

## 2. JUSTIFICATIVA

---

O estudo de *Paracoccidioides* spp. e consequentemente da PCM é de relevante importância no contexto de medicina tropical, uma vez que a doença é endêmica da América Latina, com alta prevalência no Brasil (BRUMMER; CASTANEDA; RESTREPO, 1993; GONZALEZ; HERNANDEZ, 2016). Nesse contexto, o estudo dos mecanismos que *Paracoccidioides* spp. emprega no hospedeiro para contrapor a imunidade nutricional e ter acesso a diversos micronutrientes, especialmente o Fe, tem sido construído, conforme estudos disponíveis na literatura (SILVA et al., 2011; BAILÃO et al., 2014, 2015; SILVA-BAILÃO et al., 2014). Uma vez que o fungo é capaz de causar doença multifocal por disseminação hematogênica (MACKINNON, 1959), via pela qual pode ter contato com eritrócitos e consequentemente, com heme/hemoglobina, é sobremaneira relevante o entendimento dos mecanismos que o patógeno emprega para a utilização de hemoglobina como fonte de Fe.

Bailão et al., 2014, iniciaram a elucidação desses mecanismos, uma vez que identificaram, via análises *in silico*, ortólogos (*rbt5*, *csa1* e *csa2*) para com a família de receptores de hemoglobina de *C. albicans*. Esses receptores mostraram-se regulados positivamente na presença da molécula, através de análises transcricionais. Os autores seguiram com a caracterização de *PbRbt5*, atestando a capacidade da proteína se ligar à hemina bem como a sua localização na parede celular, corroborando para com a função de receptor. Entretanto, mutantes obtidos pela estratégia de RNA antisentido para *PbRbt5*, apesar de terem sofrido diminuição de sua virulência, a capacidade de utilização de hemoglobina não foi completamente abolida. Este resultado somado à presença de outros prováveis receptores identificados via análises *in silico*, é sugestivo de que assim como em *C. albicans*, *Paracoccidioides* spp. apresenta uma rede de receptores que atuam no processo. Entretanto há pouca informação sobre esses outros prováveis receptores, sendo, portanto, necessária a investigação de outras proteínas que atuem no processo.

Diante disso, é importante a ampliação do entendimento do processo de utilização de hemoglobina por *Paracoccidioides* spp., a fim de que os mecanismos que o patógeno emprega para o processo sejam elucidados de maneira mais abrangente. Este trabalho, além de contribuir para a expansão do entendimento da biologia de *Paracoccidioides* spp., também tem sua importância fundamentada na possibilidade de exposição de novos alvos que poderão ser empregados no diagnóstico diferencial e tratamento da doença.

### 3. OBJETIVOS

---

#### 3.1. Objetivo geral

Expressar *P. lutzii* (Pb01) *pga7* e analisar o proteoma da parede celular de *P. lutzii* após exposição do fungo à hemoglobina, como forma de investigar os mecanismos empregados pelo patógeno para a utilização de heme/hemoglobina.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Realizar clonagem e expressão heteróloga de *Pb01pga7*, visando a obtenção da proteína recombinante;
- Obter extratos de proteínas de parede celular de *P. lutzii* após cultivo deste em meio quimicamente definido contendo hemoglobina e submetê-los a cromatografia líquida de alta resolução, em nano escala, acoplada à espectrometria de massas, seguindo-se de análises proteômicas, como forma de investigar outras proteínas que possam estar relacionadas com a utilização de heme/hemoglobina pelo patógeno, além de *Pb01Pga7* e *Pb01Rbt5*.

## 4. MÉTODOS

---

### 4.1. Isolado e condições de cultivo

Para o presente estudo, foi utilizado o isolado *Pb01* – *P. lutzii* (ATCC MYA-826), o qual foi mantido em meio BHI (*brain heart infusion*) sólido suplementado com 4% (p/v) de glicose, na temperatura de 36°C, condição que permite ao fungo manter o estado leveduriforme. Para a extração de RNA, visando a indução da expressão de *Pb01pga7*, foi seguida a estratégia descrita por BAILÃO *et al.*, (2014): células leveduriformes foram cultivadas em meio quimicamente definido MMcM (RESTREPO; JIMÉNEZ, 1980) por 36 horas a 36°C, sob agitação e na ausência de ferro, para a depleção das reservas intracelulares do metal. Após, foram adicionados 10 µM de hemoglobina bovina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e as células foram coletadas após 2 h. Para análises proteômicas, inicialmente foi feita cultura primária de *Pb01* em meio BHI líquido, suplementado com 4% (p/v) de glicose, por 72 h, 36°C, 120 rpm. Após, 5.10<sup>6</sup> células/mL de *Pb01* foram transferidas para o meio MMcM, sem Fe e cultivadas por 36h, para a depleção das reservas intracelulares do metal. Logo após, as células foram transferidas para novo meio contendo 10 µM de hemoglobina bovina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). As células foram coletadas após 6 ou 48 h. Como controle, células foram transferidas para meio quimicamente definido, sem Fe, com 50 µM de ácido batofenantrolino disulfônico (BPS - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), um quelante de Fe.

### 4.2. Estudos de homologia

A sequência PAAG\_02225 de *P. lutzii* (disponível em [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/?term=paag\\_02225](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/?term=paag_02225)), inicialmente denominada *PbCsa1* por Bailão *et al.*, 2014, foi submetida à novo estudo de homologia para com as sequências de *Csa1* e *Pga7* de *C. albicans* (disponíveis em <http://www.candidagenome.org/cgi-bin/seqTools>). As sequências de aminoácidos foram alinhadas através do *software* ClustalX 2 (LARKIN *et al.*, 2007). Análises *in silico* adicionais foram realizadas através das ferramentas *online* SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), para a predição de peptídeo sinal; SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>), para a predição de domínios conservados e big-PI

Fungal Predictor ([http://mendel.imp.ac.at/gpi/fungi\\_server.html](http://mendel.imp.ac.at/gpi/fungi_server.html)), para a predição de sítios para a adição de âncora de glicosilfosfatidilinositol.

#### 4.3. Extração de RNA e síntese de DNAc

A estratégia descrita na seção 4.1, para a indução da expressão de *Pb01pga7* (PAAG\_02225), foi empregada e posteriormente RNA total foi extraído por meio da adição de TRIzol (TRI Reagent®, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) seguido por ruptura mecânica das células (Mini-Beadbeater™ – Biospec Products Inc., Bartlesville, OK). A síntese de DNAc foi realizada por meio de transcrição reversa *in vitro*, empregando-se *kit* comercialmente disponível (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, USA).

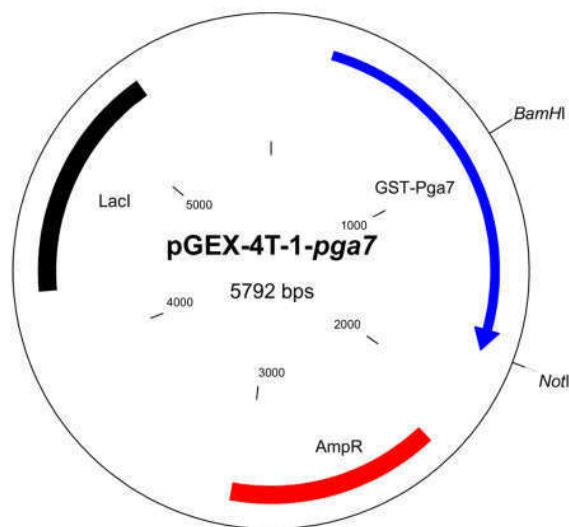
#### 4.4. Expressão heteróloga de *Pb01pga7*

Para a amplificação de *Pb01pga7* foram utilizados oligonucleotídeos já disponíveis no Banco do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Goiás, denominados *Pb01\_CSA1\_Fwd2*, 5'- GAATTCGATGAGTCCGGTCCTTAACC – 3' e *Pb01\_CSA1\_Rvs*, 5' – GTCGACCTAGATTATGAGAGCAAGAACCCC – 3' (bases grifadas correspondem aos sítios de restrição de *EcoRI* e *SalI*, de maneira respectiva), os quais amplificam 783 pb dos 846 pb da sequência codante, o que corresponde a 92,5% da sequência integral. Após amplificação [94°C – 2min; 40x (94°C - 20 seg; 60°C – 20seg; 68°C – 1min20seg); 72°C – 3min; 4°C - ∞], utilizando como molde o DNAc obtido após cultivo do fungo na presença de hemoglobina, conforme estratégia anteriormente descrita, os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v). Os produtos amplificados correspondentes a *Pb01pga7* foram excisados manualmente do gel, purificados por *kit* comercialmente disponível (QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN, EUA) e submetidos a sequenciamento pelo método de Sanger (plataforma ABI3500 - Applied Biosystems), visando a confirmação do alvo. Em seguida, o alvo foi digerido com *EcoRI/SalI* (Fermentas, EUA), visando a formação de extremidades coesivas para com o vetor de expressão pGEX-4T-3 (GE Healthcare), que também foi digerido por *EcoRI/SalI*. Após a digestão, *Pb01pga7* foi inserido no vetor de expressão pGEX-4T-3 por meio de T4 DNA-ligase (Thermo Scientific, EUA), seguindo as orientações do fabricante.



A construção obtida (pGEX-4T-3-*Pb01pga7*) foi utilizada para transformar células quimiocompetentes de *Escherichia coli* da linhagem *pLysS*, por meio de choque térmico. As colônias obtidas foram analisadas por PCR para os insertos, de forma que as que foram positivas foram submetidas a testes de indução de produção da proteína recombinante. Diferentes temperaturas (15 °C e 37 °C), tempos de indução (30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas e 16 horas) e concentrações de Isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG – 0,05 mM; 0,1 mM; 0,3 mM; 0,5 mM; 0,6 mM e 1,0 mM) foram testados. A cada tempo em teste, as células foram coletadas e centrifugadas a 13000 g e os precipitados ressuspensos em 50 µL de PBS 1X (solução salina tamponada com fosfato 1X; 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl; pH 7,3) para cada mL inicial de cultura coletada. Para verificação da efetividade da estratégia de indução, as amostras foram quantificadas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) e 5 µg de extratos proteicos foram fervidos por 10 minutos na presença de tampão de amostra [Tris-HCl 50 mM, pH 6,8; ditioneitol 100 mM, SDS 2% (p/v); azul de bromofenol 0,1% (p/v); glicerol 10% (v/v)] e submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio [SDS-PAGE 12% (p/v)], seguida de coloração por azul de *Coomassie*.

Apesar de extensivos testes visando à indução da expressão de *Pb01pga7*, a estratégia não foi efetiva. Códonos raros para *E. coli* presentes na sequência *Pb01pga7* foram identificados através da ferramenta online RACC (*Rare Codon Calculator* - disponível em <http://nihserver.mbi.ucla.edu/RACC/>). Diante do fato, optou-se pela realização da síntese química do gene, com otimização de códonos para expressão em *E. coli*, visando eliminar problemas relacionados com códonos preferenciais. O gene sintético foi inserido no vetor de expressão pGEX-4T-1, nos sítios de *Bam*HI/*Not*I, o que foi realizado pela empresa GenOne (Rio de Janeiro, Brasil). A Figura 10 consiste no mapa do vetor obtido. A construção obtida (pGEX-4T-1-*pga7*) também foi utilizada para transformação de células quimiocompetentes de *E. coli* da linhagem *pLysS* e as colônias obtidas foram submetidas aos testes de indução descritos anteriormente, a qual se mostrou efetiva. Para confirmação do alvo, SDS-PAGE foi realizada e a proteína com peso molecular de 54,5 kDa, referente a *Pb01Pga7*, foi digerida e submetida à identificação por espectrometria de massas, conforme descrito na próxima sessão.



**Figura 10. Mapa de pGEX-4T-1-*pga7*.** O gene sintético foi inserido no vetor de expressão pGEX-4T-1 nos sítios de restrição de *Bam*HI/*Not*I. AmpR: Gene de resistência ( $\beta$ -lactamase) à ampicilina. LacI: repressor Lac. bps: Pares de bases.

#### 4.5. Digestão da proteína *Pb01Pga7*, *in gel*, com tripsina

Após SDS-PAGE, a proteína induzida em *E. coli*, *Pb01Pga7*, foi excisada manualmente e submetida à digestão triptica. Para tanto, a peça excisada foi lavada duas vezes com água ultrapura. Posteriormente, foram adicionados 100  $\mu$ L de acetonitrila 100%, seguido de incubação por 5 minutos. O excesso de acetonitrila foi retirado e a amostra foi levada a *speed vacuum* para completa secagem. O procedimento foi repetido por mais duas vezes. Após, 30  $\mu$ L de uma solução de DTT 10 mM e  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  25 mM foram adicionados e foi realizada incubação a 56 °C por 1 h. O sobrenadante foi retirado e foram adicionados 30  $\mu$ L de iodoacetamida 55 mM, seguida de incubação por 45 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Após, o sobrenadante foi retirado e foram adicionados 100  $\mu$ L de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  25 mM e a amostra foi submetida a agitação vigorosa por 10 minutos. O sobrenadante foi novamente retirado e 100  $\mu$ L de uma solução de acetonitrila 50% (v/v) e bicarbonato de amônio 25 mM foram adicionados e novamente a amostra foi submetida a agitação vigorosa, agora por 5 minutos, o que foi repetido uma vez. O sobrenadante foi retirado e o material excisado foi novamente seco em *speed vacuum*. Em seguida, foram adicionados 30  $\mu$ L de uma solução de tripsina 0,05  $\mu$ g/ $\mu$ L e incubação em gelo por 10 minutos foi realizada, para a hidratação do material.

Após, o excesso de solução de Tripsina foi retirado e 25 µL de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  25mM foram adicionados, seguido de incubação por 16 h a 37 °C. O sobrenadante foi retirado e reservado em tubo novo e à peça residual de gel foram adicionados 50 µL de uma solução de acetonitrila 50% (v/v) e ácido trifluoroacético 5% (v/v), submetendo a amostra a agitação vigorosa por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e transferido para tubo novo (o que continha o primeiro sobrenadante após 16 h sob ação da tripsina, como descrito anteriormente). A amostra obtida foi seca em *speed vaccum*, ressuspensa em 12 µL de água ultrapura, purificada em colunas (ZipTips C18 Pipette Tips, Millipore, Bedford, MA, USA) seguindo as orientações do fabricante e novamente concentrada em *speed vaccum*. Os peptídeos obtidos foram ressuspensos em uma solução contendo formiato de amônio 20 mM, pH 10. A amostra foi submetida a cromatografia líquida de alta resolução, em nano escala, acoplada à espectrometria de massas com aquisição independente de dados (nanoUPLC-MS<sup>E</sup>), conforme descrito na sessão 4.9.

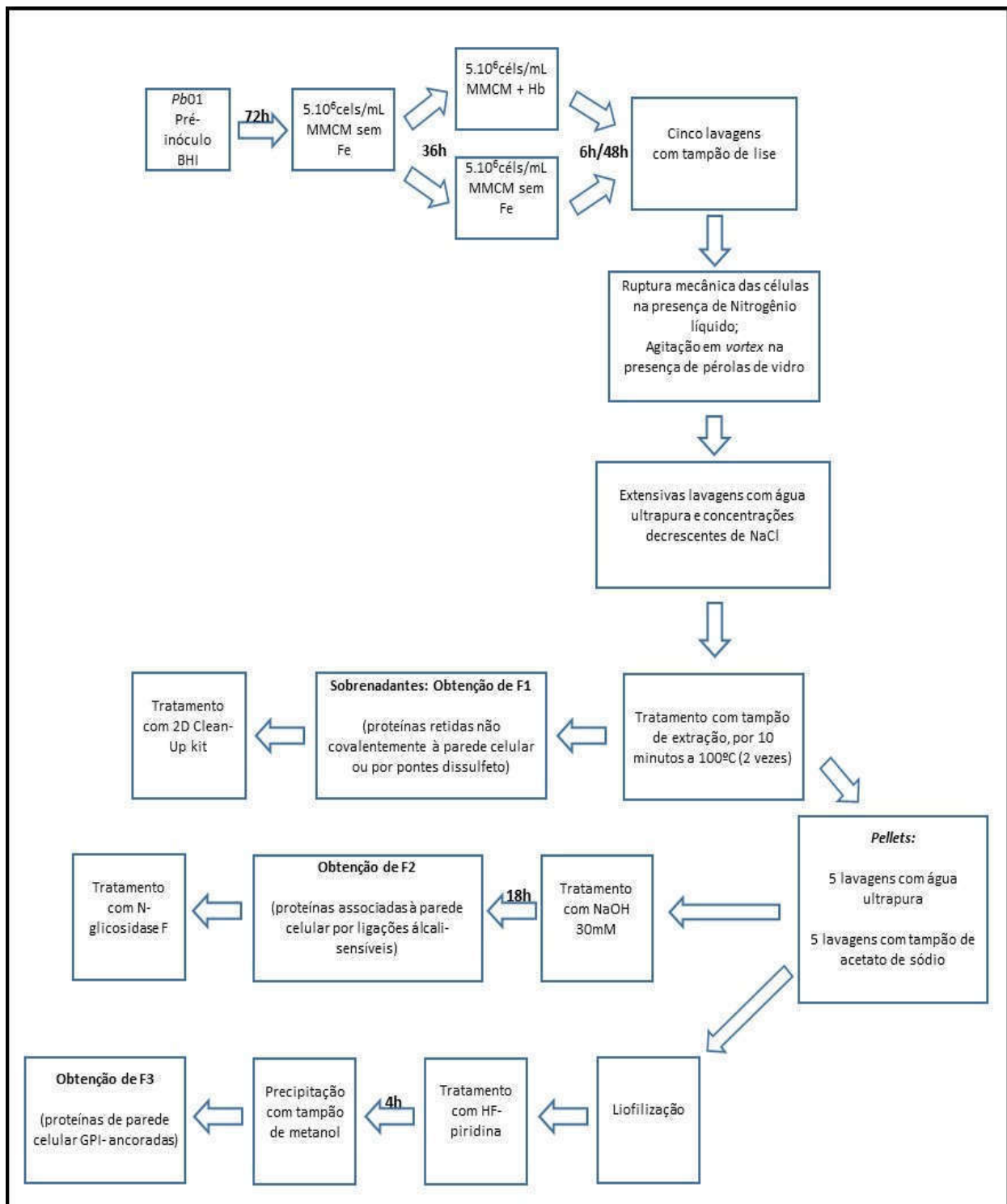
#### **4.6. Solubilização de Pb01Pga7**

A proteína recombinante Pb01Pga7 foi obtida em corpos de inclusão. Para a solubilização da proteína, foram adicionados 250 µL de lisozima 10 mg/mL (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) para cada 5 mL de precipitado oriundo do processo de indução; o material foi ressuspensa em PBS 1X. A amostra foi incubada por 1h30min, à temperatura ambiente, sob constante homogeneização. Em seguida, o material acondicionado em gelo foi submetido a 10 ciclos de sonicação, cada ciclo com duração de 5 minutos, com descanso de 1 minuto no gelo, entre os ciclos. A amostra foi centrifugada 13000 g por 5 minutos, 4°C e submetida a tratamento para solubilização, como descrito por Nasser et al., 2016, com modificações: foram adicionados 500 µL de tampão de solubilização (Tris 50 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM, NaCl 300 mM, Uréia 8 M, pH 8,0) aos precipitados e a incubação foi realizada por 1 h, à temperatura ambiente, sob moderada e constante homogeneização. Posteriormente, a mistura resultante foi centrifugada 13000 g por 30 minutos. O sobrenadante foi transferido para membranas com nível de exclusão de 10-kDa (Amicon Ultra centrifugal filter, Millipore, Bedford, MA, USA) e lavado 2 vezes com PBS 1X, para a remoção de uréia. A eficácia do processo de solubilização foi verificada por SDS-PAGE.

#### 4.7. Extração de proteínas de parede celular

Para a obtenção de proteínas de parede celular, a estratégia descrita por Pitarch; Nombela; Gil, 2008, foi empregada com algumas modificações, conforme Figura 11. Para tanto, após as 48h de cultivo do fungo na presença de hemoglobina (tratamento) ou sob privação de Fe (controle) (em acordo com o ponto de coleta empregado por BAILÃO et al., 2014, para a análise do proteoma citoplasmático de *P. lutzii* após cultivo do fungo também em MMcM contendo hemoglobina), as culturas foram coletadas e centrifugadas a 800 g por 10 min, a 4° C. Os precipitados obtidos foram lavados (800 g por 10 min a 4° C) 5 vezes com tampão de lise (10mM Tris-HCl pH 8,5, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, inibidor de protease 1:10). Posteriormente, as células foram ressuspensas em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, gelado e maceradas na presença de nitrogênio líquido.

Após a maceração, os materiais obtidos foram ressuspensos em tampão de lise gelado e pérolas de vidro (4 mm) foram acrescentadas. A mistura foi submetida a agitação em *vortex* por 1 h a 4 °C. Após, o material foi novamente centrifugado, as pérolas de vidro foram retiradas e os sedimentos obtidos foram lavados (800 g por 10 min a 4° C) 5 vezes com água ultrapura gelada; 5 vezes com NaCl 0,86 M; 5 vezes com NaCl 0,34 M e 5 vezes com NaCl 0,17 M. Os sedimentos obtidos foram tratados por duas vezes com tampão de extração (Tris-HCl 50 mM, pH 7,8; SDS 69 mM; EDTA 10 mM e Mercaptoetanol 40 mM) por 10 min à 100°C e depois centrifugados. Os sobrenadantes obtidos foram coletados, concentrados em membranas com nível de exclusão de 10-kDa (Amicon Ultra centrifugal filter, Millipore, Bedford, MA, USA) e lavados 3 vezes com água ultrapura gelada. Após, foi feito tratamento com 2-D *Clean Up Kit* (GE Healthcare) visando a remoção de sais presentes nos tampões utilizados, com mais três lavagens adicionais com água ultrapura gelada. O extrato obtido por esse processo corresponde às proteínas que são retidas não covalentemente à parede celular ou por pontes dissulfeto, chamado nesse trabalho de fração 1 (F1) de parede celular (PITARCH; NOMBELA; GIL, 2008).



**Figura 11. Fluxograma do protocolo de extração de proteínas de parede celular.** BHI: meio de infusão cérebro-coração. MMcM: meio quimicamente definido. Fe: Ferro. Hb: Hemoglobina. Cél/s/mL: células por mL. Tampão de lise: 10 mM Tris-HCl pH 8,5; 2 mM CaCl<sub>2</sub>; inibidor de protease 1:10. Tampão de extração: 50 mM Tris HCl pH 7,8; 69 mM SDS; 10 mM EDTA e 40 mM Mercaptoetanol. F1, F2 e F3: frações de parede celular.

Para a obtenção de proteínas associadas à parede celular por ligações alcali-sensíveis, os sedimentos residuais obtidos após o tratamento com tampão de extração foram lavados 5 vezes com água ultrapura gelada, 5 vezes com tampão de acetato de sódio 0,1 M, pH 5,5 e incubados com NaOH 30 mM por 18 h, a 4 °C. Após o tratamento, o material foi dialisado por 16 h contra água ultrapura. Posteriormente, o material foi centrifugado, concentrado e lavado conforme descrito anteriormente. O extrato resultante, chamado nesse trabalho de fração 2 (F2) de parede celular, ainda foi tratado com N-Glicosidase F (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), conforme orientações do fabricante, para a remoção de N-glicosilações.

Visando a obtenção de extrato enriquecido com proteínas de parede celular GPI (glicosilfosfatidilinositol)-ancoradas (fração 3 – F3), a estratégia de cultivo anteriormente descrita foi empregada, porém o tempo de cultivo na presença de hemoglobina foi de 6h. A coleta do ponto de 6h para a obtenção da F3 deveu-se ao fato de que os transcritos codificantes para *PbRbt5* e *PbPga7* sofrem regulação positiva, quando o fungo é cultivado na presença de hemoglobina, já em 2 h de exposição ao estímulo (BAILÃO et al., 2014). Adicionalmente, a possibilidade de identificar *PbRbt5* e *PbPga7* na F3 seria maior, uma vez que essas são preditas como proteínas GPI-ancoradas (BAILÃO et al., 2014). Foram seguidos, então, os procedimentos para a obtenção de proteínas de parede celular, conforme descritos anteriormente. O sedimento residual obtido após o tratamento com tampão de extração também foi lavado 5 vezes com água ultrapura gelada, 5 vezes com tampão de acetato de sódio 0,1 M, pH 5,5 e após, liofilizado, pesado e submetido a tratamento por 4 h, a 0 °C, com 10 µL de fluoreto hidrogenado de piridina (HF-Piridina - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) para cada mg de peso seco do sedimento obtido após o procedimento de liofilização. Posteriormente, o material foi centrifugado a 13000 g, a 4°C. O sobrenadante foi coletado e submetido a precipitação com tampão [metanol 50% (v/v); Tris-HCl 50 mM, pH 7,8], por 2 h a 0 °C. Após, o precipitado foi lavado (13000 g, a 4 °C) 3 vezes com o tampão acima e ressuspensionado em água ultrapura gelada (BAILÃO et al., 2014). Todos os extratos obtidos foram submetidos a SDS-PAGE.

#### **4.8. Preparo de amostras complexas para nanoUPLC-MS<sup>E</sup>**

Os extratos proteicos de parede celular obtidos foram quantificados pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Após, 300 µg dos extratos F1 e F2, obtidos após exposição à hemoglobina e na privação de Fe, além de 50 µg do extrato F3, obtido após

exposição à hemoglobina, foram preparados para serem submetidos a cromatografia líquida de alta resolução, em nano escala, acoplada à espectrometria de massas com aquisição independente de dados (nanoUPLC-MS<sup>E</sup>), conforme descrito anteriormente (MURAD et al., 2011). Inicialmente, 10 µL de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 50 mM, pH 8,5, foram adicionados às amostras. Em seguida, como agente surfactante, foram adicionados 25 µL de uma solução de RapiGest 0,2% (p/v) para cada 50 µg de proteína e a mistura foi incubada a 80°C, por 15 minutos. Após o período de incubação, 2,5 µL de DTT 100 mM, um agente redutor, foram adicionados e nova incubação, a 60 °C, por 30 minutos, foi realizada. Ao fim do período de incubação, aguardou-se que as amostras atingissem temperatura ambiente e 2,5 µL de Iodoacetamida 300 mM, um agente alquilante, foram adicionados e a mistura permaneceu em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Em seguida, as amostras foram submetidas a digestão triptica. Para tanto, foram adicionados 10 µL de uma solução de tripsina 0,05 µg/µL para cada 50 µg de proteínas e incubação a 37 °C por 16 h foi realizada. Posteriormente, para a precipitação do agente surfactante, foram adicionados 10 µL de ácido trifluoroacético 5% (v/v) para cada 50 µg de proteínas e incubação ainda a 37 °C foi realizada por mais 90 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas 13.000 g por 30 minutos, a 4 °C e os sobrenadantes foram transferidos para tubos novos. O processo de centrifugação foi repetido até que não houvesse mais a formação de precipitado. As amostras foram concentradas em *speed vaccum*, ressuspensas em 12 µL de água ultrapura, purificadas em colunas *ZipTip Pipette Tips* (ZipTips C18 Pipette Tips, Millipore, Bedford, MA, USA) seguindo as orientações do fabricante e novamente concentradas em *speed vaccum*.

Os peptídeos obtidos a partir da digestão dos extratos F1 de parede celular foram ressuspensos em 60 µL de solução contendo formiato de amônio 20 mM, pH 10 com 200 fmol/µL de PHB (*Rabbit Phosphorylase B*) (Waters Corporation, Manchester, UK) (MassPREP<sup>TM</sup> protein). Os peptídeos obtidos a partir da digestão dos extratos F2 de parede celular foram ressuspensos em 60 µL de solução contendo formiato de amônio 20 mM, pH 10 com 80 fmol/µL de PHB. Os peptídeos obtidos a partir da digestão dos extratos F3 de parede celular foram ressuspensos em 60 µL de solução contendo formiato de amônio 20 mM, pH 10 com 50 fmol/µL de PHB. PHB foi utilizado como padrão interno. As amostras obtidas foram submetidas a cromatografia líquida de alta resolução, em nano escala, acoplada à espectrometria de massas com aquisição independente de dados (nanoUPLC-MS<sup>E</sup>), conforme descrito na sessão subsequente.

#### 4.9. Cromatografia líquida de alta resolução, em nano escala, acoplada à espectrometria de massas

As amostras que passaram pelos tratamentos de digestão triptica descritos nas seções 4.5 e 4.8 foram submetidas a cromatografia líquida de alta resolução, em nano escala, por meio do sistema *ACQUITY UPLC® M-Class* (Waters Corporation, USA). O fracionamento dos peptídeos foi realizado em uma pré-coluna de fase reversa *XBridge® Peptide 5 µm BEH130 C18 300 µm x 50 mm* (Waters, USA), sistema que foi mantido em fluxo de 0,5 µL/min com uma condição inicial de acetonitrila (ACN) de 3%, o que consistiu na primeira dimensão. Os peptídeos foram submetidos a 5 fracionamentos (F1-F5), propiciados pelo emprego de diferentes gradientes lineares de concentrações de ACN (F1-11,4%; F2-14,7%; F3-17,4%; F4-20,7% e F5-50%). Para a realização da segunda dimensão, cada fração foi eluída em coluna de aprisionamento *Trap, 2D Symmetry® 5 µm BEH100 C18*, 180 µm x 20mm (Waters, USA) e passaram por separação em coluna analítica *Peptide CSH™ BEH130 C18 1,7 µm*, 100 µm x 100 mm (Waters, USA), em fluxo de 0,4 µL/min a 40 °C. A proteína *[Glu1]-Fibronopeptide B human* (GFP - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) foi utilizada para calibração de massa, a qual foi mensurada a cada 30 segundos e em fluxo constante de 0,5 µL/min. GFP foi utilizada na concentração de 200 fmol/µL. A identificação e quantificação dos peptídeos foram realizadas por um espectrômetro de massas *Synapt G1 MS™* (Waters, USA) equipado com uma fonte de *NanoElectronSpray* e dois analisadores de massa [um primeiro quadrupolo e o segundo tempo de voo (TOF) operando em modo V], operando em modo MS<sup>E</sup>, que faz a troca entre energia baixa (6V) e energia alta (40V) em cada modo de aquisição 0,4 s. Três réplicas experimentais foram realizadas para os extratos F1 e F3 analisados. Para o extrato F2 foram realizadas duas réplicas experimentais.

#### 4.10. Processamento dos espectros e análises proteômicas

Após nanoUPLC-MS<sup>E</sup>, o processamento de dados foi realizado através do *software ProteinLynx Global Server version 3.0.2* (PLGS) (Waters, Manchester, UK), o qual permitiu a determinação do tempo de retenção de massa exata (EMRT) dos peptídeos bem como inferir o peso molecular destes, através da razão massa/carga ( $m/z$ ). Para a identificação de peptídeos, os espectros obtidos (juntamente com sequências reversas) foram comparados com sequências disponíveis no banco de dados de *P. lutzii*



(Pb01) (<https://www.broadinstitute.org/fungal-genome-initiative/paracoccidioides-genome-project>). Os critérios de identificação das proteínas incluíram: (i) detecção de no mínimo dois íons por fragmentos de peptídeos, (ii) cinco por fragmentos de proteínas, (iii) determinação de pelo menos um peptídeo por proteína, (iv) taxa de detecção de falso positivo de no máximo 4 %, (v) carbamidometilação da cisteína, (vi) oxidação da metionina, (vii) fosforilação da serina, treonina e tirosina, (viii) e um sítio de clivagem perdida pela tripsina foi permitido. O erro de massa tolerável para identificação dos peptídeos foi de até 50 ppm. Os gráficos de qualidade (Anexos 1-5) referentes às corridas foram gerados através dos softwares *MassPivot v1.0.1* (gentilmente cedido pelo Dr. André Murad) e *FBAT software* (LAIRD et al., 2000) e *Spotfire® v8.0* (TIBCO Software Inc.®), *Microsoft Office Excel* (Microsoft®, USA). Foram incluídas nas análises subsequentes proteínas presentes em pelo menos duas das três réplicas experimentais dos extratos F1 e F3. Dos extratos F2, foram incluídas apenas proteínas presentes nas duas réplicas experimentais.

Os dados obtidos referentes aos extratos de proteínas de parede F1 e F2 foram submetidos a análise de expressão diferencial. Para tanto, inicialmente, as proteínas que apresentaram menor coeficiente de variância e que foram detectadas em todas as réplicas foram utilizadas para normalização de intensidade. Após, o Algoritmo de Expressão (Expression<sup>E</sup>), que faz parte do *software* PLGS (GEROMANOS et al., 2009), foi utilizado para as análises de expressão diferencial. 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. O extrato F3 de proteínas de parede, obtido na presença de hemoglobina, foi submetido a análise descritiva. A classificação das proteínas obedeceu à categorização funcional do MIPS (*Munich Information Center for Protein Sequences* - <http://mips.helmholtz-muenchen.de/funcatDB/>) suportada por outras ferramentas *online*, as quais foram o UniProt (<http://www.uniprot.org/>), PEDANT (<http://pedant.gsf.de/>) e KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* - <http://www.genome.jp/kegg/>). Foi realizada investigação de homologia de proteínas hipotéticas identificadas através da ferramenta *online* BLASTp (*Basic Local Alignment Search Tool* - <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>).

As sequências proteicas ainda foram submetidas a análises *in silico* adicionais para a predição de peptídeo sinal, através da ferramenta *online* SignalP 4.1 Server. Para a predição de secreção por vias não clássicas, foi utilizada a ferramenta *online* SecretomeP 2.0 (disponível em <http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>). Para a predição de

domínios conservados e sítios para a adição de âncora de glicosilfosfatidilinositol, as ferramentas também *online* SMART e big-PI Fungal Predictor foram utilizadas, respectivamente. A predição de potenciais adesinas foi realizada através da ferramenta *online* FaaPred (disponível em <http://bioinfo.icgeb.res.in/faap/>).

## 5. RESULTADOS

---

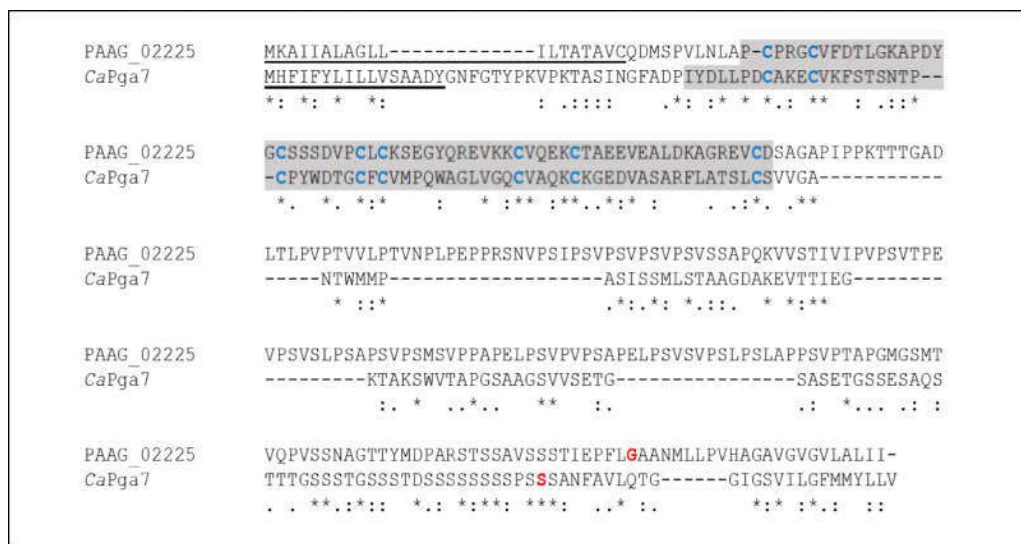
### 5.1. Expressão heteróloga de *Pb01pga7*

Tendo em vista que a utilização de hemoglobina como fonte de Fe por *Paracoccidioides* spp. consiste em um importante atributo de virulência para o patógeno e que o entendimento dos mecanismos moleculares empregados pelo fungo para tal ainda necessita ser expandido, objetivou-se a caracterização de um outro provável receptor de hemoglobina, proposto por BAILÃO et al., 2014. O código de acesso desse provável receptor é PAAG\_02225 (disponível em [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/XP\\_002795519.2](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/XP_002795519.2)) e foi inicialmente denominado *PbCsa1*, devido a homologia que apresentava para com *Csa1* de *C. albicans*.

#### 5.1.1. Novo estudo de homologia da sequência PAAG\_02225

Após a publicação do trabalho de BAILÃO et al., 2014, o genoma de *Paracoccidioides* spp. passou por atualizações (MUÑOZ et al., 2014, 2016), as quais resultaram em alterações na sequência PAAG\_02225 inicialmente publicada. Tendo isso em vista, foi realizada nova análise de homologia da sequência PAAG\_02225 para com a sequência de *Csa1* de *C. albicans*, conforme Figura 12, que evidenciou baixa similaridade entre as sequências. Uma vez que PAAG\_02225 apresenta domínio CFEM, característica que sugere função da proteína no evento de captação de heme, a homologia da sequência para com *Pga7*, um dos componentes da rede de receptores de heme em *C. albicans*, foi investigada, conforme Figura 13. Surpreendentemente, a sequência PAAG\_02225 apresenta maior semelhança para com *Pga7* de *C. albicans* e, por isso, sugere-se que a sequência seja denominada não mais *PbCsa1*, mas sim, *PbPga7*, como forma de analogia ao evento de captação de heme que ocorre em *C. albicans*, e que possivelmente ocorre de maneira similar em *Paracoccidioides* spp.

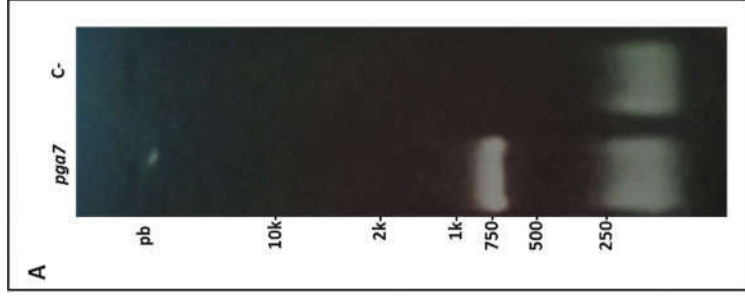




**Figura 13. Alinhamento da sequência PAAG\_02225 com Pga7 de *C. albicans*.** Análise de homologia foi realizada entre a sequência proteica de PAAG\_02225 (281 resíduos de aminoácidos - disponível em [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/XP\\_002795519.2](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/XP_002795519.2)) e a sequência proteica de Pga7 (219 resíduos de aminoácidos) de *C. albicans*. Peptídeos sinais (preditos pela ferramenta *online* SignalP 4.1 Server, disponível em: <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) encontram-se sublinhados. Domínios CFEM (preditos pela ferramenta *online* SMART, disponível em <http://smart.embl-heidelberg.de/>) encontram-se sombreados em cinza, com os resíduos de cisteína – C, característicos do domínio, destacados em azul. Sítios para a adição de glicosilfosfatidilinositol (preditos pela ferramenta *online* big-PI Fungal Predictor, disponível em [http://mendel.imp.ac.at/gpi/fungi\\_server.html](http://mendel.imp.ac.at/gpi/fungi_server.html)) encontram-se destacados em vermelho. Asteriscos indicam aminoácidos conservados entre as sequências. Os símbolos : e . demonstram de maneira decrescente a similaridade entre os aminoácidos das sequências avaliadas. Alinhamento realizado com o software ClustalX 2. *Ca*: *C. albicans*.

### 5.1.2. Amplificação de *Pb01pga7* e confirmação do alvo por sequenciamento

Como passo inicial para a caracterização de *PbPga7*, a estratégia de expressão heteróloga foi empregada. A sequência genômica de *Pbpga7* de *P. lutzii* (*Pb01*) é interrompida por *introns*, fato que fez necessária a extração de RNA e síntese de DNAc, para após realizar a amplificação do alvo. Para a obtenção de cópias do RNAm de *Pb01pga7* em quantidade significativa, foi empregada a estratégia de cultivo do fungo na presença de hemoglobina descrita por BAILÃO et al., 2014, os quais demonstraram a regulação positiva de *Pb01pga7* em nível transcricional, quando o fungo foi cultivado na presença de hemoglobina. A amplificação de *Pb01pga7* por PCR foi efetiva, conforme evidenciado pela Figura 14 A. O alvo ainda foi confirmado através de sequenciamento pelo método de Sanger, conforme Figura 14 B.



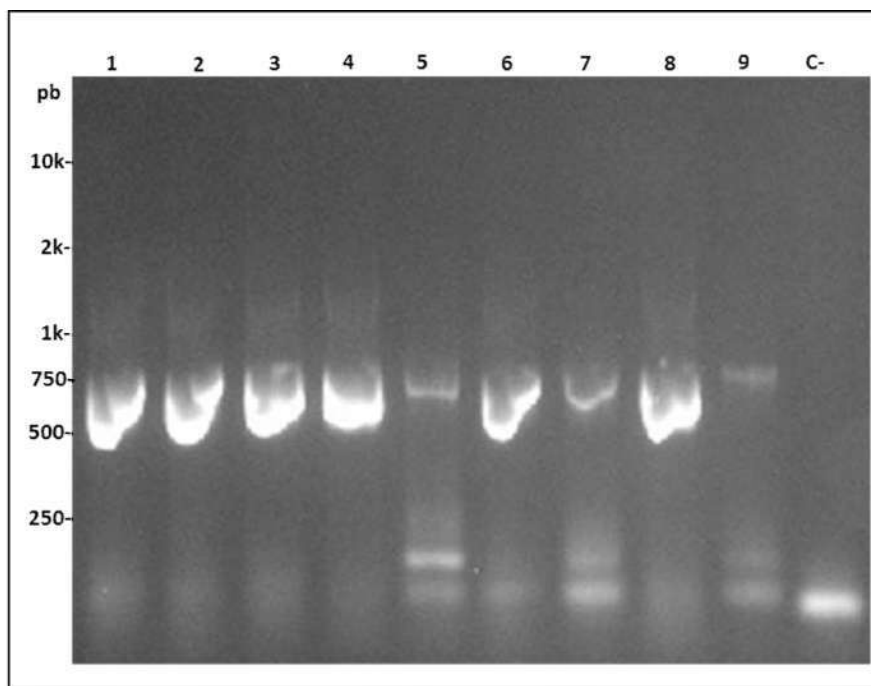
|               |                                                                                                         |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>B</b>      |                                                                                                         |
| SeqSA         | -----                                                                                                   |
| <i>pga7</i> R | ATGAAGGCCATCATGTCCTGGCTCCTCATCTGACCGCCACAGCCGTGTGTCAAGATATGAGTCGGTCTTTAACTTGTCTCCCTGCCCTAGGGG           |
| SeqSA         | ATGTGTCCTTGACACCCCTTGGAAAGGCCCTGATTATGGCTGCTCTCCAGTGACGTTTCTGTCTCTGCAAGAGCGGAAGGTTATCAGGGTGAAGTCAAGA    |
| <i>pga7</i> R | ATGTGTCCTTGACACCCCTTGGAAAGGCCCTGATTATGGCTGCTCTCCAGTGACGTTTCTGTCTCTGTAAGAGCGGAAGGTTATCAGGGTGAAGTCAAGA    |
|               | *****                                                                                                   |
| SeqSA         | AATGTGTCAGGAGA-----                                                                                     |
| <i>pga7</i> R | AATGTGTCAGGAGAAATGCACCTGCTGAGGAAGTCGAAGCCTTGGACAAAGCTGGTCGTGAAGTCTGTGATAGTCTGTGGAGCTCCTATTCCCCCAAGACC   |
|               | *****                                                                                                   |
| SeqSA         | ACCACTGGAGCTGATCTTACCCCTTCAGTTCACACTGTTGTGCTGCCAACTGTCAATCTCTCCCTGAACCCCTCGGTCAAAATGTTCCATCTATTCCATC    |
| <i>pga7</i> R | ACCACTGGAGCTGATCTTACCCCTTCAGTTCACACTGTTGTGCTGCCAACTGTCAATCTCTCCCTGAACCCCTCGGTCAAAATGTTCCATCTATTCCATC    |
|               | -----                                                                                                   |
| SeqSA         | TGTCCCATCTGTCCCATCTGTCCCTCTGTTTTCATCTGCTCTCTCAAAAAGTCGTTTCAAACTATTGTTATACCTGTTCCCTCTGTACTCTCTGAAGTCCCTT |
| <i>pga7</i> R | TGTCCCATCTGTCCCATCTGTCCCTCTGTTTTCATCTGCTCTCTCAAAAAGTCGTTTCAAACTATTGTTATACCTGTTCCCTCTGTACTCTCTGAAGTCCCTT |
|               | *****                                                                                                   |
| SeqSA         | CGGTTAGTCTCCCTCTACYCCCTTCYGTGCCCTCTCTGTCTGTGCCCCCTGCCCCCTGAGTTGCCCTCCGTA-----                           |
| <i>pga7</i> R | CGGTTAGTCTCCCTCTACYCCCTTCYGTGCCCTCTCTGTCTGTGCCCCCTGCCCCCTGAGTTGCCCTCCGTA-----                           |
|               | *****                                                                                                   |
| SeqSA         | GTA---GTCCCTTCCWACCTTCCATTGCTCCACCTAGTGTCCCTTACTGCCCCCAGGTATGGGTCCATGACAGTTTCAGCCCGTGTCTATCCAGCGCAGGAAC |
| <i>pga7</i> R | GTA---GTCCCTTCCWACCTTCCATTGCTCCACCTAGTGTCCCTTACTGCCCCCAGGTATGGGTCCATGACAGTTTCAGCCCGTGTCTATCCAGCGCAGGAAC |
|               | *****                                                                                                   |
| SeqSA         | TACCTACAYGGATCCGGCTAGGACTTATYATGTCGTCTCCAGCTCCACCTCGAGCCATCTCTTGGCGCAGCAAAATATGCTATT-----               |
| <i>pga7</i> R | TACCTACAYGGATCCGGCTAGGACTTATYATGTCGTCTCCAGCTCCACCTCGAGCCATCTCTTGGCGCAGCAAAATATGCTATT-----               |
|               | *****                                                                                                   |
| SeqSA         | GTGCGGTTGGCGTCCGGGGTTCTTGCTCTCATAATCTAG-----                                                            |
| <i>pga7</i> R | GTGCGGTTGGCGTCCGGGGTTCTTGCTCTCATAATCTAG-----                                                            |

**Figura 14. Amplificação de *Pb01pga7* e confirmação do alvo por sequenciamento.** A. Perfil eletroforético do fragmento de DNA *Pb01pga7*, cujo peso molecular predito é de 783pb (92,5% da sequência integral). Gel de agarose 0,8% (p/v). Para a indução da expressão de *Pb01pga7*, *P. lutzii* (*Pb01*) foi cultivado sob privação de Fe por 36h, 37°C e, após, 10 µM de hemoglobina foram adicionados ao meio (MMcM – meio quimicamente definido). Após 2h, as células foram coletadas, RNA total foi extraído e síntese de cDNA foi realizada. O DNAc obtido foi usado como molde para a amplificação de *Pb01pga7*, realizada por PCR (*Polymerase Chain Reaction*). c-: controle negativo. Marcador de peso molecular à esquerda, pb: pares de bases. B. Confirmação da sequência de *Pb01pga7* por sequenciamento (método de Sanger). O fragmento de DNA correspondente a *Pb01pga7* foi excisado manualmente do gel, purificado por *kit* comercialmente disponível e submetido a sequenciamento pelo método de Sanger. Após o sequenciamento, as sequências obtidas foram alinhadas à sequência de referência (disponível em [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/XM\\_002795473.2](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/XM_002795473.2)). Asteriscos indicam nucleotídeos idênticos. Alinhamento realizado com o software ClustalX 2. *pga7*R: sequência de referência de *Pb01pga7*. SeqSA: sequências obtidas após sequenciamento utilizando os oligonucleotídeos *sense* e *antisense*, os quais também foram utilizados para a amplificação de *Pb01pga7*.



### 5.1.3. Confirmação de clonagem por PCR de colônias

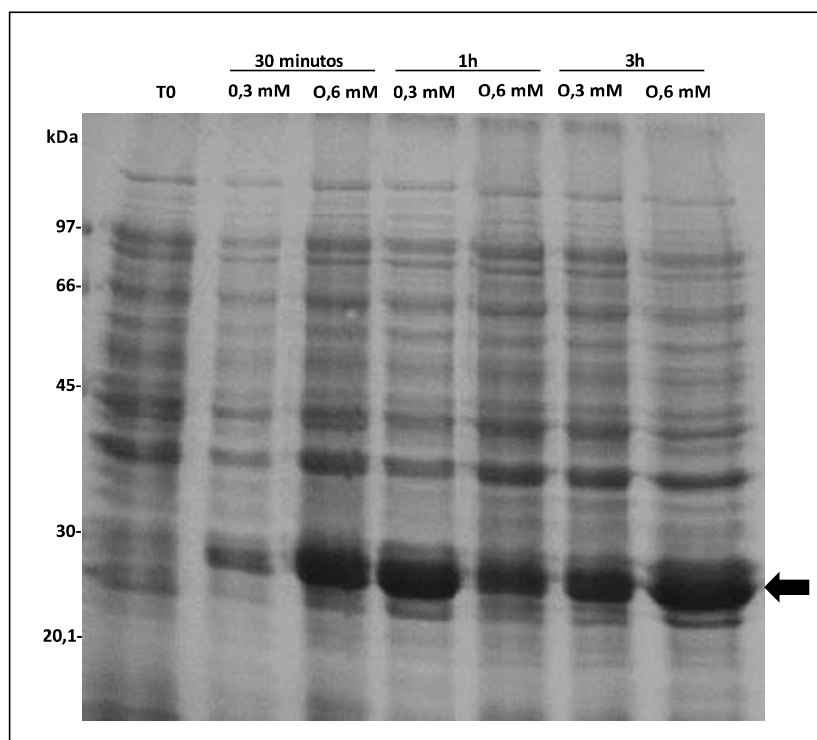
Após a confirmação do alvo por sequenciamento, seguiu-se com os procedimentos para expressão heteróloga. Foi realizada a ligação do fragmento de DNA de *Pb01pga7* (inserto) no vetor de expressão pGEX-4T-3. A construção pGEX-4T-3-*Pb01pga7* foi utilizada para a transformação de células quimiocompetentes de *E. coli* da linhagem *pLysS*. As colônias obtidas após o processo de transformação foram analisadas por PCR para a verificação presença da construção pGEX-4T-3- *Pb01pga7*, conforme Figura 15.



**Figura 15. Triagem de colônias para pGEX-4T-3-*pga7* por PCR (Polymerase Chain Reaction).** Células quimiocompetentes de *E. coli* da linhagem *pLysS* foram submetidas a transformação por meio de choque térmico, para otimizar o recebimento da construção pGEX-4T-3-*pga7*. Colônias obtidas após a transformação foram analisadas para a positividade ou não da presença da construção pGEX-4T-3-*pga7* através de PCR. Os produtos obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v). Raias numeradas de 1 a 9: colônias positivas representativas de um processo de extensiva triagem de um grande número de colônias. A positividade está no fato da identificação de fragmentos de DNA do tamanho próximo ao esperado (783 pb) terem sido obtidos. Marcador de peso molecular à esquerda. pb: pares de bases. C-: controle negativo.

#### 5.1.4. Indução da expressão de *Pb01pga7*

Diversas colônias que receberam a construção pGEX-4T-3-*Pb01pga7*, confirmadas por PCR, foram submetidas a testes de indução da expressão de *Pb01pga7*. Diferentes concentrações de IPTG, tempos de indução e inclusive temperaturas foram testadas, porém nenhuma das estratégias mostrou-se efetiva, uma vez que apenas GST (à qual *Pb01pga7* deveria ser expressa fusionada) foi induzida, conforme evidenciado pela Figura 16, que consiste em um resultado representativo de um dentre os extensivos testes realizados durante o desenvolvimento desse trabalho.



**Figura 16. A indução da expressão de *Pb01pga7* não foi efetiva.** Gel representativo de testes de indução de colônia positiva para pGEX-4T-3-*Pb01pga7*. Diferentes tempos (30 min, 1 h e 3 h) e concentrações de IPTG (isopropil  $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo - 0,3 mM e 0,6 mM) foram testados. A indução ocorreu a 37 °C, sob constante rotação. Antes da adição de IPTG, foi coletada alíquota (T0 – tempo zero) destinada para controle na análise de indução de expressão. A cada tempo em teste, alíquotas foram coletadas. Para verificação da efetividade ou não da estratégia de indução, as amostras foram submetidas a SDS-PAGE 12% (v/v). Esperava-se que após a indução, fosse perceptível o aumento de intensidade de uma proteína de 54,5 kDa, correspondente a Pga7 fusionada à GST. Outra proteína de 26 kDa, correspondente à GST (glutathione S-transferase) foi perceptível (seta), demonstrando a existência de problemas na estratégia empregada. Extensivos testes com outras colônias positivas, além de outras concentrações de IPTG, temperatura e intervalos de tempo foram realizados, porém também se mostraram não efetivos. Marcador de peso molecular à esquerda. kDa: Quilo Dalton. Gel corado por azul de *coomassie*.



### 5.1.5. Investigação da presença de códons raros para *E. coli* na sequência de *Pb01pga7*

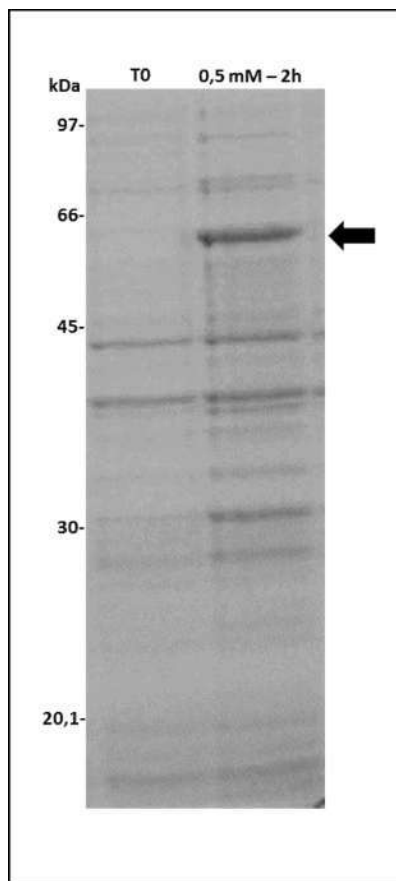
Tendo em vista a ocorrência da indução da expressão de GST, mas não a indução da expressão de GST-*Pb01Pga7*, suspeitou-se de problemas na inserção do *Pb01pga7* no vetor de expressão. Inicialmente, os oligonucleotídeos utilizados foram investigados, os quais além de empregados na amplificação do alvo, também geram adaptadores para o evento de inserção do gene no vetor de expressão. Entretanto, análises *in silico* não levaram a qualquer evidência de problemas devido a erros no desenho dos oligonucleotídeos, erros que poderiam resultar na inserção incorreta do gene no vetor de expressão, causando mudança na fase de leitura e, conseqüentemente, problemas para o momento de tradução. Outra possibilidade levantada foi a de que haveria a presença de códons raros para *E. coli* na sequência de *Pb01pga7*, o que poderia ser a causa de problemas no evento de tradução, o que foi confirmado, conforme Figura 17, onde vários códons raros para *E. coli* foram identificados na sequência de *Pb01pga7*.

```
atg aag gcc atc att gcc ctt gct ggg ctc ctc atc ctg acc gcc aca gcc gtg
tgt caa gal atg agt ccg gtc ctt aac ctt gct CCC tgc cct AGG gga tgt gtc
ttc gac acc ctt gga aag gcc cct gal tat ggc tgc tcc tcc agt gac gtt CCC
tgt ctc tgt aag agc gaa ggg tat cag cgt gaa gtc aag aaa tgt gtc cag gag
aaa tgc act gct gag gaa gtc gaa gcc ttg gac aaa gct ggt cgt gaa gtc tgt
gal agt gct gga gct cct att CCC CCC aag acc acc act gga gct gal ctt acc
ctt cca gtt CCC act gtt gtc ctg cca act gtc aat cct ctc cct gaa CCC cct
cgg tca aat gtt cca tct att cca tct gtc cca tct gtc cca tct gtc CCC tct
glt tca tct gct cct caa aaa gtc gtt tca act att gtt ATA cct gtt CCC tct
glt act cct gaa gtc cct tgg gtt agt ctc CCC tct gct cct tct gtc CCC tct
atg tct gtc CCC cct gcc cct gag ttg CCC tcc gta cct gtc CCC tct gcc cct
gag ttg CCC tcc gta tct gtt cct tcc ctt cct tcc ctt gct cca CCC agt gtc
cct act gcc cca ggt atg gga tcc atg aca gtt cag CCC gtc tca tcc aac gca
gga act acc tac atg gat ccg gct AGG agt act tca tct gct gtc tcc agc tct
acc atc gag cca ttc ctt ggc gca gca aat atg CTA ttg cca gtc cal gca ggt
gcc gtt ggc gtc ggg gtt ctt gct ctc ATA atc tag
```

**Figura 17.** A sequência de *Pb01pga7* apresenta códons raros para expressão em *E. coli*. A sequência de *Pb01pga7* (disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=paag+02225>) foi submetida à ferramenta *RACC* (*Rare Codon Calculator* - disponível em <http://nihserver.mbi.ucla.edu/RACC/>) para a busca de códons raros para *E. coli*. Diversos códons raros foram identificados na sequência, fato que evidenciou a necessidade da síntese química do gene, com sequência otimizada para a expressão em *E. coli*. Em caixa alta e sublinhados, estão destacados os códons raros identificados na sequência. CCC: códon para prolina. AGG: códon para arginina. ATA: códon para isoleucina. CTA: códon para leucina.

### 5.1.6. Expressão de *Pb01pga7* após obtenção da sequência com códons otimizados

Uma vez confirmada a presença de códons raros na sequência de *Pb01pga7*, fez-se necessária a síntese química do gene, de forma que os códons fossem otimizados para a expressão em *E. coli*, o que foi realizado por uma empresa especializada. Após a obtenção do gene sintético, o qual veio inserido no vetor de expressão pGEX-4T-1, a construção foi utilizada para a transformação de células quimiocompetentes de *E. coli*, da linhagem *pLysS*. Colônias obtidas após a transformação foram submetidas à indução da expressão de *Pb01pga7*, a qual se mostrou efetiva, conforme Figura 18.



**Figura 18. Indução da expressão de *Pb01pga7* a partir de gene sintético inserido no vetor de expressão pGEX-4T-1.** Células quimiocompetentes de *E. coli* da linhagem *pLysS* foram submetidas a transformação por meio de choque térmico, para otimizar o recebimento da construção pGEX-4T-1-*pga7*, na qual *pga7* sofreu otimização de códons para expressão em *E. coli*. Para verificar a efetividade da expressão, colônias isoladas foram submetidas a indução. Inicialmente apenas uma concentração de IPTG (isopropil  $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo - 0,5 mM) foi utilizada, com período de indução de 2h. Ao final do período, as amostras foram coletadas e submetidas a SDS-PAGE 12% (v/v). Foi perceptível o aumento de intensidade de uma proteína de 54,5 kDa (seta), correspondente a Pga7 fusionada a GST. Marcador de peso molecular à esquerda. kDa: Quilo Dalton. T0: tempo zero. Gel corado por azul de *coomassie*.

Para a confirmação do alvo, a proteína de 54,5 kDa referente a *Pb01Pga7* foi excisada de gel obtido após SDS-PAGE e submetida a digestão triptica. Posteriormente, os peptídeos obtidos foram submetidos à cromatografia líquida de alta resolução, em nano escala, acoplada à espectrometria de massas, com aquisição independente de dados, técnica que confirmou que a proteína em questão realmente se tratava de Pga7, conforme Tabela 1.

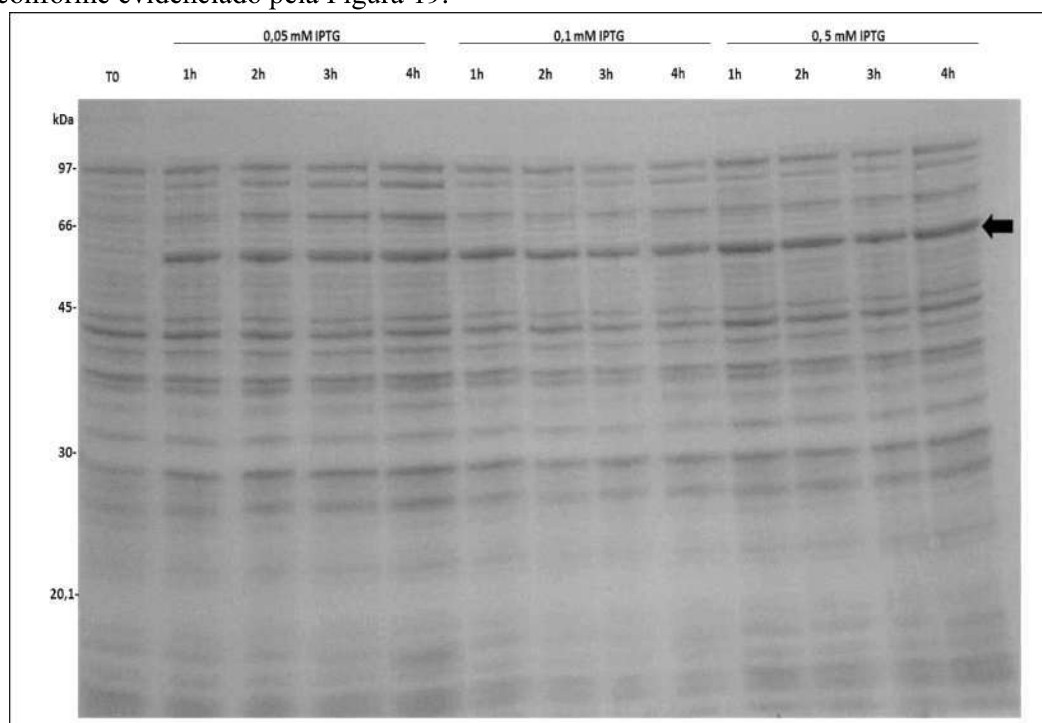
**Tabela 1.** Identificação de *Pb01Pga7* (PAAG\_02225) por nanoUPLC-MS<sup>E</sup>

| Código de acesso <sup>a</sup> | Descrição da Proteína <sup>b</sup> | Score <sup>c</sup> |
|-------------------------------|------------------------------------|--------------------|
| PAAG_02225                    | Proteína hipotética                | 4082,16            |

<sup>a,b</sup>Código de acesso e descrição da sequência, respectivamente, disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>

<sup>c</sup>Score de identificação da proteína por nanoUPLC-MS<sup>E</sup>

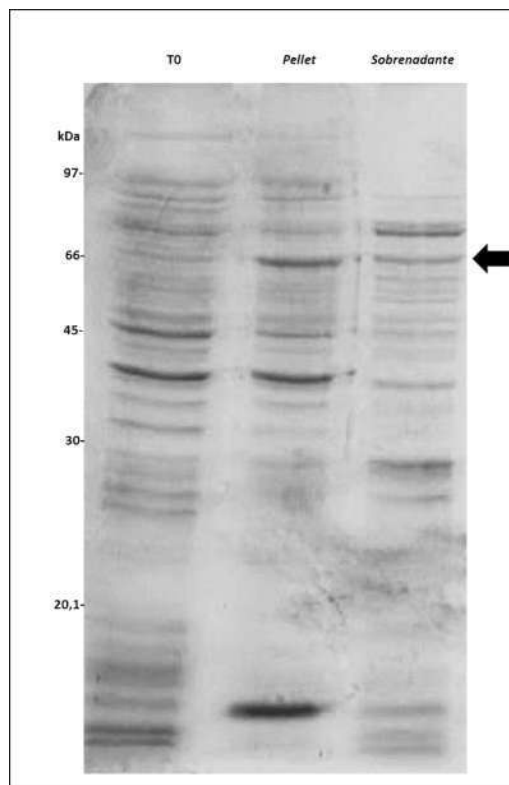
Adicionalmente, visando à padronização da expressão de *Pb01Pga7*, testes com diferentes concentrações de IPTG e tempos de indução foram realizados. Não houve aumento significativo da expressão de *Pb01Pga7* em nenhuma das estratégias testadas, conforme evidenciado pela Figura 19.



**Figura 19.** Testes de padronização da expressão de *Pb01pga7*. Diferentes concentrações de IPTG (0,05; 0,1 e 0,5 mM) e tempos de indução (1, 2, 3 e 4 h) foram testados. A cada ponto em teste, amostras foram coletadas e submetidas a SDS-PAGE 12% (v/v). A indução da expressão de *Pb01pga7* (54,5 kDa - seta) foi eficaz em todas as estratégias, porém, nenhuma em relação as outras se mostrou mais efetiva. Marcador de peso molecular à esquerda. kDa: Quilo Dalton. T0: tempo zero. Gel corado por azul de *coomassie*.

### 5.1.7. Solubilização de *Pb01Pga7*

*Pb01Pga7* foi expressa de forma insolúvel, em corpos de inclusão. Para a solubilização da proteína, uma combinação de tratamentos com lisozima, sonicação e tampão contendo ureia, foi empregada. A estratégia foi efetiva, apesar de a solubilização de *Pb01Pga7* ter ocorrido parcialmente, conforme evidenciado pela Figura 20.



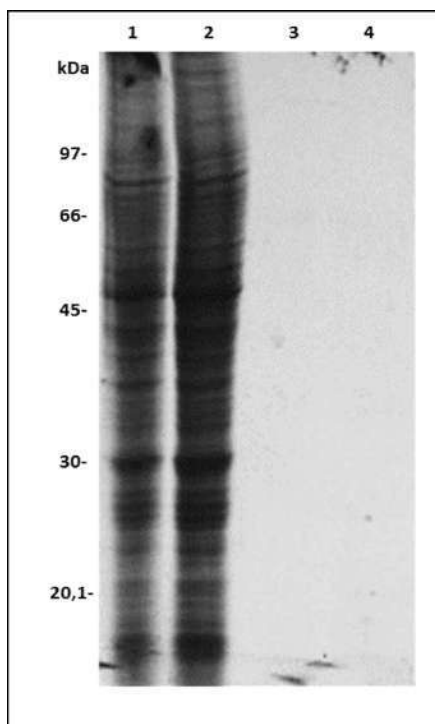
**Figura 20. Solubilização de *Pb01Pga7*.** A proteína recombinante *Pb01Pga7* foi obtida em corpos de inclusão. Para solubilização, os extratos obtidos após indução com 0,5 mM de IPTG (isopropil  $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo) por 2h foram tratados com lisozima, sonicados (10 ciclos de 5 minutos, com descanso de 1 minuto no gelo entre os ciclos) e submetidos a tratamento com tampão de solubilização (Tris 50mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50mM, NaCl 300mM, Uréia 8M, pH 8,0). O sobrenadante foi transferido para membranas com nível de exclusão de 10-kDa (Amicon Ultra centrifugal filter, Millipore, Bedford, MA, USA) e lavado 2 vezes com PBS 1X, para a remoção de ureia. O precipitado residual ao final do processo e o sobrenadante (no qual constam as proteínas solúveis) foram submetidos a SDS-PAGE 12% (v/v). Tempo zero (T0) foi adicionado à análise para facilitar a visualização da indução de *Pb01Pga7*. É perceptível no sobrenadante a presença da proteína *Pb01Pga7* (54,5 kDa – seta), o que demonstra que ocorreu solubilização da proteína, apesar de quantidade substancial ainda se encontrar no sedimento. Marcador de peso molecular à esquerda. kDa: Quilo Dalton. Gel corado por azul de *coomassie*.

## **5.2. Proteoma de parede celular após cultivo de *P. lutzii* na presença de hemoglobina**

Tendo em vista a complexidade do evento de utilização de heme/hemoglobina por *Paracoccidioides* spp., buscou-se, através de abordagens em proteômica, com foco na parede celular do fungo, investigar outras proteínas, além de *PbRbt5* e *PbPga7*, que poderiam estar relacionadas com o processo. Para tanto, *P. lutzii* (*Pb01*) foi cultivado sob privação de Fe por 36h e depois exposto à hemoglobina (tratamento) por 6h ou 48h. O controle consistiu em extratos proteicos obtidos do fungo sob privação de Fe. Uma vez que a associação de proteínas à parede celular acontece por diferentes tipos de interações, a estratégia de extração de proteínas com tratamentos diferenciais foi empregada, conforme descrito nas seções abaixo.

### **5.2.1. Proteoma da fração 1 de parede celular de *P. lutzii* após cultivo na presença de hemoglobina**

A fração 1 (F1) de parede celular foi obtida por tratamento de extratos de parede com detergente e agente redutor, sob fervura, de forma que proteínas ligadas não covalentemente à parede celular ou por pontes dissulfeto foram extraídas. A Figura 21 consiste em análise por SDS-PAGE dos extratos F1 de parede celular obtidos na presença de hemoglobina ou na privação de Fe. Observa-se que nos sobrenadantes, após extensivas lavagens com NaCl (processo antes da obtenção de F1), não há a presença de contaminantes citoplasmáticos, o que valida os extratos.



**Figura 21. Extratos de fração 1 (F1) de parede celular e sobrenadantes pós última lavagem com NaCl 0,17 M.** Após 48h de cultivo de *P. lutzii* (Pb01) em meio contendo hemoglobina (tratado) ou na privação de Fe (controle), extratos de parede celular foram obtidos. A fração F1 (1 – F1 hemoglobina; 2 – F1 privação de Fe) corresponde às proteínas que são retidas à parede celular não covalentemente ou por pontes dissulfeto, extraídas por fervura em tampão contendo agentes redutores e detergentes. Os extratos foram submetidos a SDS-PAGE 12% (v/v). Os sobrenadantes obtidos após a última lavagem com NaCl 0,17 M (3 – hemoglobina; 4 – privação de Fe) também foram submetidos à análise por SDS-PAGE para verificação da persistência ou não da presença de contaminantes citoplasmáticos. Dada a ausência de contaminantes, seguiu-se com os procedimentos. À esquerda, marcador de peso molecular. kDa: Quilo Dalton. Gel corado por azul de *coomassie*.

Em seguida, os extratos passaram por digestão triptica e os peptídeos obtidos foram submetidos a cromatografia líquida de alta resolução, em nano escala, acoplada a espectrometria de massas, com aquisição independente de dados. Após identificação das proteínas, análises de expressão diferencial foram realizadas, uma vez que foram consideradas reguladas positivamente proteínas identificadas apenas no extrato obtido na presença de hemoglobina, ou pelo menos 50% mais abundantes, em relação ao controle (privação de Fe). Foram consideradas proteínas reguladas negativamente aquelas identificadas apenas no extrato controle (obtido sob privação de Fe) ou 50% menos abundantes no extrato obtido na presença de hemoglobina. Constam nas Tabelas 2 e 3 as proteínas identificadas que apresentaram regulação positiva e negativa, respectivamente.

**Tabela 2.** Proteínas reguladas positivamente após tratamento de células leveduriformes de *P. lutzii* com hemoglobina durante 48 horas, identificadas na Fração I (FI) de parede celular, extraídas por tratamento com SDS.

| Código de acesso <sup>a</sup> | Descrição da Proteína <sup>b</sup>                    | Score <sup>c</sup> | log <sub>2</sub> Ratio <sup>d</sup> | p <sup>e</sup> | E.C. <sup>f</sup>     | Sítio para GPI <sup>g</sup> | Secretome P<br>≥ 0,6 <sup>h</sup> | Signal P<br>≥ 0,45 <sup>i</sup> |
|-------------------------------|-------------------------------------------------------|--------------------|-------------------------------------|----------------|-----------------------|-----------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| <b>METABOLISMO E ENERGIA</b>  |                                                       |                    |                                     |                |                       |                             |                                   |                                 |
| PAAG_00468                    | 4-aminobutirato aminotransferase                      | 977,18             | 0,81                                | 1              | 2.6.1.19<br>2.6.1.22  | -                           | 0,601                             | -                               |
| PAAG_02603                    | Aspartato aminotransferase                            | 303,7              | 1,00                                | 1              | 2.6.1.1               | -                           | -                                 | -                               |
| PAAG_08100                    | O-acetilhomoserino (tio)-liase                        | 313,54             | -                                   | -              | 2.5.1.49<br>2.5.1.47  | -                           | -                                 | -                               |
| PAAG_02769                    | Piruvato desidrogenase, componente X                  | 325,52             | -                                   | -              | 2.3.1.168             | -                           | 0,685                             | -                               |
| PAAG_07786                    | Acetil-CoA acetiltransferase                          | 1043,05            | 1,20                                | 1              | 2.3.1.9               | -                           | 0,655                             | -                               |
| PAAG_00731                    | Proteína bifuncional de biossíntese de purina ADE17   | 767,48             | 0,78                                | 1              | 2.1.2.3<br>3.5.4.10   | -                           | -                                 | -                               |
| PAAG_00435                    | (R)-benzilsuccinil-CoA desidrogenase                  | 1048,6             | 0,88                                | 0,99           | 1.3.8.7               | -                           | -                                 | -                               |
| PAAG_00053                    | Malato desidrogenase, NAD-dependente                  | 1037,22            | 0,69                                | 1              | 1.1.1.37              | -                           | 0,651                             | -                               |
| PAAG_00850                    | Glutamina-frutose-6-fosfato transaminase (isomerante) | 1305,78            | 0,72                                | 1              | 2.6.1.16              | -                           | 0,693                             | -                               |
| PAAG_01178                    | 6-fosfogliconato desidrogenase, decarboxilante 1      | 1568,31            | 0,79                                | 1              | 1.1.1.44<br>1.1.1.343 | -                           | -                                 | -                               |
| PAAG_02050                    | Piruvato descarboxilase                               | 1078,36            | 0,95                                | 1              | 4.1.1.1               | -                           | -                                 | -                               |
| PAAG_02718                    | Manose-1-fosfato guaniltransferase                    | 427,47             | 1,00                                | 1              | 2.7.7.13              | -                           | 0,745                             | -                               |
| PAAG_01870                    | 3-oxoacil-(acil)-proteína carreadora) redutase        | 483,22             | 0,95                                | 1              | 1.1.1.100             | -                           | -                                 | -                               |
| PAAG_08859                    | Enzima peroxissomal multifuncional                    | 460,29             | -                                   | -              | 4.2.1.-<br>1.1.1.-    | -                           | -                                 | -                               |
| PAAG_00403                    | Álcool desidrogenase 1                                | 561,95             | 0,85                                | 1              | 1.1.1.1               | -                           | -                                 | -                               |
| PAAG_00417                    | Succinil-CoA ligase, subunidade alfa                  | 1400,33            | 0,85                                | 1              | 6.2.1.4 - 5           | -                           | 0,624                             | -                               |

|                                             |                                                                    |         |      |      |                     |   |       |       |
|---------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|---------|------|------|---------------------|---|-------|-------|
| PAAAG_08075                                 | Citrato sintase, mitocondrial                                      | 730,32  | 1,53 | 1    | 2.3.3.1             | - | -     | -     |
| PAAAG_04820                                 | ATP sintase, subunidade alfa                                       | 1625,23 | 1,04 | 1    | -                   | - | -     | -     |
| PAAAG_05735                                 | NADH-ubiquinona oxidoreductase, subunidade de 49 kDa, mitocondrial | 668,4   | 1,07 | 1    | 1.6.5.3<br>1.6.99.3 | - | 0,675 | -     |
| PAAAG_00953                                 | NADH-citocromo b5 redutase 2                                       | 544,52  | 0,69 | 1    | 1.6.2.2             | - | -     | -     |
| PAAAG_04570                                 | ATP sintase, subunidade D                                          | 2347,38 | 0,62 | 0,91 | -                   | - | -     | -     |
| PAAAG_04838                                 | ATP sintase, subunidade 4                                          | 663,41  | 0,59 | 1    | -                   | - | 0,781 | -     |
| PAAAG_00173                                 | Flavoproteína transferidora de elétrons, subunidade alfa           | 465,54  | 0,84 | 1    | -                   | - | 0,642 | -     |
| PAAAG_08088                                 | Complexo citocromo b-c1, subunidade 2                              | 603,44  | 0,62 | 1    | -                   | - | -     | -     |
| PAAAG_02265                                 | ATP sintase, subunidade F1F0                                       | 1738,99 | 1,00 | 1    | -                   | - | -     | -     |
| <b>CICLO CELULAR E PROCESSAMENTO DE DNA</b> |                                                                    |         |      |      |                     |   |       |       |
| PAAAG_04458                                 | Probitina-1                                                        | 1883,86 | 0,69 | 1    | -                   | - | 0,639 | -     |
| PAAAG_03031                                 | Tubulina cadeia beta                                               | 1417,76 | 0,71 | 1    | -                   | - | -     | -     |
| PAAAG_03532                                 | Actina                                                             | 3976,51 | 0,76 | 1    | -                   | - | -     | -     |
| PAAAG_00773                                 | Proteína epsilon da família 14-3-3                                 | 2559,59 | 0,81 | 1    | -                   | - | -     | -     |
| <b>TRANSCRIÇÃO</b>                          |                                                                    |         |      |      |                     |   |       |       |
| PAAAG_06891                                 | Regulador pós-transcricional de ligação a mRNA (Csx1)              | 1068,94 | 1,15 | 1    | -                   | - | -     | -     |
| PAAAG_00126                                 | Histona H4.2                                                       | 4337    | 0,69 | 1    | -                   | - | 0,733 | 0,792 |
| PAAAG_07098                                 | Histona H4.1                                                       | 4254,35 | 0,69 | 1    | -                   | - | -     | -     |
| PAAAG_04511                                 | RNA helicase SUB2 ATP-dependente                                   | 2259,06 | 0,68 | 1    | 3.6.4.13            | - | 0,722 | -     |
| PAAAG_00689                                 | RNA helicase eIF4A ATP-dependente                                  | 3109,03 | 0,89 | 1    | -                   | - | -     | -     |
| PAAAG_07957                                 | Proteína hipotética                                                | 539,87  | 1,43 | 1    | -                   | - | 0,801 | -     |



| <b>SÍNTESE PROTÉICA</b>                                                     |                                              |         |      |      |          |   |   |       |       |
|-----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|---------|------|------|----------|---|---|-------|-------|
| PAAAG_00969                                                                 | Proteína ribossomal 60S L15                  | 4374,08 | 0,68 | 1    | -        | - | - | -     | -     |
| PAAAG_02111                                                                 | Proteína ribossomal 40S S0                   | 3130,28 | 0,63 | 0,99 | -        | - | - | -     | -     |
| PAAAG_00430                                                                 | Proteína ribossomal 60S L2                   | 360,05  | 0,63 | 1    | -        | - | - | 0,853 | -     |
| PAAAG_00724                                                                 | Proteína ribossomal 60S L11                  | 2233,06 | 0,59 | 1    | -        | - | - | -     | -     |
| PAAAG_00952                                                                 | Proteína ribossomal 60S L20                  | 1022,61 | 0,74 | 1    | -        | - | - | 0,712 | -     |
| PAAAG_01050                                                                 | Proteína ribossomal 60S L30                  | 3630,44 | 0,74 | 1    | -        | - | - | -     | -     |
| PAAAG_02634                                                                 | Proteína ribossomal 40S S6-A                 | 3851,93 | 0,72 | 1    | -        | - | - | -     | -     |
| PAAAG_03322                                                                 | Proteína ribossomal 40S S20                  | 1303,5  | 0,71 | 0,99 | -        | - | - | 0,750 | -     |
| PAAAG_06367                                                                 | Proteína ribossomal 40S S11                  | 3734,91 | 0,75 | 1    | -        | - | - | -     | -     |
| PAAAG_08955                                                                 | Proteína ribossomal 40S S1                   | 672,16  | 0,69 | 0,99 | -        | - | - | 0,720 | -     |
| PAAAG_01413                                                                 | Proteína ribossomal 40S S17                  | 1850,07 | 0,94 | 1    | -        | - | - | 0,738 | -     |
| PAAAG_07847                                                                 | Proteína ribossomal 40S S26E                 | 409,63  | 1,31 | 1    | -        | - | - | 0,613 | -     |
| PAAAG_08634                                                                 | Proteína ribossomal 40S S12                  | 1542,52 | -    | -    | -        | - | - | -     | -     |
| PAAAG_09043                                                                 | Proteína ribossomal 40S S2                   | 981,96  | -    | -    | -        | - | - | -     | -     |
| PAAAG_02921                                                                 | Fator de elongação da tradução Tu            | 990     | 0,76 | 1    | -        | - | - | 0,773 | -     |
| PAAAG_00594                                                                 | Fator de elongação 2                         | 3787,43 | 0,59 | 1    | -        | - | - | -     | -     |
| PAAAG_11418                                                                 | Fator de elongação 1-alfa                    | 14708,7 | 0,84 | 1    | -        | - | - | -     | -     |
| PAAAG_03556                                                                 | Fator de elongação 1 – gama 1                | 998,86  | 0,82 | 1    | -        | - | - | -     | -     |
| PAAAG_05117                                                                 | Aspartato-tRNA(Asn) ligase                   | 565,06  | 1,04 | 0,97 | 6.1.1.12 | - | - | 0,609 | -     |
| <b>ENDEREÇAMENTO DE PROTEÍNAS (DOBRAMENTO, MODIFICAÇÃO E ENDEREÇAMENTO)</b> |                                              |         |      |      |          |   |   |       |       |
| PAAAG_00739                                                                 | Peptidil-prolil cis-trans isomerase B        | 583,67  | 0,72 | 1    | 5.2.1.8  | - | - | 0,667 | 0,641 |
| PAAAG_05679                                                                 | Proteína hsp90- <i>like</i>                  | 8089,46 | 0,75 | 1    | -        | - | - | -     | -     |
| PAAAG_00986                                                                 | Proteína com domínio de dissulfeto-isomerase | 585,2   | 0,92 | 1    | 5.3.4.1  | - | - | -     | 0,772 |
| PAAAG_11504                                                                 | Proteína com domínio de dissulfeto-isomerase | 364,45  | -    | -    | 5.3.4.1  | - | - | 0,783 | -     |

|                                                                                              |                                               |         |      |      |          |   |       |       |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|---------|------|------|----------|---|-------|-------|
| PAAAG_03334                                                                                  | Peptidil-prolil cis-trans isomerase D         | 4124,6  | 1,00 | 1    | 5.2.1.8  | - | -     | -     |
| PAAAG_07775                                                                                  | Proteína hsp75-like                           | 472,93  | 1,20 | 1    | -        | - | -     | -     |
| PAAAG_00797                                                                                  | Chaperona DnaJ                                | 1577,87 | 0,91 | 1    | -        | - | -     | -     |
| PAAAG_04901                                                                                  | Enzima de conjugação de ubiquitina            | 555,94  | 0,84 | 0,96 | 2.3.2.23 | - | 0,883 | -     |
| PAAAG_02130                                                                                  | Proteína hsp98-like                           | 572,8   | 0,95 | 1    | -        | - | -     | -     |
| <b>PROTEÍNAS COM FUNÇÃO DE LIGAÇÃO OU REQUERIMENTO (ESTRUTURAL OU CATALÍTICO) DE COFATOR</b> |                                               |         |      |      |          |   |       |       |
| PAAAG_05518                                                                                  | Proteína de controle de divisão celular<br>48 | 295,85  | 0,71 | 0,99 | -        | - | -     | -     |
| PAAAG_08093                                                                                  | Proteína ypt3 de ligação a GTP                | 690,33  | 2,47 | 1    | -        | - | -     | -     |
| PAAAG_01321                                                                                  | Oxidoreductase 2-nitropropano<br>dioxigenase  | 2254,85 | 0,94 | 1    | -        | - | 0,707 | -     |
| <b>TRANSPORTE CELULAR</b>                                                                    |                                               |         |      |      |          |   |       |       |
| PAAAG_08620                                                                                  | Proteína carreadora de ADP, ATP               | 7031,92 | 0,71 | 1    | -        | - | -     | -     |
| PAAAG_08082                                                                                  | ATPase de membrana plasmática                 | 738,85  | 2,03 | 1    | 3.6.3.6  | - | 0,712 | -     |
| PAAAG_00481                                                                                  | Proteína de biogênese de membrana<br>Yop1     | 922,27  | 0,89 | 1    | -        | - | 0,902 | -     |
| PAAAG_03900                                                                                  | Proteína YPT52 de ligação a GTP               | 440,29  | 1,04 | 1    | -        | - | -     | -     |
| PAAAG_06751                                                                                  | Proteína de controle de danos de DNA<br>rad24 | 1203,79 | 1,13 | 1    | -        | - | -     | -     |
| <b>RESGATE CELULAR, DEFESA E VIRULÊNCIA</b>                                                  |                                               |         |      |      |          |   |       |       |
| PAAAG_01262                                                                                  | Chaperona DnaK                                | 2982,31 | 0,65 | 1    | -        | - | 0,659 | 0,864 |
| PAAAG_08003                                                                                  | Proteína hsp72-like                           | 4380,15 | 0,79 | 1    | -        | - | -     | -     |
| PAAAG_06811                                                                                  | Proteína de choque térmico STI1               | 379,39  | -    | -    | -        | - | -     | -     |
| PAAAG_03292                                                                                  | Citocromo c peroxidase, mitocondrial          | 3045,38 | 0,68 | 1    | 1.11.1.5 | - | 0,809 | -     |
| PAAAG_01454                                                                                  | Catalase                                      | 2765,81 | 0,94 | 0,98 | 1.11.1.6 | - | -     | -     |
| PAAAG_00871                                                                                  | Proteína de choque térmico de 30 kDa          | 754,8   | 0,91 | 1    | -        | - | 0,786 | -     |
| PAAAG_12076                                                                                  | NAD(P)H:quinona oxidoreductase, type<br>IV    | 1770,29 | 0,63 | 1    | 1.6.5.2  | - | 0,757 | 0,718 |

|               |                                                               |         |      |   |         |   |       |   |
|---------------|---------------------------------------------------------------|---------|------|---|---------|---|-------|---|
| PAAG_01861    | Componente 1 do receptor de progesterona associado à membrana | 443,04  | 0,95 | 1 | -       | - | 0,735 | - |
| PAAG_05249    | Aldeído desidrogenase                                         | 1357,12 | 1,05 | 1 | 1.2.1.3 | - | -     | - |
| <b>OUTROS</b> |                                                               |         |      |   |         |   |       |   |
| PAAG_12424    | Proteína de canal de ânion dependente de voltagem             | 2827,74 | 0,62 | 1 | -       | - | 0,761 | - |
| PAAG_03701    | Proteína com domínio BAR                                      | 844,75  | 1,01 | 1 | -       | - | 0,614 | - |
| PAAG_12425    | Proteína de membrana externa mitocondrial, porina             | 1423,33 | -    | - | -       | - | -     | - |

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

<sup>b</sup>Descrição da proteína no banco de dados de *Paracoccidioides* spp. disponível em <https://www.broadinstitute.org/fungal-genome-initiative/paracoccidioides-genome-project>.

<sup>c</sup>Score de identificação da proteína.

<sup>d</sup>log<sub>2</sub> 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.

<sup>e</sup>Valores  $\geq 0,95$  indicam proteínas reguladas positivamente; (-) indica que a proteína foi identificada apenas na presença de hemoglobina, portanto, regulada positivamente.

<sup>f</sup>Nomenclatura de enzimas, disponível em <http://www.genome.jp/kegg/>.

<sup>g</sup>Predição 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](http://mendel.imp.ac.at/gpi/fungi_server.html).

<sup>h</sup>Predição 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/>.

<sup>i</sup>Predição 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 3.** Proteínas reguladas negativamente após tratamento de células leveduriformes de *P. lutzii* com hemoglobina durante 48 horas, identificadas na Fração I (FI) de parede celular, extraídas por tratamento com SDS.

| Código de acesso <sup>a</sup>                                                                | Descrição da Proteína <sup>b</sup>        | Score <sup>c</sup> | log <sub>2</sub> Ratio <sup>d</sup> | p <sup>e</sup> | E.C. <sup>f</sup> | Sítio para GPI <sup>g</sup> | Secretome P ≥ 0,6 <sup>h</sup> | Signal P ≥ 0,45 <sup>i</sup> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------|-------------------------------------|----------------|-------------------|-----------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| <b>METABOLISMO E ENERGIA</b>                                                                 |                                           |                    |                                     |                |                   |                             |                                |                              |
| PAAG_01002                                                                                   | Glutamato desidrogenase NAD-específica    | 392,51             | -                                   | -              | 1.4.1.2           | -                           | -                              | -                            |
| PAAG_07114                                                                                   | Argininosuccinato sintase                 | 376,44             | -                                   | -              | 6.3.4.5           | -                           | -                              | -                            |
| PAAG_06506                                                                                   | Aspartato aminotransferase                | 462,01             | -                                   | -              | 2.6.1.1           | -                           | 0,623                          | -                            |
| PAAG_06380                                                                                   | Piruvato quinase                          | 282,07             | -                                   | -              | 2.7.1.40          | -                           | -                              | -                            |
| PAAG_04550                                                                                   | 2-metilcitrate sintase, mitocondrial      | 485,64             | -                                   | -              | 2.3.3.1           | -                           | -                              | -                            |
| PAAG_03689                                                                                   | 3-cetoacil-CoA tiolase B                  | 285,63             | -                                   | -              | -                 | -                           | 0,621                          | -                            |
| PAAG_06329                                                                                   | 3-hidroxiubutiril-CoA desidrogenase       | 282,54             | -                                   | -              | 1.1.1.157         | -                           | -                              | -                            |
| PAAG_02557                                                                                   | Proteína contendo domínio CRAL/TRIO       | 323,17             | -                                   | -              | -                 | -                           | -                              | -                            |
| PAAG_02859                                                                                   | Adenosilhomocisteinase                    | 304,77             | -                                   | -              | 3.3.1.1           | -                           | -                              | -                            |
| PAAG_05576                                                                                   | ATP sintase F1, subunidade gama           | 1629,76            | -                                   | -              | -                 | -                           | 0,632                          | -                            |
| <b>TRANSCRIÇÃO</b>                                                                           |                                           |                    |                                     |                |                   |                             |                                |                              |
| PAAG_05851                                                                                   | Cisteína desulfurase IscS                 | 544,77             | -                                   | -              | 2.8.1.7           | -                           | 0,745                          | -                            |
| PAAG_06917                                                                                   | Proteína de ligação ao RNA com domínio KH | 339,41             | -                                   | -              | -                 | -                           | -                              | -                            |
| <b>SÍNTESE PROTEÍCA</b>                                                                      |                                           |                    |                                     |                |                   |                             |                                |                              |
| PAAG_02289                                                                                   | Proteína ribossomal S12                   | 1128,53            | -                                   | -              | -                 | -                           | 0,884                          | -                            |
| PAAG_03828                                                                                   | Proteína ribossomal 40S S9                | 2378,94            | -                                   | -              | -                 | -                           | 0,643                          | -                            |
| PAAG_12568                                                                                   | Proteína ribossomal L19                   | 347,39             | -                                   | -              | -                 | -                           | -                              | -                            |
| PAAG_07385                                                                                   | Proteína ribossomal 60S L25               | 656,44             | -                                   | -              | -                 | -                           | 0,688                          | -                            |
| <b>PROTEÍNAS COM FUNÇÃO DE LIGAÇÃO OU REQUERIMENTO (ESTRUTURAL OU CATALÍTICO) DE COFATOR</b> |                                           |                    |                                     |                |                   |                             |                                |                              |
| PAAG_01602                                                                                   | Proteína ras-like de ligação a GTP        | 327,09             | -                                   | -              | -                 | -                           | 0,648                          | -                            |
| PAAG_02820                                                                                   | Proteína YchF de ligação a GTP            | 668,09             | -                                   | -              | -                 | -                           | -                              | -                            |

|                                      |                                        |        |   |   |   |       |
|--------------------------------------|----------------------------------------|--------|---|---|---|-------|
| <b>TRANSPORTE CELULAR</b>            |                                        |        |   |   |   |       |
| PAAG_03452                           | Carreadora de carnitina/acil-carnitina | 358,13 | - | - | - | 0,794 |
| <b>DIFERENCIAÇÃO DE TIPO CELULAR</b> |                                        |        |   |   |   |       |
| PAAG_07958                           | Fimbrina                               | 294,05 | - | - | - | -     |
| <b>OUTROS</b>                        |                                        |        |   |   |   |       |
| PAAG_01111                           | Subunidade de complexo MICOS           | 486,05 | - | - | - | 0,651 |
| PAAG_01381                           | Proteína hipotética                    | 336,09 | - | - | - | 0,857 |
| PAAG_02600                           | Proteína hipotética                    | 830,3  | - | - | - | 0,665 |
| PAAG_08279                           | Proteína hipotética                    | 470,61 | - | - | - | -     |
| PAAG_11364                           | Proteína hipotética                    | 237,95 | - | - | - | -     |

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

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

<sup>c</sup>Score de identificação da proteína.

<sup>d</sup>log<sub>2</sub> 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  $\leq -0,58$  indicam proteínas reguladas negativamente; (-) indica que a proteína foi identificada apenas na privação de Fe, portanto, regulada negativamente.

<sup>e</sup>Valores  $\leq 0,05$  indicam proteínas reguladas negativamente; (-) indica que a proteína foi identificada apenas na privação de Fe, portanto, regulada negativamente.

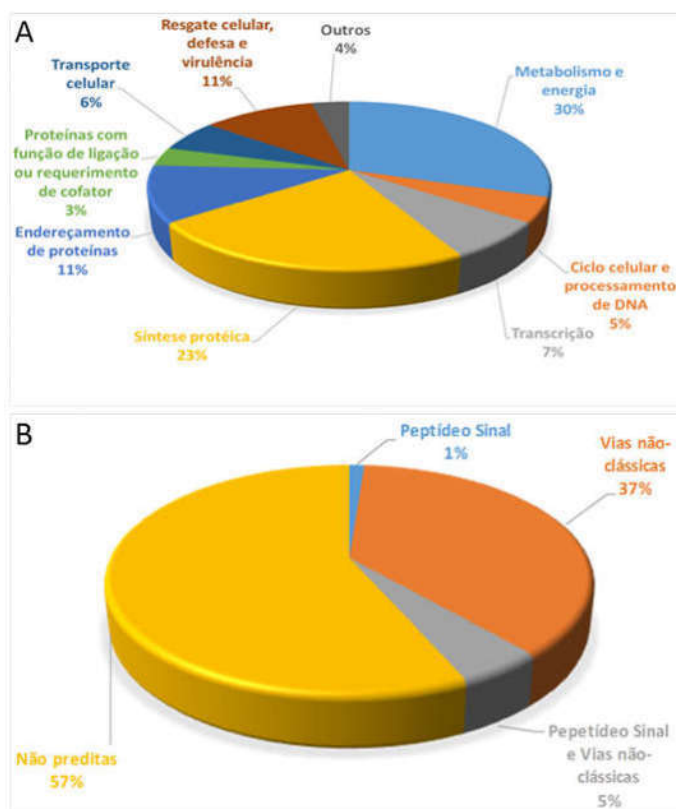
<sup>f</sup>Nomenclatura de enzimas, disponível em <http://www.genome.jp/kegg/>.

<sup>g</sup>Predição 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](http://mendel.imp.ac.at/gpi/fungi_server.html).

<sup>h</sup>Predição 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/>.

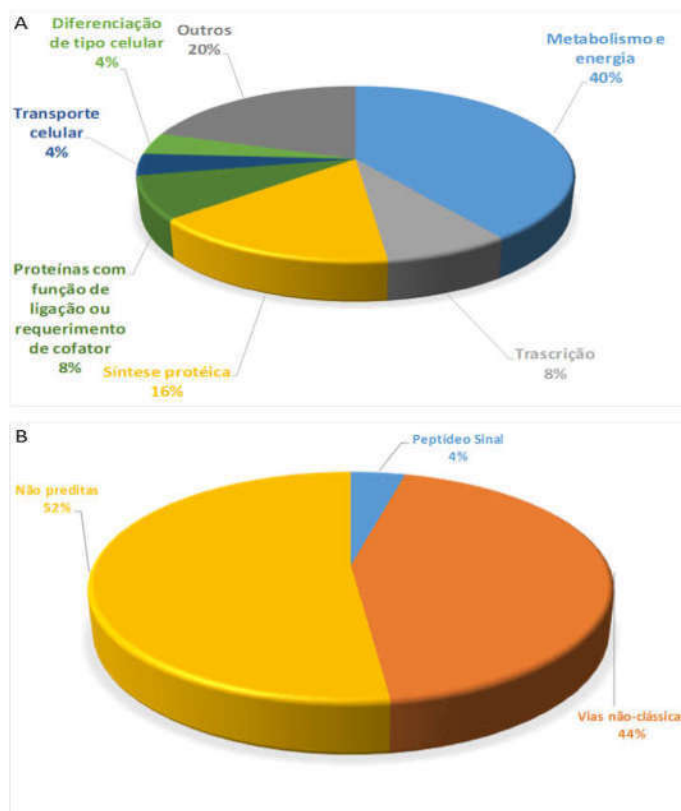
<sup>i</sup>Predição de peptídeo sinal, cujo score deve ser igual ou maior que 0,45; predição realizada pela ferramenta SignalP 4.1 Server disponível em <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>.

Entre as 83 proteínas induzidas na F1 durante tratamento de células leveduriformes com hemoglobina, incluem-se aquelas relacionadas a metabolismo celular, síntese proteica, defesa e virulência. Verifica-se que metabolismo celular é a categoria funcional com maior regulação na fração F1 de células leveduriformes, quando na presença de hemoglobina, conforme Figura 22 A. Como observado na Tabela 2, várias proteínas induzidas na presença de hemoglobina, obtidas na fração F1 das células leveduriformes de *P. lutzii*, apresentam possível localização na superfície, conforme predição feita através das ferramentas *Secretome P* e *Signal P*, como apresentado na Figura 22 B.



**Figura 22. Categorias funcionais e predição de secreção de proteínas reguladas positivamente na presença de hemoglobina, identificadas na F1 de parede celular. A.** Classificações funcionais atribuídas às proteínas reguladas positivamente identificadas na F1 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 F1 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.

Entre as 25 proteínas reguladas negativamente na F1 durante tratamento de células leveduriformes com hemoglobina, incluem-se aquelas relacionadas ao metabolismo celular e síntese protéica, dentre outros. A Figura 23 A apresenta o gráfico das classificações funcionais atribuídas às proteínas reguladas negativamente identificadas na F1 de parede celular. Relevante percentual (48%) de proteínas reprimidas na presença de hemoglobina, localizadas na fração F1 das células leveduriformes de *P. lutzii*, também apresentam possível localização na superfície, conforme apresentado na Figura 23 B.



**Figura 23. Categorias funcionais e predição de secreção de proteínas reguladas negativamente na presença de hemoglobina, identificadas na F1 de parede celular. A.** Classificações funcionais atribuídas às proteínas reguladas negativamente identificadas na F1 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 F1 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.