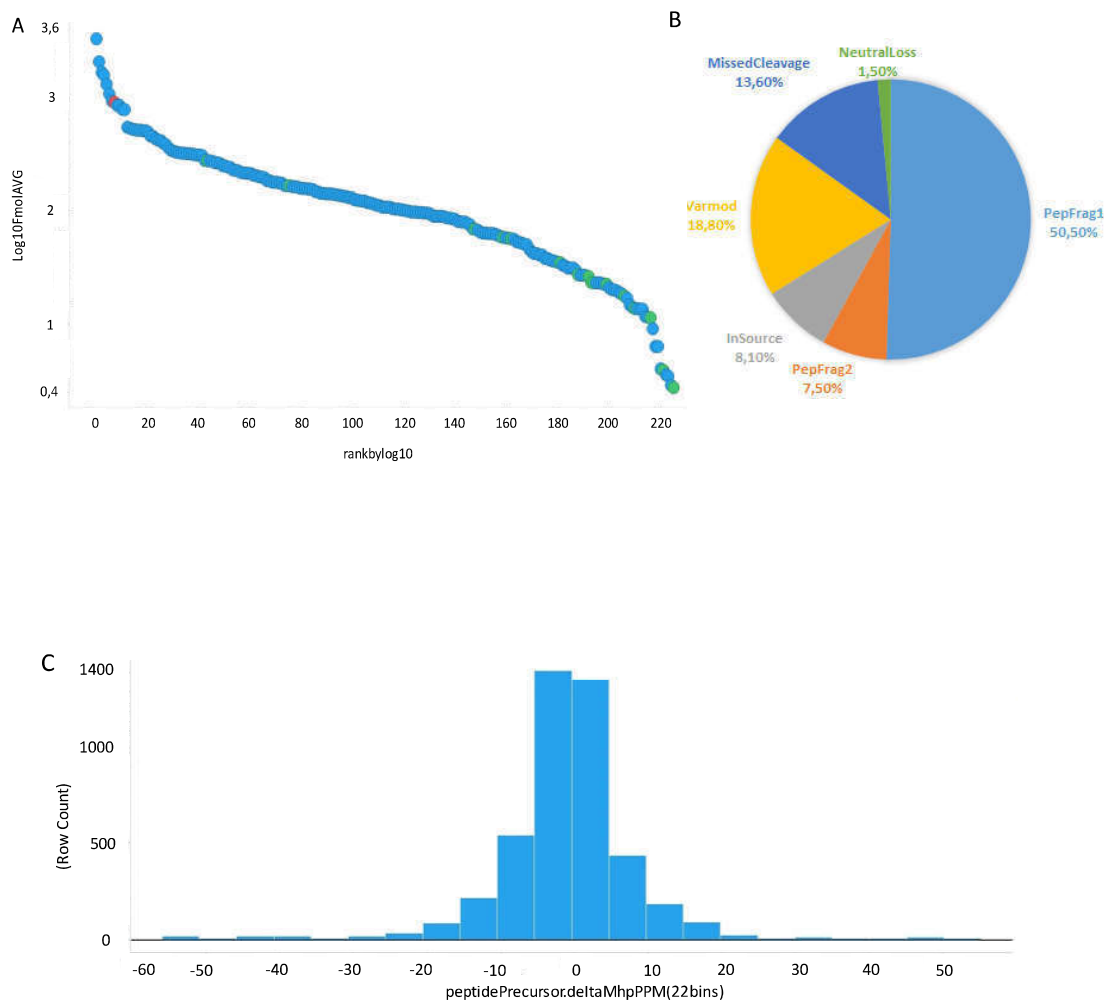
WEISSMAN, Z.; SHEMER, R.; CONIBEAR, E.; KORNITZER, D. An endocytic mechanism for haemoglobin-iron acquisition in *Candida albicans*. **Molecular Microbiology**, v. 69, p. 201–217, 2008.

YOO JI, J. II; LEE, Y. S.; SONG, C.-Y.; KIM, B. S. Purification and characterization of a 43-kilodalton extracellular serine proteinase from *Cryptococcus neoformans*. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 2, p. 722–6, 2004.

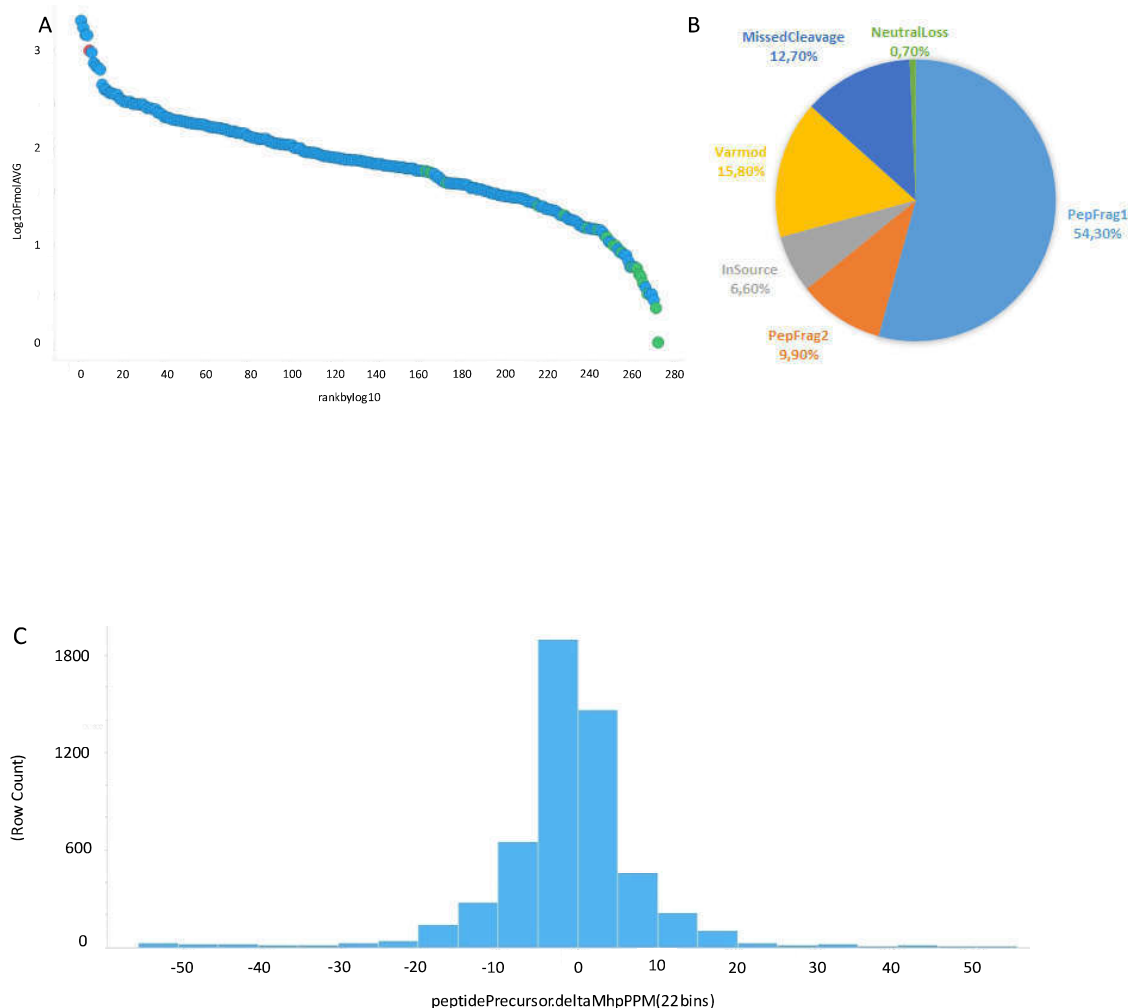
ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; PIZZINI, C. V.; MUNIZ, M. D. M.; DO VALLE, A. C. F.; ALMEIDA-PAES, R. Diagnostic aspects of paracoccidioidomycosis. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 1, p. 111–118, 2014.

ZHANG, Z.-N.; WU, Q.-Y.; ZHANG, G.-Z.; ZHU, Y.-Y.; MURPHY, R. W.; LIU, Z.; ZOU, C.-G. Systematic analyses reveal uniqueness and origin of the CFEM domain in fungi. **Scientific reports**, v. 5, p. 13032, 2015.

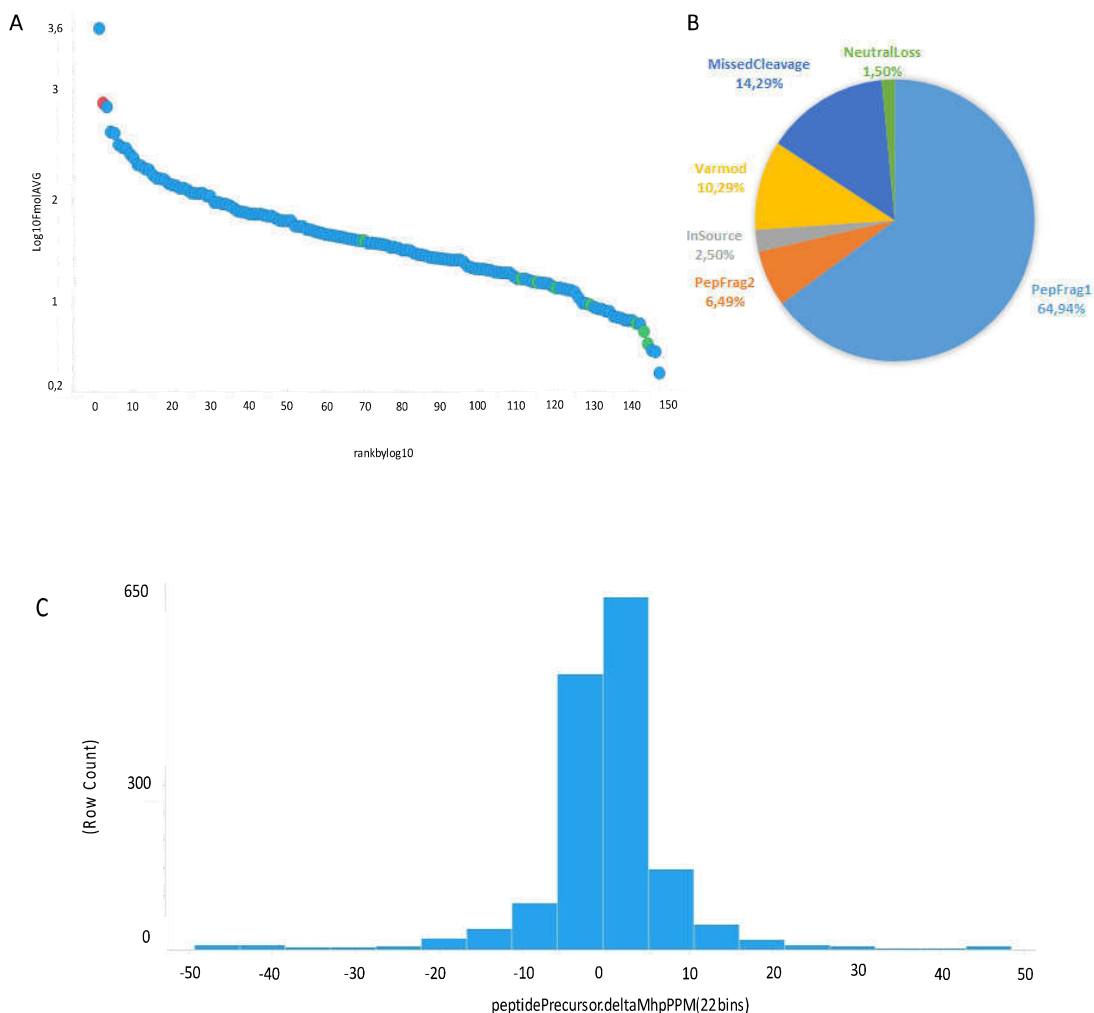
ANEXOS



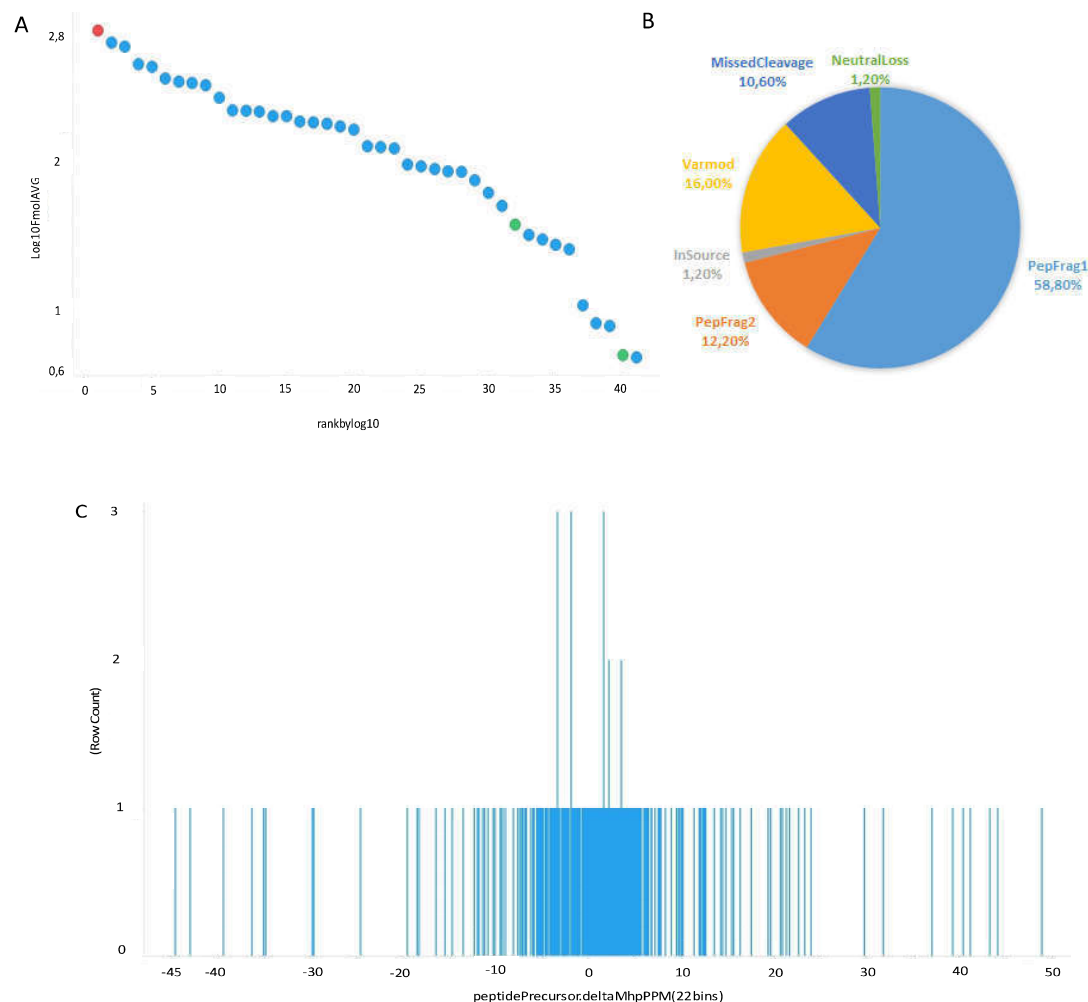
Anexo 1. Gráficos de qualidade das análises proteômicas referentes à Fração 1 de parede celular de *P. lutzii* obtida na presença de hemoglobina. **A.** Dinâmica de detecção das proteínas, considerando abundância e peso molecular destas. Círculo azul: proteínas identificadas de forma regular. Círculo verde: proteínas identificadas de forma reversa. Círculo vermelho: padrão (PHB). **B.** Tipo de detecção dos peptídeos. PepFrag1 e PepFrag2: modo de identificação no banco dados de *Paracoccidoides* pelo PLGS. VarMod: modificações variáveis. InSource: fragmentação ocorrida na fonte de ionização. MissedCleavage: perda de clivagem pela tripsina. NeutralLoss: perdas de precursores de água, amônia e/ou ácido fosfórico. **C.** Exatidão de massa. O gráfico demonstra acurácia na detecção das massas de peptídeos, em que 61,9% dos peptídeos identificados apresentaram erro de massa de 5 ppm. Análise adicionais demonstraram falsos positivos em 0,63% dos peptídeos detectados, valor baixo e que não inviabiliza as análises.



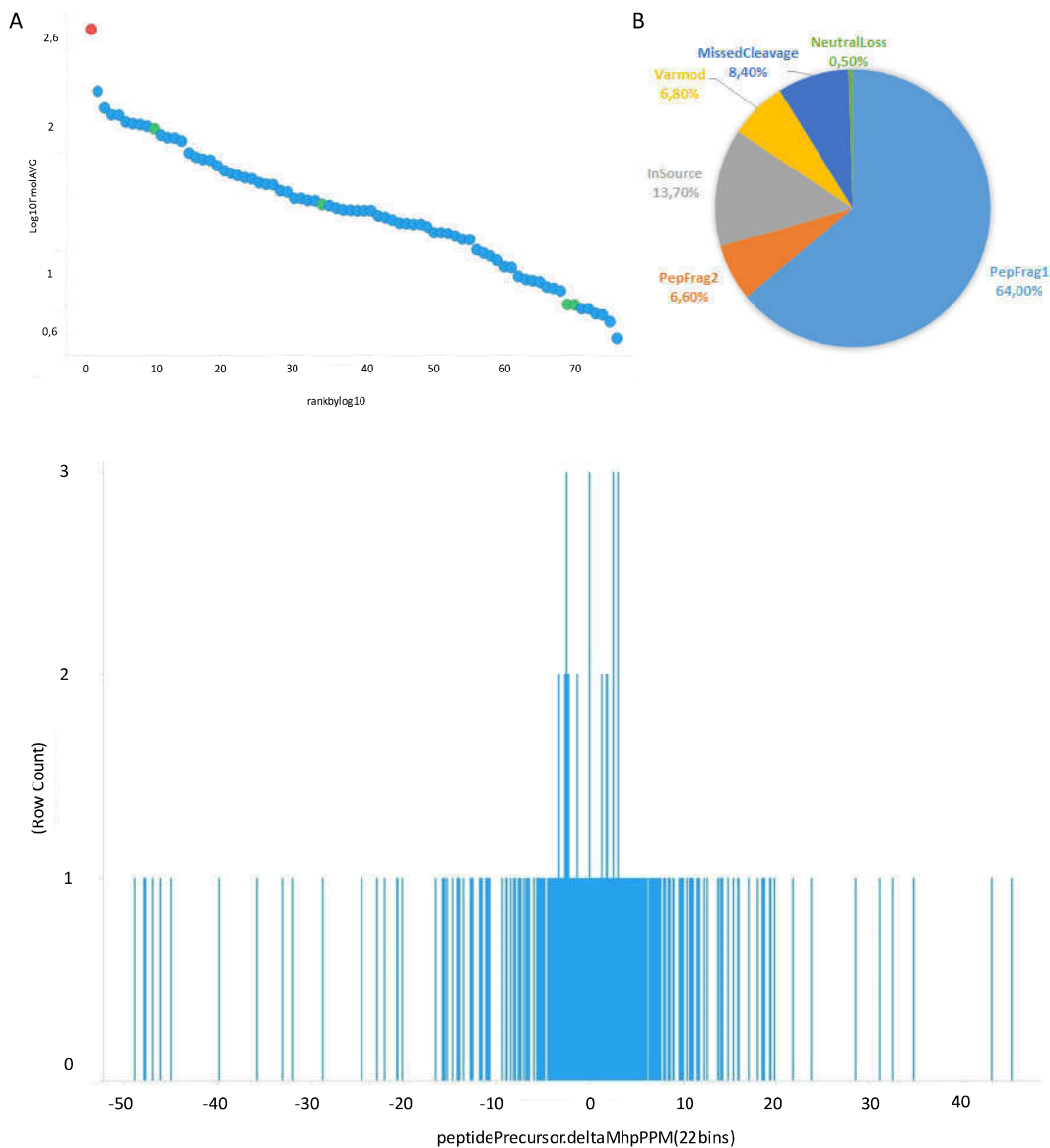
Anexo 2. Gráficos de qualidade das análises proteômicas referentes à Fração 1 de parede celular de *P. lutzii* obtida na privação de Fe. **A.** Dinâmica de detecção das proteínas, considerando abundância e peso molecular destas. Círculo azul: proteínas identificadas de forma regular. Círculo verde: proteínas identificadas de forma reversa. Círculo vermelho: padrão (PHB). **B.** Tipo de detecção dos peptídeos. PepFrag1 e PepFrag2: modo de identificação no banco dados de *Paracoccidoides* pelo PLGS. VarMod: modificações variáveis. InSource: fragmentação ocorrida na fonte de ionização. MissedCleavage: perda de clivagem pela tripsina. NeutralLoss: perdas de precursores de água, amônia e/ou ácido fosfórico. **C.** Exatidão de massa. O gráfico demonstra acurácia na detecção das massas de peptídeos, em que 62,2% dos peptídeos identificados apresentaram erro de massa de 5 ppm. Análise adicionais não detectaram a presença de falsos positivos.



Anexo 3. Gráficos de qualidade das análises proteômicas referentes à Fração 2 de parede celular de *P. lutzii* obtida na presença de hemoglobina. **A.** Dinâmica de detecção das proteínas, considerando abundância e peso molecular destas. Círculo azul: proteínas identificadas de forma regular. Círculo verde: proteínas identificadas de forma reversa. Círculo vermelho: padrão (PHB). **B.** Tipo de detecção dos peptídeos. PepFrag1 e PepFrag2: modo de identificação no banco dados de *Paracoccidoides* pelo PLGS. VarMod: modificações variáveis. InSource: fragmentação ocorrida na fonte de ionização. MissedCleavage: perda de clivagem pela tripsina. NeutralLoss: perdas de precursores de água, amônia e/ou ácido fosfórico. **C.** Exatidão de massa. O gráfico demonstra acurácia na detecção das massas de peptídeos, em que 74,2% dos peptídeos identificados apresentaram erro de massa de 5 ppm. Análise adicionais não detectaram a presença de falsos positivos.



Anexo 4. Gráficos de qualidade das análises proteômicas referentes à Fração 2 de parede celular de *P. lutzii* obtida na privação de Fe. **A.** Dinâmica de detecção das proteínas, considerando abundância e peso molecular destas. Círculo azul: proteínas identificadas de forma regular. Círculo verde: proteínas identificadas de forma reversa. Círculo vermelho: padrão (PHB). **B.** Tipo de detecção dos peptídeos. PepFrag1 e PepFrag2: modo de identificação no banco dados de *Paracoccidoides* pelo PLGS. VarMod: modificações variáveis. InSource: fragmentação ocorrida na fonte de ionização. MissedCleavage: perda de clivagem pela tripsina. NeutralLoss: perdas de precursores de água, amônia e/ou ácido fosfórico. **C.** Exatidão de massa. O gráfico demonstra acurácia na detecção das massas de peptídeos, em que 72,5% dos peptídeos identificados apresentaram erro de massa de 5 ppm. Análise adicionais não detectaram a presença de falsos positivos.



Anexo 5. Gráficos de qualidade das análises proteômicas referentes à Fração 3 de parede celular de *P. lutzii* obtida na presença de hemoglobina. **A.** Dinâmica de detecção das proteínas, considerando abundância e peso molecular destas. Círculo azul: proteínas identificadas de forma regular. Círculo verde: proteínas identificadas de forma reversa. Círculo vermelho: padrão (PHB). **B.** Tipo de detecção dos peptídeos. PepFrag1 e PepFrag2: modo de identificação no banco dados de *Paracoccidoides* pelo PLGS. VarMod: modificações variáveis. InSource: fragmentação ocorrida na fonte de ionização. MissedCleavage: perda de clivagem pela tripsina. NeutralLoss: perdas de precursores de água, amônia e/ou ácido fosfórico. **C.** Exatidão de massa. O gráfico demonstra acurácia na detecção das massas de peptídeos, em que 80,6% dos peptídeos identificados apresentaram erro de massa de 5 ppm. Análise adicionais não detectaram a presença de falsos positivos.