



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

**ANDRÉ LUÍS ELIAS MOREIRA**

---

**Identificação por imunoproteômica dos exoantígenos do complexo  
*Paracoccidioides*, com potencial aplicação no diagnóstico e terapia  
da Paracoccidioidomicose**

---

**Goiânia  
2019**

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

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

**1. Identificação do material bibliográfico:**     Dissertação     Tese

**2. Identificação da Tese ou Dissertação:**

**Nome completo do autor:** André Luís Elias Moreira

**Título do trabalho:** Identificação por imunoproteômica dos exoantígenos do complexo *Paracoccidioides*, com potencial aplicação no diagnóstico e terapia da Paracoccidioidomicose.

**3. Informações de acesso ao documento:**

Concorda com a liberação total do documento  SIM     NÃO<sup>1</sup>

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

  
Assinatura do autor<sup>2</sup>

Ciente e de acordo.

  
Assinatura do orientador<sup>2</sup>

Dr. Alexandre Melo Bastião  
Professor - UFG

Data: 27 / 01 / 2020

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

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

<sup>2</sup> A assinatura deve ser escaneada.

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

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

**1. Identificação do material bibliográfico:**       Dissertação       Tese

### 2. Identificação da Tese ou Dissertação

Nome completo do autor: André Luís Elias Moreira

Título do trabalho: Identificação por imunoproteômica dos exoantígenos do complexo *Paracoccidoides*, com potencial aplicação no diagnóstico e terapia da Paracoccidiodomicose.

### 3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento  SIM       NÃO<sup>1</sup>

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

*André Luís Elias Moreira*

Data: 30 / 01 / 2023

Assinatura do (a) autor (a) <sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>A assinatura deve ser escaneada.

**ANDRÉ LUÍS ELIAS MOREIRA**

---

**Identificação por imunoproteômica dos exoantígenos do complexo  
*Paracoccidioides*, com potencial aplicação no diagnóstico e terapia  
da Paracoccidioidomicose**

---

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

Orientador: Dr. Alexandre Melo Bailão

**Goiânia  
2019**

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

Moreira, André Luís Elias

Identificação por imunoproteômica dos exoantígenos do complexo Paracoccidioides, com potencial aplicação no diagnóstico e terapia da Paracoccidioidomicose [manuscrito] / André Luís Elias Moreira. - 2019. XIV, 72 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Melo Bailão.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, Goiânia, 2019.

Bibliografia. Anexos.

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

1. Paracoccidioides spp. 2. Antígenos secretados. 3. Epitopos. 4. Diagnóstico. 5. Espectrometria de Massas. I. Bailão, Alexandre Melo, orient. II. Título.

CDU 616-093



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA  
Rua 235, s/n – Setor Universitário - Goiânia/GO – CEP: 74.605-050  
Fones: (62) 3209.6362 - 3209.6102 – Fax: (62) 3209.6363 - e-mail : ppgmtsp.ufg@gmail.com

**ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE ANDRÉ LUÍS ELIAS MOREIRA** - Aos vinte e seis dias do mês de agosto do ano de 2019 (26/08/2019), às 14h00min, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. ALEXANDRE MELO BAILÃO, CLAYTON LUIZ BORGES, BENEDITO RODRIGUES DA SILVA NETO, THIAGO LOPES ROCHA e MILTON ADRIANO PELLI DE OLIVEIRA para, sob a presidência do primeiro, e em sessão pública realizada no INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, procederem à avaliação da defesa de tese intitulada: **“Identificação de exoantígenos do complexo *Paracoccidioides*, com potencial aplicação no diagnóstico da Paracoccidioidomicose”** em nível de **DOUTORADO**, área de concentração em: **CIÊNCIAS BÁSICAS E APLICADAS EM DOENÇAS INFECTO-PARASITÁRIAS E SAÚDE PÚBLICA: MICROBIOLOGIA**, de autoria de **ANDRÉ LUÍS ELIAS MOREIRA** discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo Orientador Prof. Dr. Alexandre Melo Bailão, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou o Candidato sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida ao autor da tese que, em 30 minutos, procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu o Candidato, tendo-se adotado o sistema de diálogo seqüencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução n°. 1481/2017 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública a Banca, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando o candidato **Aprovado** ou **Reprovado**:

**Banca Examinadora**

Prof. Dr. Alexandre Melo Bailão

Prof. Dr. Clayton Luiz Borges

Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto

Prof. Dr. Thiago Lopes Rocha

Prof. Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira

**Aprovado / Reprovado**

Aprovado

Aprovado

APROVADO

Aprovado

APROVADO

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidato habilitado (**Habilitado ou não Habilitado**), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **DOUTOR EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**, na área de concentração em **CIÊNCIAS BÁSICAS E APLICADAS EM DOENÇAS INFECTO-PARASITÁRIAS E SAÚDE PÚBLICA: MICROBIOLOGIA**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 18 h 30 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de tese e para constar eu, MURILO ALVES GUEDES, secretário do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim em duas vias de igual teor.

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

Identificação por imunoproteômica dos exoantígenos do complexo *Paracoccidioides*, com potencial aplicação no diagnóstico e terapia da Paracoccidioidomicose

Prof. Dr. Alexandre Melo Bailão (ICB/UFG): [Assinatura]

Prof. Dr. Clayton Luiz Borges (ICB/UFG): [Assinatura]

Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto (IPTSP/UFG): [Assinatura]

Prof. Dr. Thiago Lopes Rocha (IPTSP/UFG): Thiago Lopes Rocha

Prof. Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira (IPTSP/UFG): [Assinatura]

Secretário da Pós-Graduação: Murilo Alves Guedes

*Dedico esse trabalho à Deus, por tudo o que Ele fez por mim. Também dedico esse à minha família, em especial à minha esposa que acreditou em mim em todos os momentos, mesmo sabendo dos meus defeitos e dificuldades, escolheu estar ao meu lado acreditando em mim a todo momento. Obrigado Pollyana Guimarães.*

*“O desenvolvimento humano depende fundamentalmente da invenção. Ela é o produto mais importante de seu cérebro criativo. Seu objetivo final é o completo domínio da mente sobre o mundo material e o aproveitamento das forças da natureza em favor das necessidades humanas”. Nikola Tesla*

## **AGRADECIMENTOS**

---

---

À minha família por acreditar em mim e me apoiar nas minhas decisões e principalmente aos meus pais, por me darem a maior atenção do mundo e por sempre me apoiarem com os meus estudos e em minha “empreitada”. Muito obrigado Pai e Mãe por me darem a vida e por fazer ela mais feliz a cada dia que passa. Amo vocês! Agradeço a minha esposa Pollyana Guimarães pelo companheirismo, amor, carinho e por ficar sempre ao meu lado nos momentos difíceis.

Obrigado ao Prof. Dr. Clayton Luiz Borges e Prof. Dr. Alexandre Melo Bailão pelas orientações e por terem depositado a confiança de executar este trabalho, mesmo sabendo das minhas dificuldades.

Obrigado Prof<sup>a</sup> Célia Maria De Almeida Soares, por possibilitar um ambiente de trabalho favorável ao desenvolvimento da pesquisa e fornecer utensílios para o andamento do laboratório.

Obrigado aos meus grandes amigos: Aparecido, Laura, Luiz Paulo, Leandro do Prado, Gabriel, Zairo, Zezinho e Igor. Vocês foram muito importantes na minha vida, mesmo sabendo dos meus problemas pessoais, decidiram me ajudar. Agradeço também aos amigos: Alexandre, Andreia, Guilherme, Guilherme Petito, Lucas Nojosa, Marcela, Juliana de Curcio, Lívia, Marielle, Raissa, Thaynara, Gabriele e Lucas Weba. Agradeço aos demais estudantes e professores do laboratório de biologia molecular (LBM) - José Salum que conheci durante esse período de estadia no laboratório.

Agradeço à coordenadora Dr<sup>a</sup> Regina Bringel e a vice coordenadora Mara Rúbia Nunes Celes pela compreensão e pelas ajudas fornecidas. Vocês são incríveis!

Agradeço à CAPES pela bolsa de estudo, pois sem ela seria tudo mais difícil. Agradeço, principalmente, ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás pela oportunidade de formação profissional.

Agradeço a **Deus** por ser quem sou e por todas as conquistas na vida.  
Obrigado **Pai!**

## SUMÁRIO

---

|   |      |
|---|------|
| AGRADECIMENTOS .....  | vii  |
| SUMÁRIO .....   | ix   |
| QUADROS, TABELAS, FIGURAS E ANEXOS .....                                      | x    |
| SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS .....   | xi   |
| RESUMO .....  | xiii |
| ABSTRACT .....  | xiv  |
| 1 INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA .....                                    | 15   |
| 1.1 Os fungos do complexo <i>Paracoccidioides</i> spp. ....                   | 15   |
| 1.2 Taxonomia de <i>Paracoccidioides</i> spp. ....                            | 17   |
| 1.3 Paracoccidioidomicose .....   | 19   |
| 1.4 Aspectos epidemiológicos da PCM .....                                     | 23   |
| 1.5 Antígenos de <i>Paracoccidioides</i> spp. ....                            | 26   |
| 1.6 A imunoproteômica .....   | 33   |
| 1.7 A imunoproteômica empregada para identificação de antígenos fúngicos .... | 35   |
| 1.8 Bioinformática .....  | 38   |
| 2 JUSTIFICATIVA .....   | 41   |
| 3 OBJETIVOS .....   | 42   |
| 3.1 Objetivo geral .....  | 42   |
| 3.2 Objetivos específicos .....   | 42   |
| 4 RESULTADOS .....  | 43   |
| 5 DISCUSSÃO .....   | 61   |
| 6 CONCLUSÕES .....  | 67   |
| 7 RECOMENDAÇÕES .....   | 68   |
| REFERÊNCIAS .....   | 69   |
| ANEXOS .....  | 82   |
| Parecer do Comitê de Ética; Submissão de Artigos; Prêmio; Colaborações .....  | 82   |

## QUADROS, TABELAS, FIGURAS E ANEXOS

---

---

|   | <b>Pag.</b> |
|---|-------------|
| <b>Figura 1</b> Aspectos morfológicos de <i>Paracoccidioides</i> spp.....                         | 16          |
| <b>Figura 2</b> Distribuição geográfica e divisões dos clados de <i>Paracoccidioides</i> spp..... | 18          |
| <b>Figura 3</b> Áreas endêmicas de Paracoccidioidomicose na América Latina.....                   | 24          |
| <b>Tabela 1</b> Antígenos de <i>Paracoccidioides</i> spp., já descrita na literatura.....         | 27          |
| <b>Anexos</b> Comitê de ética, submissões de artigos, prêmios e colaborações .....                | 82          |

## SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

---

**µg:** microgramas

**1D SDS-PAGE:** Eletroforese em Gel de Poliacrilamidagel (Dodecil Sulfato de Sódio)

**2-DE:** Eletroforese bidimensional

**AIDS:** Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

**BHI:** Infusão de Cérebro e Coração

**C-:** Controle negativo

**DNA:** Ácido dextroribonucleico

**ELISA:** Ensaio de imunoabsorção enzimática

**HLA:** Antígeno leucocitário humano

**HSP:** Proteínas de choque térmico

**IgG:** Imunoglobulina G

**IL:** Interleucina

**IFN:** Interferon

**kDa:** Quilodaltons

**LC-MS/MS:** Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (sequencial)

**L:** Litro

**mg:** Miligrama

**ml:** Mililitro

**nanoUPLC-MS<sup>E</sup>:** Cromatografia Líquida de Ultra Performance, em nano escala, acoplada a Espectrometria de Massas

**°C:** graus Celsius

**PBS:** Tampão Fosfato Salino

**PCM:** Paracoccidiodomicose

**PCR:** Reação em Cadeia da Polimerase

**pg:** picograma

**pH:** Potencial hidrogeniônico

**pI:** Ponto isoeletrico

**Pl / Pa / Pb / Pr:** *P. lutzii* / *P. americana* / *P. brasiliensis* / *P. restrepiensis*

**RNA:** Ácido ribonucleico

**S1; PS2; PS3; PS4:** Espécies Filogenéticas

**µg:** Micrograma

## RESUMO

---

### **Identificação por imunoproteômica dos exoantígenos do complexo *Paracoccidioides*, com potencial aplicação no diagnóstico e terapia da Paracoccidioidomicose**

Os fungos do complexo *Paracoccidioides* são os agentes etiológicos da Paracoccidioidomicose (PCM), uma micose sistêmica restrita aos países da América Latina. Atualmente, o gênero *Paracoccidioides* é representado por *P. lutzii*, *P. americana*, *P. brasiliensis*, *P. restrepiensis* e *P. venezuelensis*. Em alguns casos, lesões nas mucosas orais e cutâneas ocasionadas por outros patógenos podem coincidir muitas vezes com as lesões provocadas por *Paracoccidioides* spp.. Além disso, mesmo com os avanços das técnicas imunológicas utilizadas para o diagnóstico de doenças fúngicas, ainda são demonstradas taxas de resultados falso-positivos para a PCM. Com isso, investigamos quais são os antígenos secretados por 4 espécies do complexo *Paracoccidioides*, a fim de identificar e caracterizar novas moléculas, aumentando assim o espectro de antígenos a serem utilizados para futuros testes diagnósticos da PCM. Através de nanoUPLC-MS<sup>E</sup>, 79 exoantígenos foram identificados em 4 espécies de *Paracoccidioides*. Análises *in silico* revelaram 2 exoantígenos exclusivos para a espécie *P. lutzii*, bem como permitiu a identificação de 44 epítomos de células B exclusivos do complexo *Paracoccidioides*. Também foram preditos 13 epítomos exclusivos distribuídos entre espécie de *Paracoccidioides*, sendo estas, excelentes moléculas a serem empregadas em futuros estudos epidemiológicos. Esses resultados demonstram uma gama de epítomos exclusivos para o complexo *Paracoccidioides*, bem como a identificação de moléculas exclusivas para cada espécie de fungo. Além disso, essas análises permitiram a identificação de novos biomarcadores candidatos ao diagnóstico PCM, bem como a identificação de moléculas a serem utilizadas como futuros biomarcadores epidemiológicos.

**Palavras-chave:** *Paracoccidioides* spp.; Antígenos secretados; Epítomos; Diagnóstico; Espectrometria de Massas.

## ABSTRACT

---

### **Identification by immunoproteomic of exoantigens of the *Paracoccidioides* complex, with potential application in diagnosis and therapy of Paracoccidioidomycosis**

Fungi of *Paracoccidioides* complex are the etiological agents of Paracoccidioidomycosis (PCM), a systemic mycosis restricted to Latin American countries. Currently, the *Paracoccidioides* genus is represented by *P. lutzii*, *P. americana*, *P. brasiliensis*, *P. restrepiensis* and *P. venezuelensis*. In some cases, oral and skin mucosal lesions caused by other pathogens may coincide with lesions caused by *Paracoccidioides* spp.. Moreover, even with the advances in immunological techniques used for the diagnosis of fungal diseases, false-positive results rates for PCM are present. Thus, we investigated which antigens are secreted by 4 species of the *Paracoccidioides* complex in order to identify and characterize new molecules, thus increasing the spectrum of antigens to be used for future diagnostic tests of PCM. Through of nanoUPLC-MS<sup>E</sup>, 79 exoantigens were identified in 4 *Paracoccidioides* species. *In silico* analysis revealed 2 exoantigens exclusive to *P. lutzii* species, as well as the identification of 44 unique B-cell epitopes of the *Paracoccidioides* complex. Thirteen exclusive epitopes distributed among *Paracoccidioides* species also predicted, being this excellent molecules to be employed in the future for epidemiological studies. These results demonstrate a range of epitopes exclusive to the *Paracoccidioides* complex as well as the identification of molecules unique to each fungal species. In addition, these analyzes allowed the identification of new candidate biomarkers to PCM diagnosis, as well as the identification of molecules to be used as future epidemiological biomarkers.

**Keywords:** *Paracoccidioides* spp.; Secreted antigens; Epitopes; Diagnosis; Mass Spectrometry.

# **1 INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA**

---

## **1.1. Os fungos do complexo *Paracoccidioides* spp.**

Os fungos do gênero *Paracoccidioides* são os agentes etiológicos da paracoccidioidomicose (PCM), uma micose sistêmica restrita aos países da América Central e América do Sul, sendo esta considerada a mais importante micose endêmica nessas regiões, especialmente no Brasil (Restrepo *et al.*, 2001).

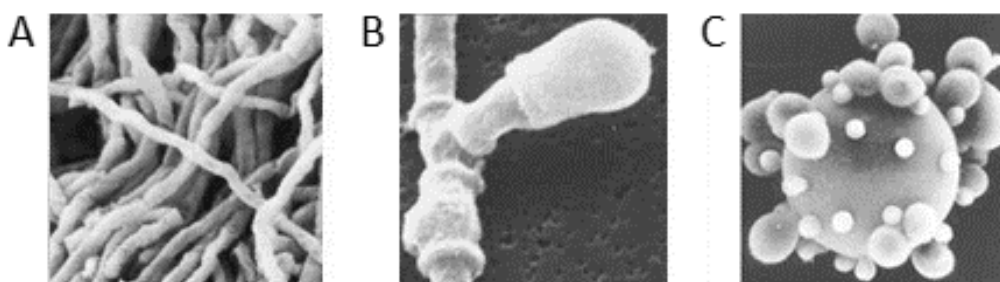
*Paracoccidioides brasiliensis* foi inicialmente descrito por Adolpho Lutz em 1908, onde foi isolado a partir de lesões da mucosa oral e de linfonodos cervicais de pacientes no Instituto Biológico de São Paulo (Brasil). A princípio, este fungo foi descrito como o agente etiológico da hifoblastomicose pseudococcídica (Lacaz, 1994). Subsequentemente, em 1912, o fungo foi denominado por Splendore como *Zymonema brasiliensis*, e em 1930, após distinguir o fungo do agente *Coccidioides immitis*, Floriano de Almeida propôs o nome *P. brasiliensis* (Marques, 1998).

*Paracoccidioides* spp. são caracterizados como fungos dimórficos, termo-dependente, apresentando uma fase miceliana saprobiótica e uma leveduriforme parasitária (Lacaz (1994); Teixeira, Theodoro, Oliveira, *et al.*, 2014). Os fungos dimórficos são caracterizados por apresentarem mudanças de uma fase filamentosa multicelular para uma unicelular (Theodoro *et al.*, 2012). Essas características são presentes também em outros fungos patogênicos humanos como, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii* e *C. immitis*.

Acredita-se que a capacidade de alteração da fase miceliana para a leveduriforme seja um importante mecanismo de virulência e patogenicidade destes fungos, resultando não somente em suas mudanças morfológicas, mas também nas alterações da composição da parede celular, na expressão de fatores de virulência e na expressão de moléculas antigênicas (Kanetsuna *et al.*, 1969; Theodoro *et al.*, 2012). A transição dimórfica pode ser reproduzida *in vitro*, através da mudança da temperatura de incubação do microrganismo. Sendo assim, *Paracoccidioides* é considerado um excelente modelo para o estudo dos mecanismos moleculares envolvidos no dimorfismo térmico fúngico (San-Blas, 1985; Rappleye e Goldman, 2006).

Devido a essas características, os fungos do gênero *Paracoccidioides* spp. quando encontrados no meio ambiente ou cultivados *in vitro* a temperatura de 25 °C, crescem como micélio. Quando a forma miceliana é visualizada microscopicamente, apresentam hifas finas, hialinas, septadas e com vários núcleos, medindo de 1 a 3 µm e com raros clamidósporos terminais ou intercalares (Figura 1A) (Franco *et al.*, 1989; Queiroz-Telles, 1994). Quando em baixas temperaturas ou carência de nutrientes, as hifas podem produzir conídios, sendo esta a forma de resistência e propagação do fungo (Figura 1B) (Angela Restrepo, 1988).

Quando a forma miceliana esta alojada nos tecidos do hospedeiro ou incubada *in vitro* à temperatura em torno de 36 °C ocorre a transição dimórfica para a fase leveduriforme (Mcewen *et al.*, 1987). Quando a forma leveduriforme é visualizada microscopicamente, é possível observar células esféricas ou ovais com múltiplos brotamentos polares ou multipolares (aparência de “roda de leme”), medindo de 2-30 µm de diâmetro, com múltiplos núcleos, apresentando paredes birrefringentes e citoplasma contendo vacúolos de lipídeos (Figura 1C) (Restrepo, 1978; San-Blas *et al.*, 2002).



**Figura 1: Aspectos morfológicos de *Paracoccidioides* spp..** (A) Micélio. (B) Conídio. (C) Levedura. Fonte: *Broad Institute.org*.

Ainda não foi totalmente elucidado qual o habitat natural e quais as condições saprobióticas do fungo, porém sabe-se que a via de infecção principal é através da inalação de propágulos infectantes pelas vias aéreas superiores, onde a infecção se estabelece inicialmente nos pulmões (Restrepo *et al.*, 2001). *Paracoccidioides* pode ser encontrado no solo como micélio (forma saprobiótica), atuando na decomposição de material orgânico para obtenção de nutrientes, como confirmado por testes moleculares e isolamento direto do solo (Silva-Vergara *et al.*, 1998; Theodoro *et al.*, 2005). Devido as características ecológicas encontradas em regiões endêmicas de paracoccidioidomicose, sabe-se que o fungo habita preferencialmente em ambientes com temperaturas médias e ambientes úmidos (Restrepo, 1985).

## 1.2 Taxonomia de *Paracoccidioides* spp.

Com o intuito de propor a classificação de *Paracoccidioides* spp., foram realizadas comparações filogenéticas entre espécies de fungos dermatófitos da família *Arthrodermataceae* e espécies de fungos dimórficos da família *Onygenaceae*, onde foram utilizadas a subunidade ribossomal 28S para as análises (Leclerc *et al.*, 1994). Sendo assim, os fungos do gênero *Paracoccidioides* foram classificados como pertencentes ao reino *Fungi*, filo *Ascomycota*, classe *Euromycetes*, ordem *Onygenales* e família *Ajellomycetaceae* (*Onygenaceae*), a mesma que *B. dermatitidis*, *H. capsulatum*, *C. immitis* e *Coccidioides posadasii*. Estes fungos compartilham características como dimorfismo térmico, formas infectantes como micélio e conídios, e um habitat geograficamente restrito (Bagagli *et al.*, 2008).

Inicialmente, por meio de análises de polimorfismo genético foram propostas 3 espécies filogenéticas distintas para *P. brasiliensis*, divididas em espécie filogenética 1 (S1); com 38 isolados, espécie filogenética 2 (PS2); com 6 isolados e espécie filogenética 3 englobando 21 isolados (Matute *et al.*, 2006).

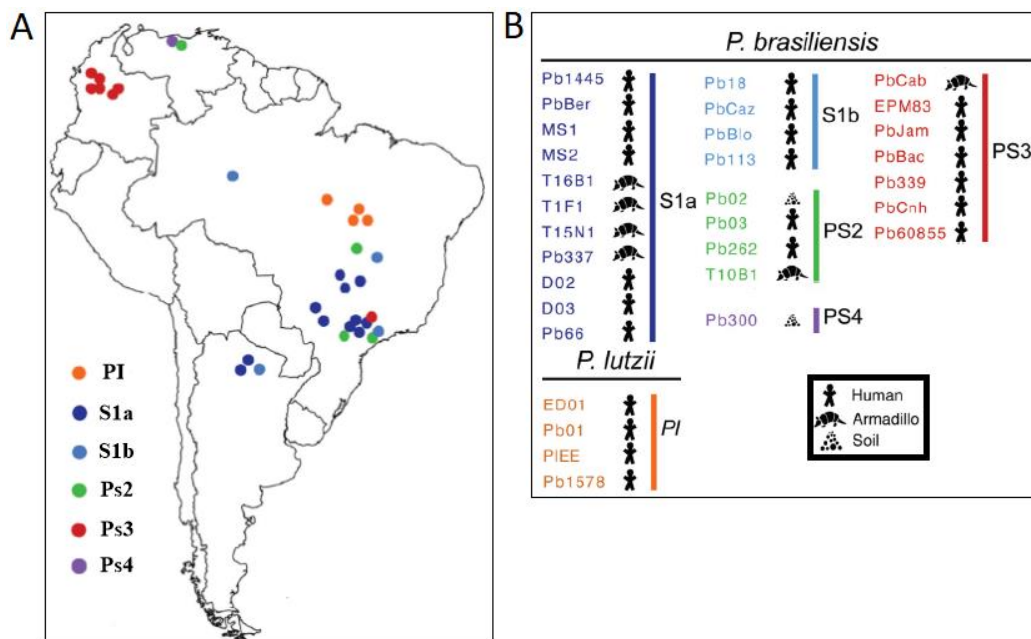
Em seguida, foram realizadas análises de regiões genômicas de isolados de *Paracoccidioides*, onde foi demonstrado que o isolado *Pb01* apresentava diferenças genômicas dos demais isolados de *P. brasiliensis*, sendo sugerido como uma nova espécie dentro do gênero *Paracoccidioides* (Carrero *et al.*, 2008).

Posteriormente, foram utilizados métodos de reconhecimento filogenético (GCPSR) com o intuito de confirmar a possível existência de uma nova espécie filogenética. Com isso o isolado *Pb01* demonstrou grande divergência genética e morfológica quando comparado a outros isolados pertencentes as espécies filogenéticas S1, PS2 e PS3, sugerindo uma nova espécie, denominada *Paracoccidioides lutzii*, em homenagem a Adolpho Lutz (Teixeira *et al.*, 2009).

Com isso, surgiu-se a necessidade de sequenciar os genomas de *Paracoccidioides* spp., afim de elucidar as diferenças genômicas presentes entre os isolados. Em estudos realizados por Desjardins *et al.*, (2011), os genomas de 3 isolados de *Paracoccidioides* (*Pb01*, *Pb03* e *Pb18*) foram sequenciados. Inicialmente as análises possibilitaram a identificação de 5 cromossomos em cada isolado e estes tiveram seu sequenciamento realizado. O isolado *Pb01* apresentou um total de 9.132 genes com genoma de 32,9 Mb, sendo este o que apresentou a maior quantidade de genes em relação aos outros isolados durante o estudo. *Pb03* foi identificado com 7.875 genes com um genoma de 29,0 Mb e

*Pb18* com um genoma de 29,9 Mb, contendo 8.741 genes. Estes estudos auxiliaram na compreensão das diferenças existentes entre os genomas de *Paracoccidioides* spp., proporcionando a caracterização dos genes e de suas regiões promotoras (Desjardins *et al.*, 2011).

Em seguida, através de análises filogenéticas foi identificada uma nova espécie filogenética de *P. brasiliensis*, composta por uma população monofilética de isolados clínicos da Venezuela, que foi denominada como espécie filogenética 4 (PS4) (Teixeira, Theodoro, Nino-Vega, *et al.*, 2014).



**Figura 2: Distribuição geográfica e divisões dos clados de *Paracoccidioides* spp..** (A) Distribuição geográfica das espécies filogenéticas de *Paracoccidioides* spp. na América Latina. (B) Divisões das espécies em clados e subclados de *P. brasiliensis* e do clado *P. lutzii*. *Human*: Espécies isoladas em humanos; *Armadillo*: Espécies isoladas em tatus; *Soil*: Espécies isoladas do solo. As cores presentes na figura correspondem as espécies de *Paracoccidioides*. Em laranja *P. lutzii* e demais cores como: azul escuro (espécies filogenéticas 1a), azul claro (espécies filogenéticas 1b), verde (espécies filogenéticas 2), vermelho (espécies filogenéticas 3) e roxo (espécies filogenéticas 4), representam *P. brasiliensis*. Adaptado de Munoz *et al.*, 2016.

Em 2016, dois isolados de *P. brasiliensis* também foram sequenciados, o *PbCnh* e o *Pb300*. Após o sequenciamento, o isolado que apresentou o maior genoma foi *PbCnh*, com 8.324 genes, seguido do isolado *Pb300*, com 8.070 genes identificados (Munoz *et al.*, 2016). Com a caracterização dos genomas desses isolados, foram realizadas análises comparativas em busca de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) no genoma de 26 linhagens de *Paracoccidioides* spp.. Com isso, foram identificadas várias

diferenças entre os genes dos isolados da espécie filogenética S1, onde esses foram divididos em dois subclados, S1a e S1b (Figura 2A) (Munoz *et al.*, 2016).

De acordo com a classificação feita por Munoz *et al.*, (2016), os subclados S1a e S1b de *P. brasiliensis* compreendem 12 isolados presentes no Brasil e 3 na Argentina. Para o clado PS2 foram identificados 3 isolados no Brasil e 1 na Venezuela. Os isolados que compõem PS3 são predominantes na Colômbia, apresentando 6 isolados e apenas 1 foi descrito no Brasil. A PS4 apresenta apenas 1 isolado identificado na Venezuela e a espécie *P. lutzii* apresenta apenas 4 isolados oriundos do Brasil (Figura 2B).

Recentemente, foi proposta uma nova classificação para os isolados do gênero *Paracoccidioides*. Nestes estudos foram realizadas análises que demonstraram diferenças a nível molecular e morfológico em leveduras de cada espécie de *Paracoccidioides*. Com isso, foi proposto o reconhecimento taxonômico de 3 novas espécies. Para os isolados representantes do clado PS2 foi proposto o nome *Paracoccidioides americana*, referindo-se à distribuição das espécies no continente Sul-Americano. Para os isolados representantes da Colômbia (PS3), foi proposto a denominação de *Paracoccidioides restrepiensis*, em tributo a Dr<sup>a</sup> Angela Restrepo e para o isolado representante do clado PS4, foi proposto o nome *Paracoccidioides venezuelensis*, referindo-se à distribuição das espécies na Venezuela (Turissini *et al.*, 2017).

### 1.3 Paracoccidioidomicose

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica causada por fungos termodimórficos do gênero *Paracoccidioides* (Teixeira, Theodoro, Nino-Vega, *et al.*, 2014). Esse termo foi determinado em 1971, durante uma reunião de micologistas da América Latina na Colômbia, o qual prevalece até os dias atuais como nomenclatura oficial (Valle e Costa, 2001).

Na natureza, as espécies de *Paracoccidioides* se desenvolvem como estruturas filamentosas (hifas) e quando em condições de estresse ou escassez de nutrientes, as hifas podem produzir propágulos infecciosos, denominados de conídios. A doença é adquirida quando um indivíduo inala conídios ou fragmentos de hifas que podem alcançar os alvéolos pulmonares, que à temperatura de 37 °C sofre transição para a forma leveduriforme, sendo considerada a forma parasitária de *Paracoccidioides* (Wanke e Londero, 1994; Lacaz *et al.*, 2002).

O desenvolvimento da doença, dependendo da forma clínica, pode ocorrer imediatamente após o contato com o fungo ou levar anos para ser desencadeada. A PCM pode se manifestar sob duas formas clínicas: aguda/subaguda (juvenil) e forma crônica (adulta) (Morejon *et al.*, 2009).

A forma aguda/subaguda é responsável por 5-25% dos casos de PCM e pode ser a forma clínica mais frequente em certas regiões endêmicas. Esta é observada com frequência em alguns estados do Brasil como Maranhão, Goiás, Minas Gerais, Pará e São Paulo (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2017). Esta forma clínica afeta principalmente crianças, adolescentes e adultos jovens, porém pode ocorrer em adultos com idade entre 30 e 40 anos. A incidência tende a ser uniforme entre os gêneros masculino e feminino, especialmente entre adolescentes, que apresentam uma acentuada depressão da resposta imune celular e elevados títulos de anticorpos (Franco *et al.*, 1987; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006; Fabris *et al.*, 2014). Além disso, esta forma clínica apresenta rápida evolução e disseminação do fungo para outros órgãos e vias linfáticas, sendo diagnosticada dentro de poucas semanas após os primeiros sintomas. Quando a disseminação ocorre por meio de vias linfáticas, o sistema fagocítico mononuclear pode ser atingido, podendo causar disfunção medular ou hepatoesplenomegalia. Nesta forma clínica, as lesões nas mucosas (15-20%) e o acometimento pulmonar (5-11%) por *Paracoccidioides* spp. é considerada rara (Del Negro *et al.*, 1994; Mendes, 1994).

A forma crônica da PCM representa a maioria dos casos (74% a 96%). Esta, se manifesta principalmente em homens adultos que trabalham em áreas agrícolas, com idade entre 30 e 60 anos, sendo o sexo masculino mais afetado em uma proporção de 22 homens para uma mulher (Mendes, 1994; Costa *et al.*, 2013). Acredita-se que o hormônio feminino 17- $\beta$ -estradiol confere resistência natural à infecção por *Paracoccidioides* spp., uma vez que já foram realizados estudos demonstrando a importância deste hormônio, inibindo o processo de transição dimórfica da fase miceliana para a leveduriforme (Restrepo *et al.*, 1984; Shankar *et al.*, 2011). Também foram realizados experimentos investigando a relação hormonal com a infecção ocasionada por *Paracoccidioides* sp. em camundongos machos e fêmeas, onde em machos houve progressão na infecção e em fêmeas ocorreu a restrição da proliferação do fungo, levando ao não desenvolvimento da doença (Aristizabal *et al.*, 2002).

Além disso, a forma crônica inicia lentamente, onde os sintomas podem persistir de 4 a 12 meses. Pacientes acometidos por esta forma clínica, em 90% dos casos, apresentam comprometimento pulmonar seguido de acometimento das mucosas das vias

aéreas superiores, tubo digestivo e pele (Mendes, 1994; Costa *et al.*, 2013). Além do acometimento das mucosas, outras lesões podem ocorrer nos gânglios linfáticos e adrenais e com uma menor frequência, podem ocorrer destruição óssea, comprometimento do sistema nervoso e envolvimento ocular (Rivitti e Aoki, 1999). Sendo assim, essa forma clínica apresenta acometimento unifocal (um órgão) ou multifocal (disseminação para outros órgãos) (Franco *et al.*, 1987).

A PCM também apresenta uma forma assintomática da doença, onde pode ser observado em testes intradérmicos a positividade contra à paracoccidioidina, um antígeno de *Paracoccidioides* spp.. Em indivíduos saudáveis, observa-se durante o teste, intensas reações intradérmicas, demonstrando uma imunidade celular preservada (Franco, 1987).

Para o diagnóstico da PCM podem ser utilizados materiais biológicos como escarro, biópsia de tecidos lesionados, material oriundo de gânglios linfáticos, mucosas, urina, que podem ser analisados por microscopia ótica. Para análises imunológicas da doença, são realizados testes intradérmicos utilizando paracoccidioidina e coleta de soro de pacientes para análises por *immunoblotting* e ensaios imunoenzimáticos (Sidrim & Rocha, 2003).

O isolamento de células fúngicas em meios de cultura é considerada a melhor forma para se diagnosticar a doença, tanto para PCM quanto para outras micoses. Para o isolamento de fungos do gênero *Paracoccidioides*, recomenda-se a utilização de meios de culturas contendo infusão de cérebro e coração (BHI), extrato de levedura, ágar e antibióticos. O material coletado proveniente de escarro, linfonodos ou mucosas é inoculado em meios de cultura e incubado a 25 °C, levando entre 15-30 dias para o crescimento. As células crescem sob a forma miceliana, onde colônias com aspecto cotonoso, apresentando coloração esbranquiçada ou amarronzada podem ser visualizadas (Queiroz-Telles, 1994; De Camargo e De Franco, 2000; Ferreira e Do Lago Moraes, 2000).

Outra forma de diagnosticar a PCM é por meio de análises por microscopia ótica. Através desta, podem ser visualizadas leveduras do fungo presentes em material de secreção do trato respiratório, pus de gânglios linfáticos, tecido de biópsia, líquido cefalorraquidiano e urina. Quando visualizadas ao microscópio ótica, as células apresentam-se em formas ovais ou elípticas, globosas, com inclusões citoplasmáticas contendo múltiplos brotamentos, apresentando um diâmetro de 2 a 30  $\mu\text{m}$  (San-Blas *et al.*, 2002; Moreira, 2008).

Quando o material é oriundo de biopsia, colorações especiais são empregadas como ácido periódico de Schiff ou Gomori-Grocott. Por análises por microscopia ótica pode se observar células com múltiplos brotamentos dispostas em volta das células mãe (Ferreira e Do Lago Moraes, 2000).

Algumas situações impossibilitam o acesso ao local da lesão impedindo assim a coleta dos materiais biológicos (Moreira, 2008). Com isso, são utilizados anticorpos obtidos de pacientes doentes para realização de testes sorológicos (Mendes-Giannini *et al.*, 1989; Ferreira-Da-Cruz *et al.*, 1990). Além de apresentar um importante auxílio no diagnóstico, estes possuem grande importância no monitoramento durante o curso da doença e no pós-tratamento (Salina *et al.*, 1998; Del Negro *et al.*, 2000), possibilitando obter resultados mais rápidos, quando comparados a exames histopatológicos e de cultura celular (Ferreira e Do Lago Moraes, 2000).

Apesar da eficiência de técnicas empregadas para o diagnóstico da PCM como imunodifusão dupla, *western blotting*, ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) e imunofluorescência indireta, os índices de falso-negativo e falso-positivo são muito elevados, estando a sensibilidade e especificidade das técnicas diretamente relacionada ao antígeno empregado (Franco *et al.*, 1973; Del Negro *et al.*, 2000; Albuquerque *et al.*, 2005).

Na imunodifusão se utiliza os antígenos obtidos de filtrados de cultura, a partir de células leveduriformes de *Paracoccidioides* e soro de pacientes com suspeita de PCM. Com esse teste é possível identificar 3 linhas de precipitação. A primeira é identificada em 98% dos soros de paciente portadores da doença ativa. A segunda tem sido identificada em 65% dos casos, que começa a desaparecer após o início do tratamento com fármacos. A terceira geralmente é a primeira a desaparecer e é identificada em 35% dos casos (Mendes-Giannini *et al.*, 1994).

Teste de ELISA também tem sido empregado para detectar anticorpos em quase todas as micoses sistêmicas. Porém, o teste imunoenzimático para o diagnóstico da PCM oferece altas taxas de reatividade cruzada com outras micoses, como candidíase, histoplasmose, criptococose, e recentemente com soro de pessoas aparentemente saudáveis que residem em áreas endêmicas de PCM (Albuquerque *et al.*, 2005).

Técnicas como *western blotting* possuem alta sensibilidade e podem ser empregadas para a caracterização de antígenos em *Paracoccidioides* sp. (Costa *et al.*, 2000). Com isso, já foram utilizados alguns antígenos para o diagnóstico da PCM, como a proteína de 27 kDa, que em estudos realizados por Ortiz *et al.*, (1998) foi reconhecida

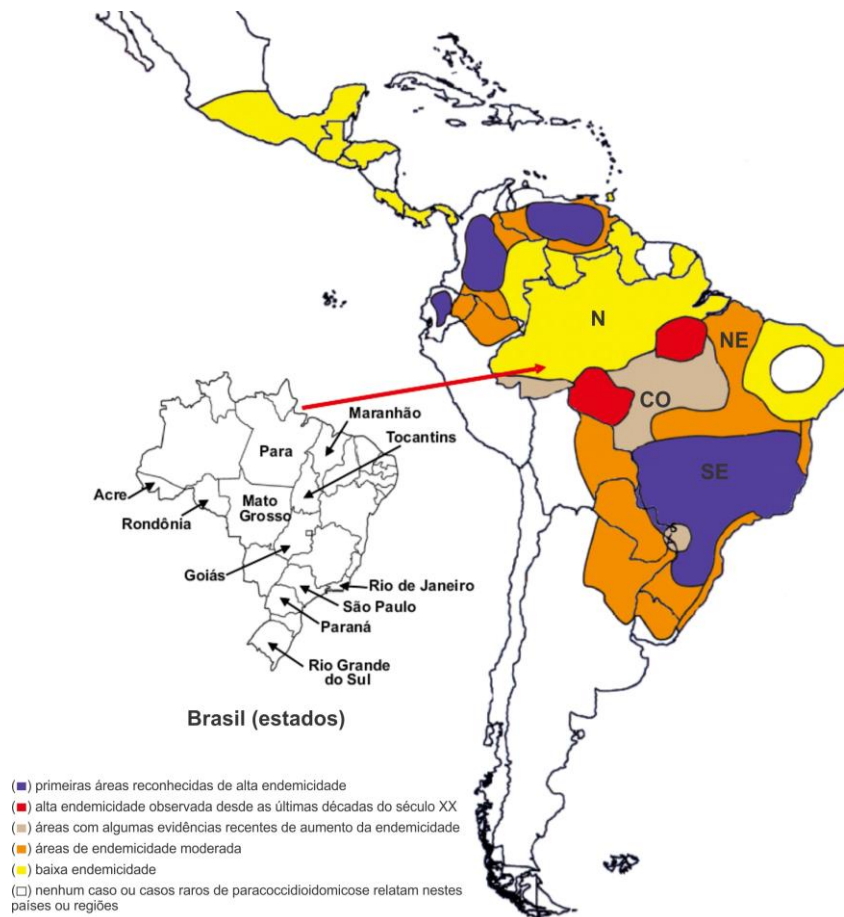
por 91% dos soros de pacientes. Outro antígeno utilizado para o diagnóstico da PCM é a gp43, onde Takahachi *et al.*, (1999), observaram 65% de reatividade com soros de doentes.

É de extrema importância salientar que a forma crônica da doença deve ser avaliada com maior critério, sendo fundamental diferenciá-la das outras micoses e tuberculose. Além disso, o diagnóstico diferencial entre doenças como a leishmaniose e a PCM devem ser realizados, uma vez que a leishmaniose ocasiona lesões nas mucosas orais, fossas nasais e cutâneas. Essas características podem coincidir muitas vezes com a PCM (Ferreira e Do Lago Moraes, 2000).

Com isso, a detecção de antígenos específicos de *Paracoccidioides sp.* tem sido um dos principais indicadores para o diagnóstico da doença. Além disso, diagnósticos sorológicos da PCM demonstram ser uma ferramenta importante no monitoramento e no tratamento de pacientes com PCM (De Camargo, 2008). Entretanto, os métodos sorológicos utilizados para o diagnóstico de infecções fúngicas são na maioria das vezes lentos, com baixa especificidade e sensibilidade (Erjavec e Verweij, 2002).

#### **1.4 Aspectos epidemiológicos da PCM**

A PCM não é considerada uma doença de notificação compulsória, dado que as estimativas de incidência, prevalência e morbidade de micoses são fundamentadas em registros hospitalares, relatórios de pesquisas epidemiológicas, séries de casos, e dados de mortalidade (Martinez, 2015). Com base em dados obtidos por serviços de atendimento a pacientes com PCM, a incidência da doença em áreas endêmicas varia de 1 a 3 casos por 100.000 habitantes e 3 a 4 novos casos por 1.000.000 habitantes por ano (Lacaz *et al.*, 2002; Martinez, 2015). Aproximadamente 80% dos casos estão registrados no Brasil, particularmente nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás e Rondônia (Figura 3), sendo que os casos relatados fora de regiões endêmicas são de pacientes que residiram ou visitaram locais de incidência da doença (Sposto *et al.*, 1993; Bicalho *et al.*, 2001; Paniago *et al.*, 2003; Martinez, 2015). Estima-se que em regiões endêmicas, aproximadamente 10 milhões de indivíduo estejam infectadas com PCM. Contudo, a maioria não apresenta sintomas clínicos (Restrepo *et al.*, 2001).



**Figura 3: Áreas endêmicas de Paracoccidioidomicose na América Latina.** As cores presentes na imagem correspondem ao índice de endemicidade. Azul (primeiras áreas reconhecidas de alta endemicidade), vermelho (alta endemicidade observada desde as últimas décadas do século XX), marrom claro (áreas com algumas evidências recentes de aumento da endemicidade), alaranjado (áreas de endemicidade moderada), amarelo (baixa endemicidade) e branco (nenhum caso ou casos raros de PCM nos respectivos países). Regiões: N (Norte), NE (Nordeste), CO (Centro-Oeste) e SE (Sudeste). Reproduzido a partir de Martinez, 2017.

De acordo com o Ministério da Saúde, foram documentados 3.181 casos de óbitos relacionados a PCM entre os anos de 1980 e 1995, resultando em uma taxa de mortalidade de 1,45 casos por 1.000.000 de habitantes (2,35 para o Centro-Oeste, 2,59 para o Sul, 1,81 para Sudoeste, 1,08 para o Norte e 0,2 para as regiões do Nordeste). Isso demonstrou a importância e a baixa visibilidade da doença, sendo destacada como a oitava causa de morte por doenças predominantemente crônicas (infecciosas e parasitárias) e apresentou ser a micose sistêmica com maior taxa de mortalidade (Coutinho *et al.*, 2002).

Além disso, dados de 13.683 pacientes que foram hospitalizados com micoses sistêmicas entre janeiro de 1998 a dezembro de 2006 demonstraram que a PCM

apresentou o maior índice de hospitalizações (49%) entre todas as micoses, com ênfase nas taxas de hospitalização para regiões do Centro-Oeste e Norte (Coutinho *et al.*, 2015).

Outra forma de se obter dados epidemiológicos da infecção por PCM baseia-se em inquéritos com reações intradérmicas de leitura tardia, sendo considerada uma estratégia adequada, simples e de baixo custo para avaliações de prevalência regional do fungo. Contudo, existem relatos mostrando a dificuldade de comparar resultados de exames frente a heterogeneidade de antígenos, embora há dados que demonstrem que esses testes são positivos nas formas crônicas e negativos nas formas aguda e subaguda. Além disso, existe a possibilidade de reatividade cruzada em testes com antígenos de outros patógenos como *H. capsulatum* (Mangiaterra *et al.*, 1996; Fava e Netto, 1998).

Em relação à incidência da doença, já foram relatados casos no Ceará e elevada quantidade de casos no estado do Maranhão no período de 1997 a 2007 (estimando 10,8 casos por 100.000 habitantes), evidenciando que outras áreas úmidas presentes no país também podem ser consideradas endêmicas (Figura 3) (Façanha *et al.*, 2010; Matos *et al.*, 2012).

Também foi observado em Foz do Iguaçu - PR a incidência de 102 casos de paracoccidiodomicose em um período de 18 meses. Além da alta incidência de casos neste estado, foi destacada a alta porcentagem de co-infecções com tuberculose (28,4% de todos os casos) e HIV (4,9%), sendo a taxa de mortalidade nessa população estudada de 14,7% (Loth *et al.*, 2011). De certa forma, esses fatos demonstram que a paracoccidiodomicose e uma possível co-infecção podem interferir no tratamento e no prognóstico da doença (Marques, 2013).

Em estudos clínico-epidemiológicos realizado por Bellissimo-Rodrigues *et al.*, (2011), foi investigado uma série de 1.000 casos de diagnósticos de PCM na região de Ribeirão Preto-SP, que foram coletados entre os anos de 1960 a 1999. Isso demonstrou uma incidência de 1,6 a 3,7 novos casos por 100.000 habitantes na área. As proporções desses casos foram de 6 homens para 1 mulher, sendo predominantemente a forma crônica da doença (74,6%), atingindo principalmente trabalhadores de zonas rurais (93,5%), indivíduos consumidores de tabaco (8,3%) e co-infecções por outras doenças como HIV (4,2%) e tuberculose (8,3%) (Bellissimo-Rodrigues *et al.*, 2011).

Registros recentes de PCM em Rondônia, demonstraram uma incidência média de 9,4 casos anuais por 100.000 habitantes, onde alguns municípios atingiram uma

incidência quase quatro vezes superior (40 casos/100.000 habitantes) à média do Estado (Vieira Gde *et al.*, 2014).

Em um levantamento feito por Martinez (2015), foram relatados 12.476 casos de Paracoccidioidomicose no Brasil entre os anos de 1930 a 2009. Nesse período foram relatados lugares com altos índices de casos anuais de PCM, tais como: Sudeste (MG-ES-RJ-SP) com 207,8 casos, Oeste da Amazônia (RO-AM-AC) com 146,1 casos, Sul (PR-RS) com 140,6 casos, Centro-Oeste (GO-MS-DF) com 49,2 casos e para Leste da Amazônia (MA-PA-TO) com 17,0 casos. Além disso, foram realizados levantamentos para outros países como Argentina, apresentando uma média anual de 110 casos no ano de 2004, Colômbia com 32,4 casos entre os anos de 1970 a 1999 e Venezuela, que apresentou 25,9 números de casos anuais entre os períodos de 1984 a 2010 (Martinez, 2015).

Esses números refletem parcialmente a prevalência da doença em países da América latina. A distribuição dos casos de PCM e taxas de infecções por *Paracoccidioides* spp. em amostras populacionais demonstram heterogeneidade em diferentes regiões de cada país e evidenciam as áreas com maior endemicidade (Martinez, 2015).

Em relação a infecções por *Paracoccidioides* sp. em pacientes imunodeprimidos, foi realizado um levantamento entre os anos de 1996 a 2006 com o intuito de identificar se a PCM era a principal causa de morte associada a pacientes com AIDS no Brasil. Nesse período foram relatadas 125.633 mortes por AIDS, sendo 4,7% (5.898 casos) associadas a micoses sistêmicas. Dentre estas, a que apresentou maior frequência foi criptococose (50,9% das mortes), seguida por candidíase (30,2%), histoplasmose (10,1%) e paracoccidioidomicose (1,4%). Do contrário, ao investigar as taxas de mortalidade de pacientes não acometidos por AIDS, observou-se um resultado contraditório, demonstrando a PCM como a principal causa de morte em grupos de micoses profundas, correspondendo a 51,1% de todas as mortes por micoses nesse período (Prado *et al.*, 2009).

### **1.5 Antígenos de *Paracoccidioides* spp.**

Assim como outros patógenos, os fungos do gênero *Paracoccidioides* spp. expressam uma diversidade de proteínas que podem ser reconhecidas por anticorpos de

pacientes infectados ou de animais imunizados em laboratórios (Dantas *et al.*, 2009). Essas moléculas podem ser obtidas a partir de extratos de parede celular, conteúdo citoplasmático e até mesmo por filtrado de culturas (Restrepo *et al.*, 1983). Várias dessas moléculas já foram identificadas e caracterizadas em *Paracoccidioides* spp. como, por exemplo, gp43 (Puccia *et al.*, 1986), triosefosfato isomerase (Pereira *et al.*, 2007), p27 (Mcewen *et al.*, 1996), malato sintase (Da Silva Neto *et al.*, 2009), gp70 (De Mattos Grosso *et al.*, 2003) e formamidase (Borges *et al.*, 2005) (Tabela 1).

| <b>Tabela 1: Antígenos de <i>Paracoccidioides</i> spp. já descritos na literatura.</b> |  |
|--|--|
| Gp43   | Puccia <i>et al.</i> , 1986; Cisalpino <i>et al.</i> , 1996; Camargo <i>et al.</i> , 1994; Vicentini <i>et al.</i> , 1994; Travassos <i>et al.</i> , 1995; Almeida <i>et al.</i> , 1998; Popi <i>et al.</i> , 2002; Diniz <i>et al.</i> , 2002 |
| p27  | Mcewen <i>et al.</i> , 1996; Correa <i>et al.</i> , 2007; Torres <i>et al.</i> , 2014  |
| 87 kDa   | Gomez <i>et al.</i> , 1997; Diez <i>et al.</i> , 2002  |
| P10  | Taborda <i>et al.</i> , 1998; Marques <i>et al.</i> , 2006   |
| 27 kDa   | Ortiz <i>et al.</i> , 1998   |
| HSP60  | Izacc <i>et al.</i> , 2001; Cunha <i>et al.</i> , 2002; De Bastos Ascenço Soares <i>et al.</i> , 2008  |
| Gp70   | De Mattos Grosso <i>et al.</i> , 2003; Da Silva <i>et al.</i> , 2004   |
| Formamidase  | Borges <i>et al.</i> , 2005; Borges <i>et al.</i> , 2010   |
| Triosefosfato isomerase  | Pereira <i>et al.</i> , 2007; Da Silva Neto <i>et al.</i> , 2009   |
| Malato sintase   | Da Silva Neto <i>et al.</i> , 2009   |

Dentre os antígenos identificados em *Paracoccidioides* spp., uma das moléculas mais bem caracterizadas é a molécula secretada gp43, que foi clonada, sequenciada e descrita como um polipeptídeo de 416 aminoácidos, apresentando similaridade de 56 e 58% com a exo-1,3- $\beta$ -D-glucanase de *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans* (Cisalpio *et al.*, 1996). A gp43 foi definida como uma glicoproteína de massa molecular de 43 kDa que reage com soro de pacientes acometidos por PCM, tanto em testes como a radioimunoprecipitação, quanto em testes como a imunodifusão (Puccia *et al.*, 1986). Além disso, outros testes como a cromatografia de afinidade com IgG imobilizada a partir do soro de pacientes com PCM, demonstrou a imunogenicidade da gp43, sendo então considerada um importante antígeno capaz de induzir a produção de anticorpos em pacientes com a doença (Camargo *et al.*, 1994; Travassos *et al.*, 1995).

Em relação aos processos de interação patógeno-hospedeiro, a gp43 demonstrou-se de grande importância, uma vez que ela foi descrita como uma possível molécula envolvida nos processos de adesão celular, ligando-se principalmente a laminina presente na superfície das células do hospedeiro, possibilitando o processo de adesão inicial e patogênese de *P. brasiliensis* (Vicentini *et al.*, 1994). Outros estudos

demonstraram que esta molécula pode estar envolvida nos processos de defesa celular, atuando principalmente na inibição da produção de óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em macrófagos, reduzindo assim, a ação do sistema imunológico do hospedeiro contra o patógeno (Almeida *et al.*, 1998; Flavia Popi *et al.*, 2002).

Através de análises por *western blotting*, foi possível demonstrar que a proteína recombinante de gp43 reage com soro de pacientes infectados (forma crônica e aguda da PCM), porém não apresentou reatividade cruzada com soro de pacientes acometidos por outras micoses (Diniz *et al.*, 2002), demonstrando com isso a sua especificidade como uma molécula antigênica. Isto também foi demonstrado em experimentos realizados por Camargo *et al.*, (1994), onde foi realizada a produção de anticorpos monoclonais (17C, 21A, 21F e 32B) contra a glicoproteína gp43. Os resultados demonstraram forte reatividade contra antígenos de *P. brasiliensis*, porém não tiveram reatividade cruzada com antígenos de outros fungos como *Aspergillus fumigatus*, *H. capsulatum* e *C. albicans*.

O peptídeo P10 (QTLIAIHTLAIRYAN), derivado da gp43, foi descrito como ativador de células Th específicas, aumentando a proteção contra a PCM em camundongos Balb/c e já foi utilizado em conjunto com terapia medicamentosa na tentativa de melhorar o tratamento da PCM (Taborda *et al.*, 1998). Estudos relataram que P10 também foi capaz de induzir a proliferação de linfócitos Th1, levando a produção de IL-12 e IFN- $\gamma$  após camundongos terem sido sensibilizados com o peptídeo. Além disso, a imunização com P10 na presença de adjuvante completo de Freund causou uma diminuição de 200 vezes na contagem de UFC dos pulmões de camundongos desafiados intratraquealmente com leveduras de *P. brasiliensis* (Taborda *et al.*, 1998).

Em outros estudos, o tratamento combinando a P10 à terapia medicamentosa mostrou uma proteção adicional, sugerindo uma melhora na terapia da doença, reduzindo assim a duração do tratamento para PCM (Marques *et al.*, 2006). Em trabalhos realizados por Marques *et al.*, (2008), foi investigado a eficácia da P10 em camundongos, visando mimetizar o estado anérgico, comum em pacientes acometidos pelas formas aguda e subaguda da PCM. Durante o tratamento, o peptídeo P10 juntamente com dexametasona demonstrou ser eficaz, protegendo os camundongos contra a infecção intratraqueal com cepas virulentas de *P. brasiliensis*. A progressão da doença foi observada por meio da contagem de UFC nos tecidos animais e por meio de histopatologia. Essa análise demonstrou o efeito protetor do peptídeo P10, sendo este

relacionado a indução de uma resposta imune Th1 dependente de IFN- $\gamma$  (Marques *et al.*, 2008).

Em estudos feitos por Izacc *et al.*, (2001), foram realizadas a clonagem, caracterização e expressão heteróloga da HSP60 mitocondrial de *P. brasiliensis*. Por meio de análises por *western blotting*, demonstrou-se a reatividade de HSP60 com soro de pacientes acometidos por PCM, onde 8 entre 10 soros foram reativos com a proteína, evidenciando a sua imunogênicidade. Em análises posteriores, a proteína recombinante HSP60 de *P. brasiliensis* foi induzida, purificada e testada para verificar a sua reatividade com soros de pacientes com PCM. Um total de 75 amostras de soro foram utilizadas para análises por *western blotting*, onde 73 amostras foram reativas contra a recombinante de HSP60 (97,3% de sensibilidade), representando assim uma alta sensibilidade a soros de pacientes com PCM (Cunha *et al.*, 2002).

De Bastos Ascenção Soares *et al.*, (2008) desenvolveram um modelo de infecção pulmonar com *P. brasiliensis* em camundongos, com o intuito de examinar a resposta imune celular contra a proteína recombinante HSP60. Após o processo de vacinação utilizando HSP60 foi induzida produção significativa das citocinas pró-inflamatórias IFN- $\gamma$  e IL-12, induzindo a subpopulação de linfócitos Th1 responsáveis pelas propriedades protetoras contra HSP60. Além disso, foi observado uma alta proliferação de esplenócitos. Esses resultados demonstraram que a proteína recombinante HSP60 induziu a proteção contra a PCM pulmonar em camundongos através de uma resposta imune celular.

Thomaz *et al.*, (2014) examinaram o impacto de dois anticorpos monoclonais contra a HSP60 de *H. capsulatum*, sendo um caracterizado como protetor (4E12, IgG2a) e outro como não protetor (7B6, IgG2b). Durante a infecção em camundongos foi demonstrado que ambos os anticorpos foram biologicamente ativos contra *P. lutzii*, aumentando a fagocitose por macrófagos durante análises *in vitro*. Além disso, a administração passiva de anticorpos reduziu significativamente a carga fúngica no tecido pulmonar dos camundongos. Também foram realizados cortes histológicos dos pulmões dos animais infectados, onde foi possível visualizar uma redução no dano tecidual após a imunização com os anticorpos monoclonais.

Outra glicoproteína expressa em *Paracoccidioides* spp. é a gp70, que é reconhecida por 96% dos soros de pacientes com PCM. De Mattos Grosso *et al.*, (2003) realizaram experimentos afim de produzir anticorpos monoclonais contra a gp70. Durante o estudo foram produzidos e caracterizados seis anticorpos monoclonais contra

esta molécula. Três desses anticorpos tiveram seus isotipos estabelecidos como IgG1 e os outros como IgM. Foi observado que o anticorpo monoclonal IgG1 (C5F11) reagiu fortemente com sequências peptídicas de gp70. Em ensaios de imunotransferência foi evidenciado que os anticorpos reagiram com gp70 e apenas um deles (2B8A6D2) não reconheceu a proteína. Além disso, foi observado que a gp70 purificada inibe a atividade de macrófagos *in vitro*, diminuindo a liberação de NO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Posteriormente foi feita a imunização passiva dos camundongos durante o processo de infecção com *P. brasiliensis* utilizando os anticorpos monoclonais anti-gp70. Essa imunização levou a diminuição na formação de granulomas nos pulmões dos animais, sugerindo que a gp70 está relacionada com o estabelecimento e a progressão de lesões em infecções primárias causadas por *P. brasiliensis* (De Mattos Grosso *et al.*, 2003).

Em análises realizadas por Da silva *et al.*, (2004), foi demonstrado através da técnica de ELISA a sensibilidade de gp70, sendo reconhecida em 80 de 81 pacientes acometidos por PCM. A sensibilidade à proteína foi de 98,8% em concentrações médias de antígenos (8,19 µg /ml) e atingiu 100% em pacientes com a forma aguda da doença, tendo uma média de antígenos de 11,86 µg /ml. Em pacientes com a forma crônica, observou-se 98,43% de antigenemia (7,87 µg/ml). Quando realizada as análises para verificar a reatividade cruzada, foi constatado que as reatividades não foram presentes quando utilizados soros de pacientes com outras micoses. Além disso, foram avaliados a diminuição de gp70 durante o tratamento com itraconazol entre o período de 8 a 12 meses de terapia. Dentre os 81 pacientes, 23 foram selecionados para o estudo, onde foi observado uma boa resposta a terapia, sem recaídas da PCM durante o período de tratamento. Com isso, os níveis de decréscimo da gp70 foram detectados em pacientes durante a terapia antifúngica (Da Silva *et al.*, 2004).

No ano de 2005, a formamidase (FMD) de *P. brasiliensis* foi caracterizada como uma molécula potencialmente relacionada a interação patógeno-hospedeiro. Inicialmente foi clonado o DNAc da FMD e então a proteína foi superexpressa por sistema heterólogo. Essa proteína apresentou uma massa molecular de 45 kDa e em ensaios por *western blotting*, utilizando soro de pacientes com PCM, demonstrando a sua imunorreatividade. Com isso essa molécula foi descrita como um potencial candidato ao diagnóstico da PCM (Borges *et al.*, 2005). Além disso, foram feitas análises por imunocitoquímica onde foi verificado que a FMD é localizada no citoplasma e na parede celular de *P. brasiliensis*. Devido à localização dessa proteína na

parede celular, foi visto que esta molécula poderia contribuir com as propriedades antigênicas do fungo (Borges *et al.*, 2010).

Com o intuito de criar bibliotecas de DNAC de *P. brasiliensis*, Ortiz *et al.*, (1998) obtiveram um clone que expressa uma proteína de 27 kDa (p27). Esta foi reativa com o soro de 44 pacientes (91%) durante análises por *immunoblotting*, caracterizando essa molécula como um antígeno de *P. brasiliensis*. Além disso, p27 não apresentou reatividade com soro de pacientes com outras micoses ou tuberculose, demonstrando alta sensibilidade e especificidade.

Em estudos realizados por Correa *et al.*, (2007) foi construído um clone em *Escherichia coli* capaz de expressar o gene que codifica a proteína p27, com a finalidade de criar um teste para diagnóstico de fácil execução, com alta sensibilidade e especificidade e que pudesse ser reprodutível em diferentes laboratórios. Para isto, foi utilizada a proteína recombinante p27 como antígeno em testes por *dot blot*. Os dados iniciais demonstraram que os anticorpos presentes em soro de pacientes com PCM reconheceram a proteína recombinante, sem apresentar reatividade cruzada com outras micoses ou tuberculose. Com isso, a sensibilidade utilizando a p27 foi de 100% e a especificidade foi de 98%. Também foram realizados ensaios por *immunoblotting*, onde a p27 apresentou boa sensibilidade e especificidade, demonstrando o potencial imunogênico dessa proteína, sendo uma molécula candidata para o diagnóstico da PCM (Correa *et al.*, 2007).

Torres *et al.*, (2014) realizaram estudos com a finalidade de caracterizar a função biológica da p27 de *P. brasiliensis* e qual o seu possível papel como fator de virulência. Com isso, foram avaliados quais epítomos de p27 tinham a capacidade de ativar células T, qual a função biológica desta proteína e qual o comportamento das células leveduriforme mutantes de p27 durante a infecção com macrófagos estimulados com IFN- $\gamma$ . Durante a predição de epítomos em p27 foram identificadas 4 sequências peptídicas com alta afinidade a 8 moléculas HLA-DR diferentes, sendo que 6 dessas 8 moléculas reconheciam estes 4 epítomos. Por meio de RNA antisense, a p27 foi silenciada em células leveduriformes, o que resultou em alterações na morfologia celular e dificuldades no metabolismo de glicose em *P. brasiliensis*. Além disso, o silenciamento da p27 levou a um aumento da susceptibilidade das células leveduriformes durante a infecção com macrófagos estimulados com IFN- $\gamma$ , demonstrando que essa proteína é importante durante a interação patógeno-hospedeiro (Torres *et al.*, 2014).

Durante estudos proteômicos realizados por Da Fonseca *et al.*, (2001), 6 proteínas de extrato proteico de leveduras de *P. brasiliensis* foram imunorreativas com soros de pacientes com PCM. Após esta etapa, as proteínas foram identificadas por sequenciamento e os antígenos como, catalase, aldolase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, malate desidrogenase e triosefosfato isomerase foram identificadas. Posteriormente, Pereira *et al.*, (2004) isolaram a triosefosfato isomerase (TPI) e foi realizado o microsequenciamento de 3 peptídeos obtidos por digestão proteica. Por análises de homologia esses peptídeos apresentaram elevada similaridade (72-100%) com outros organismos.

Também foi feita a clonagem e a expressão heteróloga da TPI, obtendo a sua proteína recombinante, onde a molécula reagiu com soros de pacientes com PCM durante análises por *immunoblotting*, porém não apresentou reatividade cruzada com soros de indivíduos controle. Análises por microscopia imunoeletrônica possibilitou identificar qual a localização celular da TPI de *P. brasiliensis*, que foi detectada no citoplasma e na parede celular de leveduras. Outras análises por *Far-western blotting*, verificou a habilidade de TPI de se ligar à laminina e à fibronectina. Além disso, o tratamento das leveduras com o anticorpo policlonal anti-TPI inibiu a interação de *P. brasiliensis* com células epiteliais *in vitro* (Pereira *et al.*, 2007).

Da Silva Neto *et al.*, (2009) com o intuito de estudarem a malato sintase (MLS) de *P. brasiliensis*, realizaram a clonagem, expressão heteróloga, purificação da proteína recombinante e produção de anticorpos policlonais anti-MLS. A MLS foi detectada por *immunoblotting* em extratos citoplasmáticos, na parede celular e em seu secretoma. Além disso, foi evidente a presença da MLS no citoplasma e na superfície celular após visualização por microscopia confocal. A habilidade da MLS de se ligar a componentes da matrix extracelular do hospedeiro foi avaliada por *Far-western blotting*. Por meio deste ensaio, constatou-se que a MLS tem propriedades de adesina, se ligando a colágenos tipo I e IV, fibronectina, bem como a componentes presentes em células epiteliais pulmonares. Isso indica que a MLS possui um papel de interação do *P. brasiliensis* com componentes presentes na matriz extracelular do hospedeiro (Da Silva Neto *et al.*, 2009).

Outra molécula descrita como antígeno de *Paracoccidioides* spp. é uma proteína de 87 kDa. Esta foi inicialmente identificada por ELISA sendo detectada por anticorpos monoclonais (P1B) e sugerida para o diagnóstico da PCM. Este teste exibiu uma sensibilidade de 80,4% e especificidade de 81,4% (Gomez *et al.*, 1997). Em outras

análises, a proteína foi purificada e caracterizada como uma proteína de choque térmico. Durante o processo de transição dimórfica de micélio para levedura, induzido por mudança de temperatura de 26 para 36 °C, foi observado o aumento gradual da expressão da proteína de 87 kDa, que foi mensurado por ELISA utilizando anticorpos monoclonais. Além disso, essa proteína foi reativa com anticorpos monoclonais 69F e PIB por meio de ensaios por *western blotting*. Por imunohistoquímica em material de biopsia, a proteína de 87 kDa foi identificada apresentando reatividade com anticorpo monoclonal, sendo sugerida na aplicação para o diagnóstico da PCM (Diez *et al.*, 2002).

Como visto, várias moléculas já foram descritas como antígenos em *Paracoccidioides*, porém, não foi elaborado um método de diagnóstico eficaz utilizando essas moléculas. Além disso, não se sabe quais os antígenos secretados por isolados desse fungo. Sendo assim, se torna de extrema importância a análise de antígenos secretados, uma vez que ainda não foram realizados trabalhos nesse sentido em *Paracoccidioides* spp.. Essas análises poderão levar à identificação de novos biomarcadores moleculares para o diagnóstico da PCM, além da identificação de novas moléculas a serem utilizadas na terapia da doença.

## **1.6 A imunoproteômica**

Inicialmente, o termo proteoma foi utilizado por Wilkins em 1996 e é definido pela caracterização em larga escala de todas as proteínas expressas em uma célula, tecido ou organismo (Wilkins *et al.*, 1996). Hoje, este conceito está mais abrangente, uma vez que a proteômica é capaz de quantificar, determinar modificações pós-traducionais, demonstrar a localização de proteínas em diferentes tecidos, atribuir funções às proteínas, bem como construir mapas de interações proteicas e principalmente demonstrar quais proteínas estão relacionadas a interação patógeno-hospedeiro (Chaurand *et al.*, 2004; Grinyer *et al.*, 2005; Eubel *et al.*, 2008; Magalhaes *et al.*, 2008; Tseng *et al.*, 2008).

Com isso, por meio de diferentes técnicas de proteômica surgiu a imunoproteômica. Ultimamente, esta ferramenta vem sendo utilizada para a caracterização de antígenos expressos por organismos patogênicos (Roussel *et al.*, 2011; Kniemeyer *et al.*, 2016; Luo *et al.*, 2016; Pitarch *et al.*, 2016). Neste sentido, o termo imunoproteômica é utilizado para descrever métodos proteômicos que possibilitam a identificação de antígenos em larga escala, que podem desencadear uma resposta imune

adaptativa e que particularmente leva a produção de imunoglobulinas (Jungblut, 2001). Em alguns trabalhos, essa abordagem tem sido aplicada sucessivamente para a identificação de antígenos que podem servir como novos marcadores para diagnósticos ou prognósticos, bem como possíveis candidatos a vacinas (Lee *et al.*, 2014b).

Além disso, a imunoproteômica envolve a utilização de géis bidimensionais, *immunoblotting* e identificação de proteínas por espectrometria de massas. Esta técnica utiliza anticorpos circulantes de um hospedeiro afetado para detectar antígenos associados a moléculas específicas do patógeno. Este tipo de análise tem sido utilizado com sucesso para identificar biomarcadores para muitas doenças, incluindo candidíase sistêmica (Pitarch *et al.*, 2006) e criptococose (Jobbins *et al.*, 2010), visando também o desenvolvimento de vacinas, testes diagnósticos (Mini *et al.*, 2006), biomarcadores clínicos (Pedersen *et al.*, 2005) e análises comparativas (Shin *et al.*, 2007).

Algumas técnicas são utilizadas para estudos relacionados às análises imunoproteômicas. Uma técnica utilizada para a separação de proteínas é a eletroforese em gel bidimensional (2-DE) desenvolvida por O'Farrell (1975) e aperfeiçoada por Bjellqvist *et al.*, (1982). Atualmente, a eletroforese 2-DE é considerada a técnica mais utilizada para separação de complexos proteicos. Essa técnica possibilita gerar informações consideráveis a respeito das proteínas, tais como, determinar a massa molecular e ponto isoelétrico (pI), além de fornecer informações sobre modificações pós-traducionais, como glicosilação, fosforilação ou proteólise (Weiss e Gorg, 2007).

Outra técnica utilizada para análises imunoproteômicas é o *immunoblotting*. Esta abordagem de identificação de antígenos ganha destaque por utilizar anticorpos, tornando a técnica mais sensível. Isto favorece o reconhecimento de proteínas pouco concentradas nas amostras a serem analisadas, sem o uso de corantes específicos para sua detecção. Além disso, o *immunoblotting* identifica seletivamente proteínas do patógeno que interagem com o sistema imunológico do hospedeiro, reduzindo assim a necessidade de analisar o proteoma completo. A utilização com sucesso desta técnica requer o isolamento eficaz de proteínas, sendo sensível aos contaminantes proteicos (Herbert *et al.*, 2006).

Diferentemente da utilização de soro de pacientes para verificar a reatividade com antígenos por *western blotting*, a imunoprecipitação permite, isolar e enriquecer os antígenos em misturas solúveis a partir do soro imune/controle (Ganesan *et al.*, 2016). Nesta abordagem os anticorpos presentes no soro são ligados a microesferas contendo proteína G e posteriormente co-incubadas com lisados contendo potenciais antígenos.

Proteínas não ligadas são lavadas e as que se ligaram aos anticorpos são eluídas e recuperadas. Essas podem ser então processadas e identificadas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (*LC-MS*). Sendo assim, a utilização da imunoprecipitação se torna eficaz no isolamento dos antígenos, uma vez que não necessária a desnaturação proteica para sondagem por anticorpos (Gires *et al.*, 2004).

Para a identificação dos antígenos obtidos por *immunoblottings* ou por co-immunoprecipitação utiliza-se as análises por espectrometria de massas. A cromatografia líquida de alta resolução, em nano escala, acoplada à espectrometria de massas (*nanoUPLC-MS<sup>E</sup>*) é uma das ferramentas utilizadas para a identificação de proteínas. Esta ferramenta fornece as mais robustas análises, onde amostras complexas podem ser preparadas em um único tubo e todos os processos associados com a cromatografia, espectrometria de massas (MS e MS/MS) e processamento dos dados podem ser realizadas em poucos passos (Murad *et al.*, 2011; Murad e Rech, 2012).

Com isso, a aquisição de dados utilizando abordagens imunoproteômicas demonstram ser de grande importância, uma vez que esses podem ser empregados em diversas áreas de pesquisa, entre elas, monitoramento de resposta à terapia, quantificação de biomarcadores, diagnóstico de doenças, caracterização de vias metabólicas e na geração de alvos terapêuticos (Walsh *et al.*, 2010).

## **1.7 A imunoproteômica empregada para identificação de antígenos fúngicos**

Métodos imunoproteômicos tem sido utilizados para a identificação de moléculas antigênicas para diagnósticos e terapias de doenças causadas por organismos patogênicos. Vários organismos já tiveram seus antígenos identificados como, *A. fumigatus* (Gautam *et al.*, 2007; Virginio *et al.*, 2014), *C. albicans* (Bar *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2014b; Pitarch *et al.*, 2016), *Rhizopus oryzae* (Sircar *et al.*, 2012), *Cryptococcus gattii* (Jobbins *et al.*, 2010), *Coccidioides posadasii* (Tarcha *et al.*, 2006), *S. schenckii* (Rodrigues *et al.*, 2015) e *S. cerevisiae* (Hernandez-Haro *et al.*, 2015).

Análises imunoproteômicas foram empregadas com intuito de identificar proteínas antigênicas em *C. albicans*. Para isso, foram obtidas as proteínas intracelulares do fungo e analisadas por eletroforese 2-DE. Posteriormente, foram obtidos 20 soros de humanos, dentre esses 10 possuíam candidíase. Análises por *western blotting* também foram empregadas para verificar o perfil antigênico de *C. albicans*. A espectrometria de massas foi utilizada, onde foi possível identificar 87

proteínas que foram reativas com soro de pacientes com candidíase, sendo que 34 foram descritas como antígenos únicos e esses apresentaram forte reatividade contra anticorpos IgG. Dentre essas proteínas identificadas, foram empregadas análises *in silico* possibilitando identificar 2 antígenos distintos, a enolase e a fosfoglicerato quinase. Estas apresentaram diferenças quando sondadas por soro de pacientes com candidíase e controle. Durante o estudo, esses dois antígenos foram preditos como possíveis moléculas para o diagnóstico da doença (Pitarch *et al.*, 2016).

Estudos utilizando abordagens imunoproteômicas em *A. fumigatus* possibilitaram identificar candidatos possíveis para o diagnóstico da aspergilose invasiva (AI). Para isso, foram utilizadas técnicas para separação de proteínas (eletroforese 2-DE), *immunoblotting* (utilizando o soro de pacientes com AI) e análises por espectrometria de massas para a identificação dos antígenos. Essas análises possibilitaram a identificação de 40 proteínas antigênicas por meio de técnicas imunoproteômicas. Além disso, análises por homologia desses antígenos revelaram 2 proteínas que apresentaram baixa homologia a proteínas de humano e a outros agentes etiológicos. Com isso, foi sugerido que essas moléculas poderiam ser utilizadas para o possível diagnóstico da aspergilose (Virginio *et al.*, 2014).

Em estudos realizados com o intuito de identificar proteínas antigênicas em *Candida tropicalis*, foram empregadas estratégias proteômicas com a finalidade de identificar moléculas alvo do sistema imune do hospedeiro. Por meio dessa abordagem foi possível a identificação de 12 proteínas antigênicas de parede celular que foram reativas com anticorpos de camundongos imunizados. Dentre essas, 2 proteínas foram elegidas para o estudo, a isocitrate desidrogenase (Idh2p), descrita como antígeno em outras cepas de *Candida* e a succiniltransferase-resíduo di-hidrolipoillisina (Kgd2p), sendo esta revelada pela primeira vez como um antígeno em *Candida* spp. Por meio do sistema de expressão heteróloga essas proteínas foram produzidas em *Escherichia coli* e analisadas por *western blotting*, o que confirmou a imunogenicidade das duas moléculas em estudo. Além disso Kgd2p foi sugerida como uma proteína associada a patogênese de *C. tropicalis* e uma molécula a ser utilizada para o diagnóstico e terapia da doença (Lee *et al.*, 2014b).

*Candida parapsilosis* também teve seus antígenos identificados utilizando ferramentas imunoproteômicas. Para isso, proteínas da parede celular foram obtidas e separadas por eletroforese 2-DE, seguida por análises de *western blotting* utilizando soro de camundongos infectados. Trinta e dois *spots* apresentaram reatividade com o

soro imune e estes foram submetidos a análises por espectrometria de massas, dentre esses, foram identificados 12 antígenos distintos. Onze eram antígenos descritos em *C. albicans*, enquanto que Idh2p foi identificada pela primeira vez como uma proteína imunogênica nessa espécie de *Candida*. Essa proteína foi produzida por meio do sistema de expressão heteróloga e posteriormente analisada por *immunoblotting*, confirmando a sua antigenicidade. Esta molécula foi considerada como um novo candidato a biomarcador para o diagnóstico ou produção de vacinas para a doença (Lee *et al.*, 2014a).

Análises proteômicas também foram empregadas para identificação de alérgenos em *R. oryzae*. Neste estudo foi realizado *immunoblotting*, onde foi utilizada a IgE de soro imune de humanos para revelar as bandas imunorreativas. A banda de reatividade principal apresentou tamanho molecular de 44 kDa, sendo identificada em todos os *immunoblottings*. Para a identificação desses alérgenos, o extrato proteico foi fracionado por eletroforese 2-DE e as respectivas bandas foram retiradas, digeridas e submetidas a espectrometria de massas, onde a maioria das moléculas identificadas foram glicoproteínas. Também foram empregadas ferramentas de bioinformática para predizer quais antígenos apresentavam peptídeo sinal para secreção e predizer a localização subcelular desses alérgenos. A principal proteína identificada durante esse estudo foi a aspartil endopeptidase. Análises *in silico* dessa proteína possibilitou predizer a sua imunogenicidade e foi sugerida como um alérgeno putativo (Sircar *et al.*, 2012).

Em estudos realizados em *C. gattii* foram empregadas estratégias proteômicas para elucidar quais moléculas do fungo eram antigênicas. Inicialmente a cápsula polissacarídica de *C. gattii* foi removida e as proteínas citoplasmáticas do fungo foram obtidas e separadas em eletroforese 2-DE. Análises por *western blotting* também foram empregadas, onde foram identificados 53 distintos *spots* de proteínas reativas com soro de animais imunizados. De 53 *spots*, 48 foram identificados por *LC-MS/MS* e 37 foram identificados como antígenos únicos. Dentre essas, foram identificadas proteínas envolvidas na respiração celular, metabolismo de aminoácidos, regulação do ciclo celular, biossíntese da parede celular, bem como a identificação de fatores de virulência e alvos da resposta imune já descritos em *Cryptococcus* spp.. Neste estudo, o grupo de antígenos que apresentou maior relevância foi o sistema da tioredoxina, sendo esse considerado de grande importância na patogênese da criptococose (Jobbins *et al.*, 2010).

*S. cerevisiae* também teve seus antígenos identificados por meio de técnicas imunoproteômicas. Esse estudo foi realizado com intuito de identificar biomarcadores

da infecção pelo fungo. Para isso, foram comparadas as respostas imunológicas que foram desencadeadas durante a infecção sistêmica em camundongos por cepas virulentas de *S. cerevisiae* (D14) isoladas de suplementos dietéticos e cepas avirulentas (W303). As amostras de ambas as espécies foram fracionadas por eletroforese 2-DE, seguido por análises de *western blotting*, o que revelou diferenças nos perfis de proteínas antigênicas entre as espécies. Análises por espectrometria de massas também foram empregadas, o que levou a identificação de 36 proteínas antigênicas, sendo que grande parte delas estavam envolvidas em vias metabólicas e resposta ao estresse. Também foram realizados ensaios de reatividade cruzada, onde algumas proteínas foram sondadas por anticorpos proveniente de animais infectados com *C. albicans* e *C. glabrata*. Um total de 8 proteínas não apresentaram reatividade cruzada durante as análises, sendo que as proteínas relacionadas ao estresse oxidativo como Ahp1, Yhb1, Oye2 e Gln1 e Kes1 foram considerados candidatos ideais para testes como biomarcadores para o diagnóstico da doença (Hernandez-Haro *et al.*, 2015).

Com isso, a imunoproteômica é considerada uma ferramenta poderosa para identificação de antígenos e tem sido utilizada com sucesso para verificar a resposta de anticorpos a antígenos fúngicos, possibilitando assim a identificação de possíveis candidatos a biomarcadores, análise de perfis de reatividade, bem como caracterizar moléculas com potencial para diagnóstico (Pitarch *et al.*, 2016).

## 1.8 Bioinformática

O DNA (ácido desoxirribonucleico) foi inicialmente identificado por Friedrich Miescher em 1896, o qual, o mesmo denominou como um tipo de ácido fraco, sendo abundante em núcleos de células brancas (Hartl e Jones, 2004). Porém, a função biológica dessa molécula permaneceu desconhecida por muitos anos. Após muitos estudos envolvendo pesquisadores de diversas áreas, chegou-se a conclusão que essa molécula estava relacionada ao armazenamento da informação genética. Somente no ano de 1953, os pesquisadores Francis Crick e James Watson fizeram a primeira proposta aceitável da estrutura tridimensional da molécula de DNA. Em seguida, novos métodos de sequenciamento foram criados, envolvendo o pesquisador Frederick Sanger, que fez o sequenciamento da molécula DNA. Métodos de sequenciamento do DNA também foram desenvolvidos pelos pesquisadores Allan Maxam e Walter Gilbert entre os anos de 1976–1977 (Lesk, 2008).

Com os avanços em análises de genes, foi realizado o Projeto Genoma Humano, tendo como principal objetivo, mapear o genes humanos e com isso fazer a identificação de todos os nucleotídeos que o compõem. No mesmo período, a utilização dos sequenciadores automáticos de DNA começaram a aumentar consideravelmente. Isso contribuiu para um mapeamento de sequencias genicas de diversos organismos, gerando uma quantidade elevada de dados a serem analisados e conseqüentemente, maior necessidade de recursos computacionais (Prosdocimi *et al.*, 2002). Logo, essa enorme quantidade de dados precisava ser organizada, decifrada e analisada para se obter informações relevantes a respeito dos processos biológicos em uma célula. Dessa forma, a utilização da informática contribuiu neste campo, não apenas com os processos de armazenamentos rápidos e de alta qualidade, mas também no desenvolvimento de programas avançados/acessíveis para análises dessas informações obtidas. Com isso surgiu um novo campo de estudo, onde foi realizada a união das ciências computacionais, exatas e a biológicas, sendo denominada de bioinformática (Lesk, 2008).

Nesse campo de estudo (bioinformática), essas análises têm sido utilizadas como uma tecnologia capaz de contribuir de forma significativa na investigação de dados biológicos. Vários projetos da área têm concentrado seus esforços nesse sentido, viabilizando a execução e gestão dos dados através da internet (Cavalcanti *et al.*, 2005). Como referências dessas tendências, temos os softwares e bancos de dados oferecidos por grandes institutos de pesquisa, como : *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e *European Bioinformatics Institute* (EBI), (Curcin *et al.*, 2005). Com isso, ferramentas/software de bioinformática vem sendo desenvolvidos com o objetivo de realizar uma infinidade de funções, como por exemplo: Análises de antígenos, predição de genes, domínios e homologias, rastreamento de sequências repetitivas e até mesmo polimorfismos gênicos (Duran *et al.*, 2009).

Além disso, os avanços na criação e manutenção de softwares de predição de epítomos (imunoinformática) visam identificar moléculas que apresentem sequencias imunogênicas e antigênicas. De certa forma, essas moléculas apresentam a capacidade de se ligar especificamente aos anticorpos ou induzir resposta imune. Assim, avanços nas áreas de estudos de antígenos fornecem aos bancos de dados informações sobre moléculas antigênicas/imunogênicas confirmadas experimentalmente, auxiliando no desenvolvimento das ferramentas de análise de predição, os quais são cruciais para o

desenvolvimento de novas vacinas e síntese de novos testes diagnósticos (Zhang *et al.*, 2008).

## 2 JUSTIFICATIVA

---

O gênero *Paracoccidioides* é composto por fungos patogênicos termodimórficos agentes da Paracoccidioidomicose (PCM), uma micose sistêmica endêmica na América Latina. A PCM está confinada em países como Argentina, Colômbia, Venezuela e, especialmente no Brasil, apresentando o maior índice de morte entre as micoses sistêmicas não associadas à AIDS e considerada a oitava causa de morte por doenças predominantemente crônicas (infecciosas e parasitárias).

As infecções fúngicas contribuem significativamente para a mortalidade e a morbidade humana. Estima-se que em regiões endêmicas, aproximadamente 10 milhões de indivíduos estejam infectados com *Paracoccidioides* sp., contudo, grande parte não apresenta sintomas clínicos. Apesar disso, o investimento em pesquisas, tratamentos e diagnósticos de doenças fúngicas é pequeno quando comparado ao investimento em outras doenças infecciosas.

Em alguns casos, lesões nas mucosas orais e cutâneas ocasionadas por outros patógenos podem coincidir muitas vezes com as lesões provocadas pela doença ocasionada por *Paracoccidioides* spp.. Além disso, mesmo com os avanços na utilização de antígenos em testes diagnósticos para a PCM, estudos ainda apontam para o fato de que pacientes com outras doenças como, histoplasmose, aspergilose e leishmaniose apresentarem resultados falso-positivos para a PCM. No entanto, determinar qual espécie do fungo é o agente etiológico da doença, ainda é uma abordagem limitada a alguns centros de pesquisa, o que restringe mais ainda as investigações epidemiológicas da doença. Sendo assim, esses fatos demonstram a necessidade de identificação de antígenos específicos de espécies de *Paracoccidioides*.

Atualmente, as espécies que compõem o complexo *Paracoccidioides* ainda não apresentam caracterização de seus antígenos secretados (exoantígenos) em larga escala. Neste sentido, a identificação de novas moléculas candidatas ao diagnóstico da PCM contribuirá para o desenvolvimento de novos testes diagnósticos específicos para a doença, auxiliando no direcionamento correto para a terapia medicamentosa da doença.

## 3 OBJETIVOS

---

### 3.1 Objetivo geral

Identificar e caracterizar os antígenos secretados (exoantígenos) de 4 espécies do complexo *Paracoccidioides* (*P. lutzii*, *P. americana*, *P. brasiliensis* e *P. restrepiensis*).

### 3.2 Objetivos específicos

3.2.1. Obter e confirmar a pureza dos secretomas obtidos por espécies de *Paracoccidioides* (*P. lutzii*, *P. americana*, *P. brasiliensis* e *P. restrepiensis*), por meio de análises de biologia molecular e proteômicas;

3.2.2. Produzir e coletar anticorpos policlonais contra os secretomas obtidos das espécies de *Paracoccidioides*;

3.2.3. Caracterizar o perfil antigênico das espécies de *Paracoccidioides* estudadas;

3.2.4. Purificar e obter os exoantígenos das espécies de *Paracoccidioides*, por meio de co-immunoprecipitação;

3.2.5. Identificar os exoantígenos de *Paracoccidioides* spp. através de *nanoUPLC-MS<sup>E</sup>*;

3.2.6. Analisar os exoantígenos por bioinformática em busca de caracterizar epítomos exclusivos do complexo *Paracoccidioides* e selecionar moléculas candidatas ao diagnóstico comum e/ou diferencial da PCM.

## 4 RESULTADOS

---

### **Artigo – Immunoproteomic approach of extracellular antigens from *Paracoccidioides* species reveals exclusive B-cell epitopes**

André Luís Elias Moreira<sup>1</sup>, Milton Adriano Pelli Oliveira<sup>2</sup>, Lana O’Hara Souza Silva<sup>1</sup>, Moisés Morais Inácio<sup>1</sup>, Alexandre Melo Bailão<sup>1</sup>, Juliana Alves Parente-Rocha<sup>1</sup>, Vanessa Rafaela Milhomem Cruz-Leite<sup>1</sup>, Juliano Domiraci Paccez<sup>1</sup>, Célia Maria de Almeida Soares<sup>1</sup>, Simone Schneider Weber<sup>3,4</sup> and Clayton Luiz Borges<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brazil;

<sup>2</sup> Laboratório de Citocinas, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brazil;

<sup>3</sup> Laboratório de Biociência, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brazil;

<sup>4</sup> Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Itacoatiara, Brazil.

**Revista:** *Frontiers in Microbiology* (fator de impacto: 4.259)

**Submetido:** 20 de Agosto de 2019

**Aceito:** 09 de Dezembro de 2019

**Publicado:** 28 de Janeiro de 2020



# Immunoproteomic Approach of Extracellular Antigens From *Paracoccidioides* Species Reveals Exclusive B-Cell Epitopes

André Luís Elias Moreira<sup>1</sup>, Milton Adriano Pelli Oliveira<sup>2</sup>, Lana O'Hara Souza Silva<sup>1</sup>, Moisés Morais Inácio<sup>1</sup>, Alexandre Melo Bailão<sup>1</sup>, Juliana Alves Parente-Rocha<sup>1</sup>, Vanessa Rafaela Milhomem Cruz-Leite<sup>1</sup>, Juliano Domiraci Pაცეზ<sup>1</sup>, Célia Maria de Almeida Soares<sup>1</sup>, Simone Schneider Weber<sup>3,4</sup> and Clayton Luiz Borges<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brazil,

<sup>2</sup> Laboratório de Citocinas, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brazil,

<sup>3</sup> Laboratório de Biotecnologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brazil, <sup>4</sup> Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Itacoatiara, Brazil

## OPEN ACCESS

### Edited by:

José Roberto Mineo,  
Federal University of Uberlândia, Brazil

### Reviewed by:

Haroldo Oliveira,  
Carlos Chagas Institute (ICC), Brazil  
Marisa Mariel Fernandez,  
Institute of Studies on Humoral  
Immunity (IDEHU), Argentina

### \*Correspondence:

Clayton Luiz Borges  
clayton@ufg.br;  
clbluiz2@gmail.com

### Specialty section:

This article was submitted to  
Microbial Immunology,  
a section of the journal  
Frontiers in Microbiology

**Received:** 20 August 2019

**Accepted:** 09 December 2019

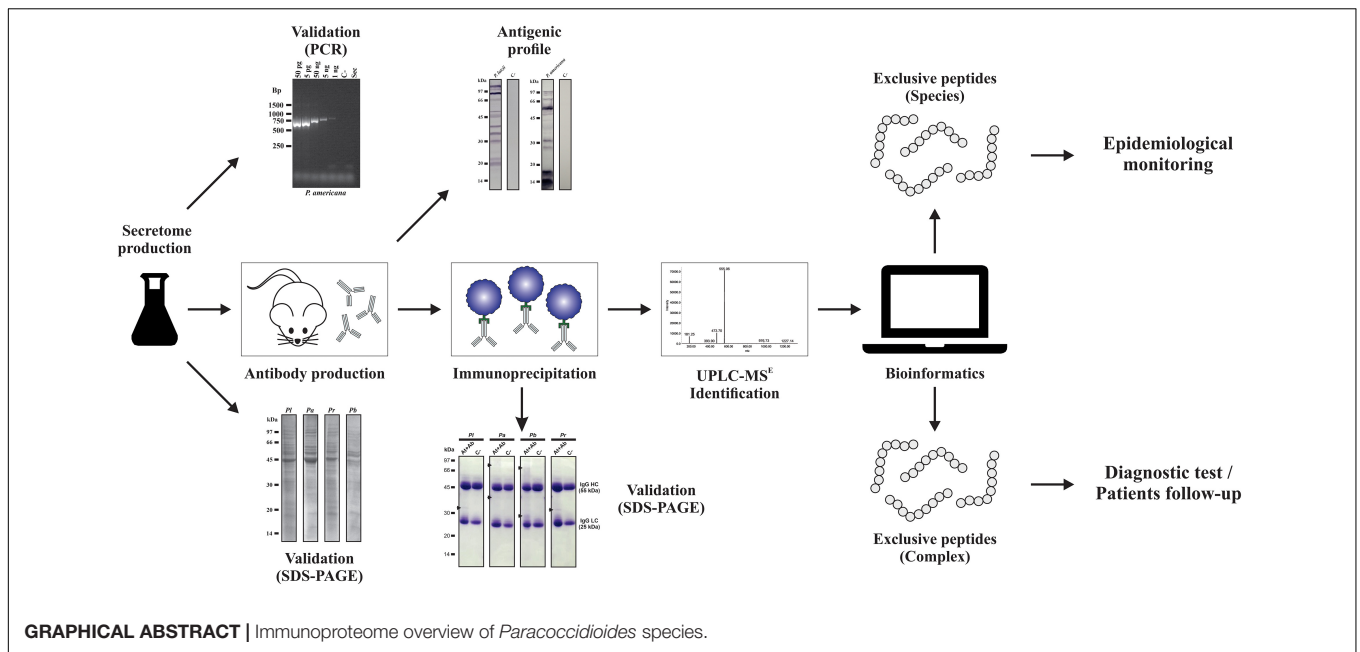
**Published:** 28 January 2020

### Citation:

Moreira ALE, Oliveira MAP,  
Silva LOS, Inácio MM, Bailão AM,  
Parente-Rocha JA, Cruz-Leite VRM,  
Pაცეზ JD, de Almeida Soares CM,  
Weber SS and Borges CL (2020)  
Immunoproteomic Approach  
of Extracellular Antigens From  
*Paracoccidioides* Species Reveals  
Exclusive B-Cell Epitopes.  
*Front. Microbiol.* 10:2968.  
doi: 10.3389/fmicb.2019.02968

Fungi of the *Paracoccidioides* genus are the etiological agents of paracoccidioidomycosis (PCM), a systemic mycosis restricted to the countries of Latin America. Currently, the *Paracoccidioides* complex is represented by *Paracoccidioides lutzii*, *Paracoccidioides americana*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Paracoccidioides restrepiensis*, and *Paracoccidioides venezuelensis*. Even with advances in techniques used for diagnosing fungal diseases, high rates of false-positive results for PCM are still presented. Additionally, there is no efficient antigen that can be used to follow up the efficiency of patient treatment. The immunoproteomic is considered a powerful tool for the identification of antigens. In addition, antigens are molecules recognized by the immune system, which make them excellent targets for diagnostic testing of diseases caused by microorganisms. In this vein, we investigated which antigens are secreted by species representing *Paracoccidioides* complex to increase the spectrum of molecules that could be used for future diagnostic tests, patient follow-up, or PCM therapy. To identify the profile of antigens secreted by *Paracoccidioides* spp., immunoproteomic approaches were used combining immunoprecipitation, followed by antigen identification by nanoUPLC-MS<sup>E</sup>-based proteomics. Consequently, it was possible to verify differences in the exoantigen profiles present among the studied species. Through a mass spectrometry approach, it was possible to identify 79 exoantigens in *Paracoccidioides* species. Using bioinformatics tools, two unique exoantigens in *P. lutzii* species were identified, as well as 44 epitopes exclusive to the *Paracoccidioides* complex and 12 unique antigenic sequences that can differentiate between *Paracoccidioides* species. Therefore, these results demonstrate that *Paracoccidioides* species have a range of B-cell epitopes exclusive to the complex as well as specific to each *Paracoccidioides* species. In addition, these analyses allowed us the identification of excellent biomarker candidates for epidemiology screening, diagnosis, patient follow-up, as well as new candidates for PCM therapy.

**Keywords:** *Paracoccidioides* spp., antigens secreted, epitopes, diagnostic, mass spectrometry



## INTRODUCTION

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis restricted to the countries of central and south America and is considered one of the most important endemic mycoses in this region, especially in Brazil (Restrepo et al., 2001). The disease is caused by the fungal species that occupy the genus *Paracoccidioides*: *Paracoccidioides brasiliensis*, *Paracoccidioides lutzii*, *Paracoccidioides americana*, *Paracoccidioides restrepiensis*, and *Paracoccidioides venezuelensis* (Teixeira et al., 2009; Munoz et al., 2016; Turissini et al., 2017).

In the environment, *Paracoccidioides* spp. develop as filamentous structures (hyphae) and when under stress conditions and/or lack of nutrients, the hyphae can produce infectious propagules called conidia. PCM is acquired when an individual inhales conidia or fragments of hyphae that may reach the pulmonary alveoli, giving rise to the yeast form of the fungus, which is considered the parasitic form of *Paracoccidioides* (Wanke and Londero, 1994; Lacaz et al., 2002). Thus, *Paracoccidioides* spp. are characterized as dimorphic and thermally dependent fungi, presenting a saprobiotic mycelial phase and a parasitic yeast phase (Teixeira et al., 2014). Due to these characteristics, when found in ambient or cultured conditions *in vitro*, where temperatures vary around 22–27°C, *Paracoccidioides* spp. grow as mycelium. When the mycelia or conidia are housed in the tissues of the host or incubated *in vitro* at around 36°C, the dimorphic transition to the yeast phase occurs (McEwen et al., 1987; Franco et al., 1989; Brummer et al., 1993; Queiroz-Telles, 1994; Teixeira et al., 2009).

The development of PCM can occur immediately after contact with the fungus or can take years to be triggered. PCM can manifest itself in two clinical forms: acute/subacute (juvenile) and chronic (adult form) (Morejon et al., 2009). The acute and subacute forms of PCM account for 5–25% of cases, being

observed in some states of Brazil, such as Maranhão, Goiás, Minas Gerais, Pará, and São Paulo. The chronic form presents in most cases, with a prevalence of 74–96%, manifesting mainly in male adults working in agricultural areas, aged between 30 and 60 years old. The male sex is usually more affected, with a rate of 22 men for every woman (Mendes, 1994; Costa et al., 2013). On the other hand, some patients present clinical manifestations compatible with the acute or subacute form, associated with other clinical manifestations generally observed in the chronic form, making the classification doubtful. In general, these patients demonstrate a very widespread disease with intense suppression of cellular immunity, which is referred to as mixed PCM form. In addition, PCM is a systemic disease whose host response to the infecting agent consists of a chronic granulomatous inflammatory process, which can progress to a fibrous process, characterized as anatomical and functional sequelae in the affected organs, particularly in the lungs (Shikanai-Yasuda et al., 2017, 2018).

Notification of PCM's cases is not compulsory, and consequently, epidemiological approaches to PCM present certain obstacles. Among these obstacles are the difficulties in recognizing the infection acquired by *Paracoccidioides* species due to the poor capacity of laboratorial diagnosis in endemic areas. These issues lead to the low amount of PCM's epidemic data, which are obtained from hospital records, epidemiological research reports, case series, and mortality data (Martinez, 2015, 2017). Based on data obtained from care services for PCM patients, the incidence of the disease in endemic areas ranges from one to three cases per 100,000 inhabitants and three to four new cases per 1,000,000 inhabitants per year (Lacaz et al., 2002; Martinez, 2015).

For the diagnosis of PCM, biological materials, such as sputum, biopsy of injured tissues, material from lymph nodes, mucous membranes, and urine can be used, which

can be analyzed by optical microscopy. For a long time, immunodiagnosis was not recommended for specific diagnosis of the disease as it presented low specificity, being more commonly indicated for patient follow-up (Shikanai-Yasuda et al., 2006). Despite that, in the *Paracoccidioides*'s literature, there is a robust number of studies that have contributed to the improvement of PCM immunodiagnosis, with the development of serological tests that present high sensitivity and specificity (that reached 90–100%), as revised by Zancoppe-Oliveira et al. (2014). Even with these advances, the latest “Brazilian Guidelines for the Clinical Management of Paracoccidioidomycosis” still points to the fact that patients with histoplasmosis, aspergillosis, and leishmaniasis may have false-positive results for PCM. Additionally, determining which species of *Paracoccidioides* is the causative agent of the disease is still a restricted approach to some research centers, which limits the expansion of disease epidemiological data (Shikanai-Yasuda et al., 2017). Altogether, these facts point to the need for determination of specific *Paracoccidioides* antigens, for which the immunoproteomics approach is of great value.

The immunoproteomic is considered a powerful tool for the identification of antigens and has been used successfully to verify the response of antibodies to fungal antigens, enabling the identification of possible biomarkers, reactivity profile analysis, as well as characterizing molecules with potential for diagnosis, as demonstrated for several fungal pathogens such as *Aspergillus fumigatus* (Gautam et al., 2007; Virginio et al., 2014), *Candida albicans* (Bar et al., 2012; Lee et al., 2014; Pitarch et al., 2016), *Rhizopus oryzae* (Sircar et al., 2012), *Cryptococcus gattii* (Jobbins et al., 2010), *Coccidioides posadasii* (Tarcha et al., 2006), and *Sporothrix schenckii* (Rodrigues et al., 2015).

To determine specific antigens of *Paracoccidioides* spp., we employed the immunoproteomics approach for identification and characterization of secreted antigens (exoantigens) by representative species of the *Paracoccidioides* complex. With this, it was possible to verify differences in the exoantigen profiles among the species used in this study. Through mass spectrometry tools, it was possible to identify 79 antigens secreted by isolates of *Paracoccidioides*. In addition, bioinformatics tools were used to analyze which antigens are secreted by alternative or classic pathways, as well as which antigenic epitopes are present in these molecules. In addition, we identified which molecules are shared among the isolates under study and which molecules are unique to each representative of the *Paracoccidioides* complex. These results demonstrate that *Paracoccidioides* spp. have several proteins that can be recognized by the human immune system. In addition, these analyses allowed us the identification of new possible molecules for PCM diagnosis, patient follow-ups, and therapy.

## MATERIALS AND METHODS

### Culture and Maintenance of Microorganisms

Isolates from the *Paracoccidioides* complex, *Pb01* (*P. lutzii*), *Pb02* (*P. americana*), *Pb18* (*P. brasiliensis*), and *PbEpm83*

(*P. restrepiensis*), were used in this study. The *P. venezuelensis* species was not used during the study because it belongs to a monophyletic population restricted to Venezuela and cases of the disease caused by this species in other regions of Latin America have not been described (Theodoro et al., 2012; Turissini et al., 2017). The yeast phase was maintained *in vitro* at 36°C in a Fava Netto's semisolid medium for 72 h (Fava-Netto, 1955). The components of the Fava Netto's culture medium were 0.5% (w/v) yeast extract, 1% (w/v) peptone, 0.5% (w/v) meat extract, 0.3% (w/v) proteose-peptone, 0.5% (w/v) NaCl, 4% (w/v) glucose, 1% (w/v) agar, pH 7.2.

### Production of Extracellular Extracts

Yeasts of each *Paracoccidioides* spp. were transferred to the Fava Netto's liquid medium and maintained at 36°C under agitation at 120 rpm for 96 h. After this period, cells were washed in phosphate buffered saline (PBS) and counted in Neubauer's chamber, and the viability was measured using Trypan blue dye. For inoculum,  $5 \times 10^6$  viable cells/ml were used in liquid medium McVeigh-Morton (MMcM) (Restrepo and Jimenez, 1980) and incubated at 120 rpm for 24 h at 36°C. After incubation, the cells were centrifuged at  $2,000 \times g$  for 20 min. The supernatant obtained after centrifugation was subjected to vacuum filtration on 0.22- $\mu$ m membranes (Millipore, United States). The filtered samples were concentrated using a 10-kDa ultrafiltration system (Amicon®, Millipore, United States) and then washed three times with PBS (Weber et al., 2012). The quantification of extracellular extracts was determined by the Bradford method (Bradford, 1976).

### Cell Lysis Detection Assay Using Polymerase Chain Reaction (PCR)

The genomic DNA of the isolates was obtained according to the protocol described by Sambrook and Russell (2001). For the PCR reactions, the supernatant of sample secretomes (2  $\mu$ l) and the genomic DNA obtained were used. The reactions were performed in 40 cycles of 94°C for 30 s, 55°C for 30 s, and 72°C for 2 min. The 681 base pair PCR products were generated using oligonucleotides (sense 5'-GACATGCGTGATATCGACTTG-3' and antisense 5'-GTGCGCCATGCCATTCT-3') for the formamidase coding gene (GenBank accession number AY163575). PCR amplicons were detected by 1% (w/v) agarose gel electrophoresis using the GelRed intercalating agent (Biotium™, United States). To verify the sensitivity of PCR, a genomic DNA curve containing five dilutions (50 ng, 5 ng, 50 pg, 5 pg, and 1 pg) was constructed for each *Paracoccidioides* species, as described by Weber et al. (2012).

### One-Dimensional Gel Electrophoresis (1-D SDS-PAGE)

The integrity of the extracellular extracts was verified by 1-D SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Thirty micrograms of extracellular extracts from each isolate were prepared with sample buffer [0.2 M Tris-HCl, pH 6.8, 40% (w/v) SDS, 2% (w/v)  $\beta$ -mercaptoethanol, and bromophenol blue traces] and heated in the thermoblock at 100°C for 10 min. Subsequently, the samples

were submitted to 12% 1-D SDS-PAGE. As reference, the low-molecular-weight marker (GE Healthcare, United Kingdom) was used. Soon after this step, the gels were stained by Coomassie Blue. ImageQuant 300 (GE Healthcare, United Kingdom) was used to obtain the images.

## Production of Polyclonal Antibodies

Balb/c mice from 8 to 12 weeks old were provided by bioterium of the Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, da Universidade Federal de Goiás (IPTSP-UFG). The animals were handled according to Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA-MCTIC) and submitted to the Ethics Committee of Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFG) under the registry number 030/2016. Four groups containing five animals each were immunized with extracellular extract samples to induce the production of polyclonal antibodies. Separately, each group was immunized using proteins secreted by *P. lutzii*, *P. americana*, *P. brasiliensis*, and *P. restrepiensis*. For the immunizations, 50 µg of extracellular extracts were used in three doses with intervals of 15 days using the complete Freund's adjuvant (Sigma-Aldrich, United States) for the first dose and the incomplete Freund's adjuvant (Sigma-Aldrich, United States) for the second and third immunizations. The negative control was obtained from immunized mice only with Freund's adjuvant as previously described. After the immunizations, the animals were euthanized, and the whole blood of the animals was collected. Whole blood was incubated at 37°C for 10 min, 4°C for 10 min, and centrifuged at 500 × g for 10 min. After centrifugation, the immunized sera containing the polyclonal antibodies were collected.

## Immunoblotting Analysis

Immunoblotting was performed as described by de Oliveira et al. (2018) with some modifications. The extracellular extract samples (30 µg) were submitted to 1-D SDS-PAGE at 12% with subsequent transfer to nitrocellulose membranes. The primary antibodies (1:500) were incubated for 2 h, and the secondary antibody (1:20,000) (alkaline phosphatase-labeled mouse anti-IgG; Sigma-Aldrich, United Kingdom) was incubated for 2 h. The membranes were then washed twice with PBS and once with alkaline phosphatase buffer for 15 min. The chromogenic substrate solution for alkaline phosphatase containing BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) and NBT (tetrazolium-nitroblue chloride) (Sigma-Aldrich, United Kingdom) was used.

## Coupling of IgG to Protein G-Sepharose and Immunoprecipitation

Protein G-Sepharose® 4B resin (Invitrogen, United States) was used for affinity chromatography. The resin was washed three times with PBS and 1.5 ml of immunized or control serum at a concentration of 1.5 µg/µl. The resin was subsequently added to the affinity columns, incubated at 4°C for 30 min to promote the binding of the antibodies to protein G, which is covalently linked to Sepharose beads. After ligation, the columns

were washed three times with PBS. Then, 1.5 mg extracellular extracts from each *Paracoccidioides* species were added to the columns, maintained for 16 h at 4°C for the antigen-antibody binding. Afterward, the columns were washed three times using PBS, then the elution solution buffer [glycine 0.1 M, 0.02% sodium azide (w/v), pH 2.6] was added and incubated for 10 min. Subsequently, the supernatants containing antigens were obtained. The experimental procedure of immunoprecipitation is summarized in **Supplementary Figure S1**.

## Tryptic Digestion of Exoantigens

Antigens of the *Paracoccidioides* species obtained by immunoprecipitation were subjected to tryptic digestion. Briefly, 10 µl of 50 mM ammonium bicarbonate pH 8.5 were added to 50 µg of the protein extracts and subsequently subjected to tryptic digestion as previously described (Murad and Rech, 2012; Bailao et al., 2014; de Curcio et al., 2017; de Oliveira et al., 2018). Then, 25 µl of 0.2% (w/v) RapiGest SF™ surfactant (Waters Corporation, United Kingdom) was added to the protein extracts and vortexed with subsequent incubation at 80°C for 15 min. After this incubation, 2.5 µl of 100 mM dithiothreitol (GE Healthcare, United States) was added and incubated at 60°C for 30 min. Then, 2.5 µl of 300 mM iodoacetamide (GE Healthcare, United States) was added and maintained at room temperature for 30 min. Subsequently, 10 µl of 50 mM trypsin (Promega, United States) solution was added and incubated for 16 h at 37°C. To precipitate the RapiGest SF™, 10 µl of 5% trifluoroacetic acid (Sigma-Aldrich, United Kingdom) was added and incubated for 90 min at 37°C. The samples were centrifuged at 20,000 × g for 30 min at 6°C, and the supernatants were collected. The supernatants were dried by using speed vacuum (Eppendorf, GER). All peptides obtained were resuspended in 80 µl of a solution containing 20 mM ammonium formate and Fosforilase MassPREP™ Digestion Standard (100 fmol/µl for *PbEpm83*, 400 fmol/µl for *Pb01*, 100 fmol/µl for *Pb02*, and 100 fmol/µl for *Pb18*) as the endogenous standard.

## NanoUPLC-MS<sup>E</sup> Analysis

After tryptic digestion of the purified exoantigens, the samples were submitted to nanoUPLC-MS<sup>E</sup>. For the chromatographic analyses of peptides, the nanoACQUITY™ M-Class system (Waters Corporation, United Kingdom) was used. For the first dimension, the fragmentation of peptides was performed through a 5-µm UPLC M-Class Peptide BEH C18, 130 Å (300 µm × 50 mm; Waters Corporation, Milford, MA, United States). The fragmented peptides were then submitted to five different acetonitrile/0.1% (v/v) formic acid concentrations (F1, 11.4%; F2, 14.7%; F3, 17.4%; F4, 20.7%; and F5, 50%). Each fraction eluted was trapped in a 5-µm Acquity UPLC M-Class Symmetry C18 Trap Column, 100 Å (180 µm × 20 mm; Waters Corporation, Milford, MA, United States). For the second dimension, for the separation of peptides, an Acquity UPLC M-Class HSS T3 1.8 µm (75 µm × 150 mm) Analytical Column was used. For mass calibration, a solution of 200 fmol/µl of the precursor ion [Glu1]-Fibronopeptide B human (m/z 785.8426) (GFP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, United States) was used with a constant flow of 0.5 µl/min, and it was measured every

30 s. The eluted peptides were analyzed by Synapt G1 HDMS<sup>TM</sup> (Waters Corporation, United Kingdom) mass spectrometer. This device is equipped with nano-electrospray ion source and two mass analyzers, one quadrupole and one time-of-flight (Q-TOF) called nanoESI-Q-TOF (Waters Corporation, United Kingdom). This equipment operates in MS<sup>E</sup> mode, alternating at 6 V (low power) and 40 V (high power) in each acquisition mode (0.4 s). Three biological replicates were performed for *P. lutzii* (Pb01), *P. americana* (Pb02), *P. brasiliensis* (Pb18), and *P. restrepiensis* (PbEmp83) samples.

## Immunoproteomic NanoUPLC-MS<sup>E</sup> Data Processing

After nanoUPLC-MS<sup>E</sup> acquisition, the data processing was performed by using Protein Lynx Global Server version 3.0.2 software (Waters Corporation, United Kingdom). The obtained spectra were compared with sequences deposited in the database of Pb01 (*P. lutzii*), Pb03 (*P. americana*), Pb18 (*P. brasiliensis*), and PbCnh (*P. restrepiensis*)<sup>1</sup> to identify the peptides.

## Bioinformatics Analyses

After data processing and protein identification, the identified proteins were subjected to *in silico* analyses. The identified proteins were functionally categorized based on UniProt<sup>2</sup> database. To predict the subcellular localization of the secreted antigens, WoLF PSORT software<sup>3</sup> was employed. ExPasy software<sup>4</sup> was used for isoelectric point prediction. For the prediction of proteins secreted by classical and non-classical pathways, SignalP 4.1<sup>5</sup> and SecretomeP 2.0<sup>6</sup> were, respectively, used. Regarding SignalP and SecretomeP software, values greater than or equal to 0.5 were considered indicative of secretion. For prediction of linear B-cell epitopes, we used the software BCPREDS<sup>7</sup> and ABCpred<sup>8</sup>.

To analyze and generate the Venn diagram, we used OrthoVenn software<sup>9</sup> and Draw Venn Diagram<sup>10</sup>. BLASTp (Basic Local Alignment Search Tool) software<sup>11</sup> and ClustalX 2.0 and R software<sup>12</sup> were used for the homology analysis of the identified exoantigens and heat map generation, respectively. ProtScale software<sup>13</sup> was used for prediction of hydrophilic peptides. The three-dimensional (3-D) modeling of the peptides was performed using I-Tasser<sup>14</sup> and the figures were visualized by using PyMol version 2.3 software<sup>15</sup>. To verify energy minimization and total

structural refinement of 3-D models, the GalaxyWEB<sup>16</sup> and ModRefiner<sup>17</sup> servers were used.

## RESULTS

### Monitoring of *Paracoccidioides* Species Cell Integrity Based on PCR Analysis

To verify if cell lysis would influence the profile of proteins secreted by the *P. lutzii* (Pb01), *P. americana* (Pb02), *P. brasiliensis* (Pb18), and *P. restrepiensis* (PbEpm83) species, the PCR technique was used, as described by Weber et al. (2012), with some modifications.

The formamidase gene of *Paracoccidioides* species was analyzed. The sensitivity of the technique was attested to by constructing a standard curve using genomic DNA (samples from 50-ng to 1-pg dilutions) and primers to formamidase gene, generating a 681 base pair amplicon, which was evaluated by agarose gel electrophoresis.

These results demonstrate that this assay was able to amplify extremely low amounts of genomic DNA (1 pg); nevertheless, no amplifications were detected in the supernatant of secretome samples of the isolates under study (Supplementary Figure S2). It was possible to observe that the extracellular extracts did not present PCR-detectable contamination and, accordingly, there are no detectable contaminants from the intracellular compartment since the gene that encodes the formamidase was not amplified in the samples analyzed during the PCR tests (Supplementary Figure S2). This demonstrates that even in the case of any cell lysis, it was undetectable by PCR and thus cannot influence the profile of samples during the proteomics analyses.

### Profile of Extracellular Extracts Evaluated by 1-D SDS-PAGE

Extracellular extracts of *P. lutzii*, *P. americana*, *P. brasiliensis*, and *P. restrepiensis* were analyzed by 12% 1-D SDS-PAGE. After separation, the proteins of isolates depicted a molecular mass distribution between 103 and 16 kDa (Supplementary Figure S3).

High abundance of extracellular protein species by *P. lutzii*, *P. Americana*, and *P. restrepiensis* species was found in the 45-kDa range, demonstrating that the profile of the secreted proteins between the analyzed species presented some similarities (Supplementary Figure S3). Among these, the one with the highest abundance of proteins in the 45-kDa range was the *P. americana* species. The *P. brasiliensis* species did not present high expression of these proteins in the 45-kDa range (Supplementary Figure S3).

### Exoantigen Profiles Assayed by Immunoblotting

Analyses were performed with the objective of obtaining the profile of exoantigens of *Paracoccidioides* species. For

<sup>1</sup> [http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides\\_brasiliensis/Multihome.html](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/Multihome.html)

<sup>2</sup> <http://www.uniprot.org/>

<sup>3</sup> <http://wolfsort.hgc.jp/>

<sup>4</sup> [https://web.expasy.org/compute\\_pi/](https://web.expasy.org/compute_pi/)

<sup>5</sup> <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>

<sup>6</sup> <http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>

<sup>7</sup> <http://omictools.com/bcpreds-tool>

<sup>8</sup> <http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/>

<sup>9</sup> [www.bioinfogenome.net/OrthoVenn/](http://www.bioinfogenome.net/OrthoVenn/)

<sup>10</sup> <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>

<sup>11</sup> <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

<sup>12</sup> <http://cran.r-project.org>

<sup>13</sup> <https://web.expasy.org/protscale/>

<sup>14</sup> <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>

<sup>15</sup> <http://pymol.org/2/>

<sup>16</sup> <http://galaxy.seoklab.org/>

<sup>17</sup> <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/ModRefiner/>

this, the extracellular extracts of the *P. lutzii*, *P. americana*, *P. brasiliensis*, and *P. restrepiensis* species were used. Initially, extracellular extracts were subjected to 1-D SDS-PAGE with subsequent transfer to nitrocellulose membranes. Subsequently, immunoblotting assays were performed using antibodies obtained from control and immunized mice (Figure 1).

These results demonstrated that immunoblottings probed with antibodies obtained from immunized mice only with Freund's adjuvant (controls) did not show any reactivity with the proteins of *Paracoccidioides* species. On the other hand, the serum obtained from mice immunized with secreted protein extracts from *P. lutzii*, *P. americana*, *P. brasiliensis*, and *P. restrepiensis* depicts reactivity against *Paracoccidioides* exoproteomes (Figure 1). In addition, by means of these data, it was possible to observe differences in antigenic profiles among the species representative of the *Paracoccidioides* complex. The antigenic profile of *P. lutzii* showed a wide range of antigenic proteins between 105 and 19 kDa. For the *P. americana* species, a range of antigens between 99 and 14 kDa were presented. Antigens in the range from 99 to 37 kDa were observed in samples from *P. brasiliensis* species. Regarding *P. restrepiensis*, it is possible to observe that the profile of the antigenic proteins varies between 105 and 21 kDa (Figure 1). As a result, it was possible to verify that the secreted protein extracts from *Paracoccidioides* species present antigenic molecules that induce the production of different antibodies.

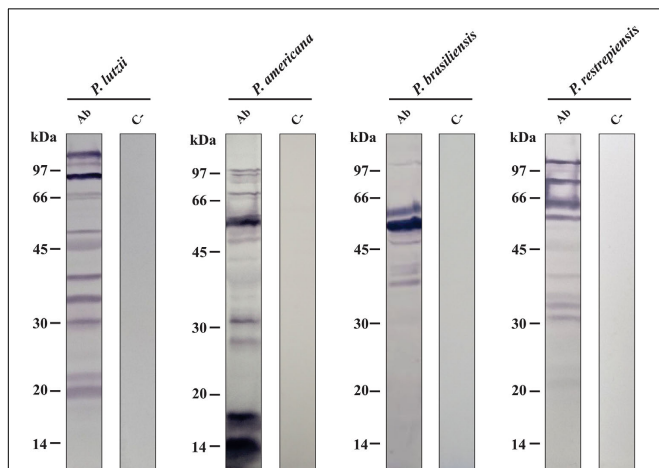
### Immunoprecipitation of *Paracoccidioides* Exoantigens

After analyzing the differences in the antigenic profiles between *Paracoccidioides* species, we used immunoprecipitation approach to purify the antibody-reactive exoantigens (Supplementary Figure S1) by using the secretome samples from *P. lutzii*,

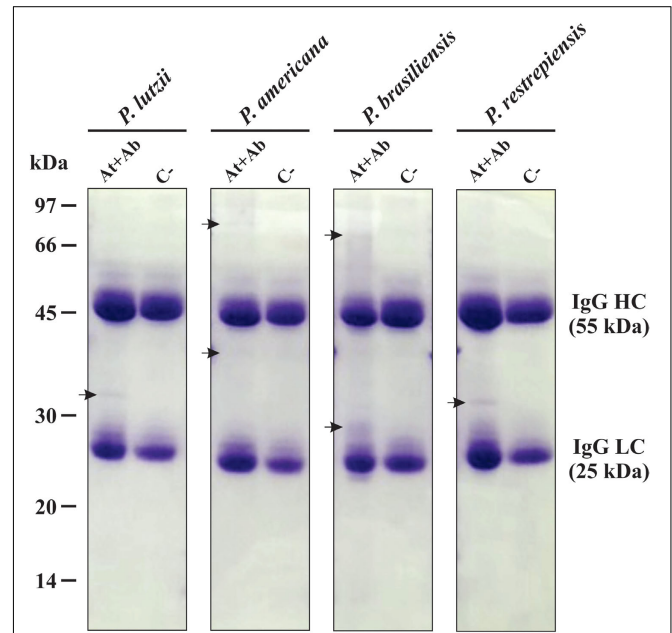
*P. americana*, *P. brasiliensis*, and *P. restrepiensis* species. The immunoprecipitated samples were separated by 12% 1-D SDS-PAGE and demonstrate the presence of immunoreactive proteins, which proves the antigen-antibody binding (Figure 2). These profile differences are observed according to the molecular weight of the bands of proteins that are visualized in the electrophoresis (Figure 2). However, unlike what was seen regarding the immunized serum, the control sample showed no differences in protein profiles. The absence of immunoreactive proteins in the control sample demonstrates that there was no anti-secretome antibody production (Figure 2).

### Mass Spectrometry Identification of *Paracoccidioides* Species Exoantigens

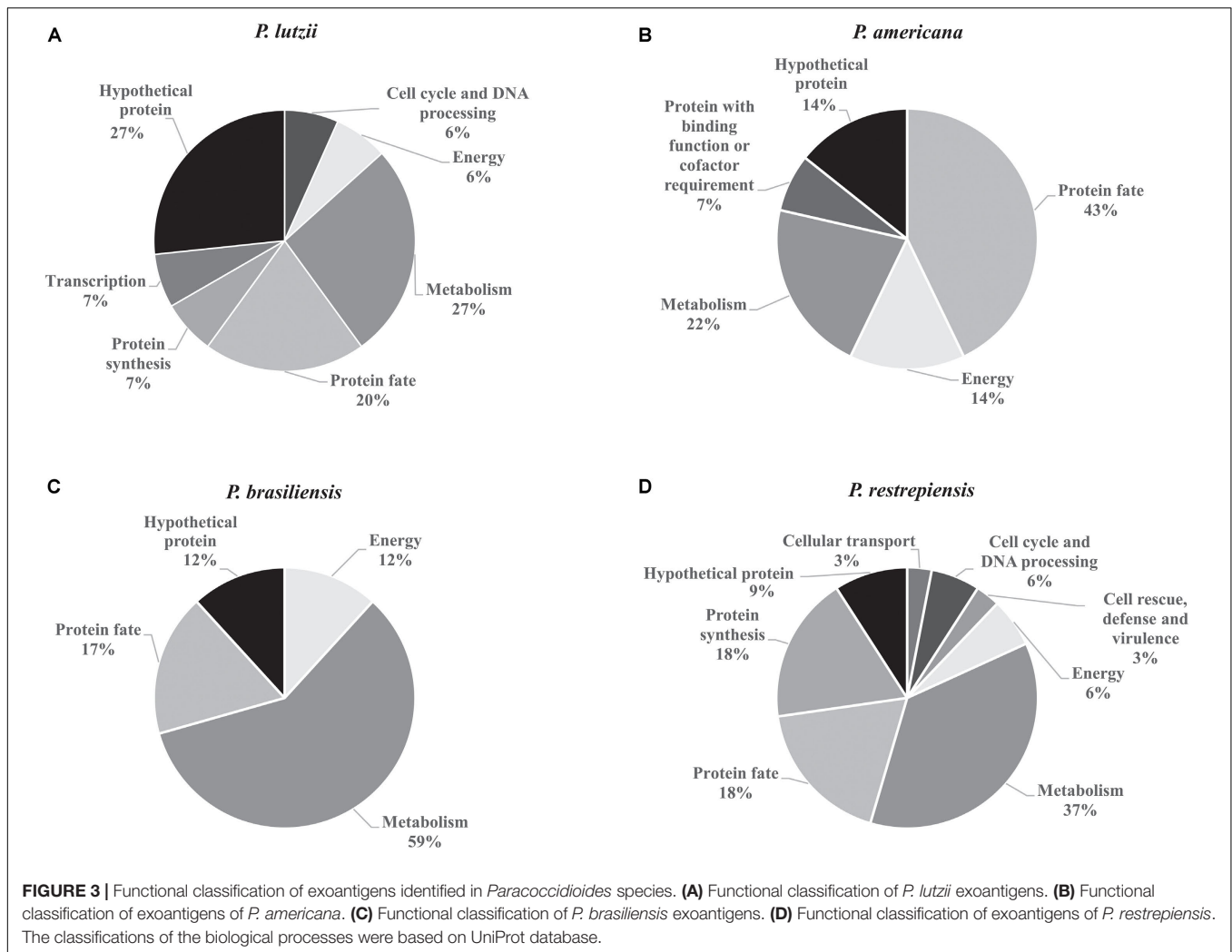
To identify the immunoprecipitated exoantigens, proteomic strategies were used. Initially, the samples obtained from the *Paracoccidioides* species were digested with trypsin and submitted to nanoUPLC-MS<sup>E</sup>, resulting in the identification of 15 exoantigens for *P. lutzii* (Supplementary Table S1), 14 for *P. americana* (Supplementary Table S2), 17 for *P. brasiliensis* (Supplementary Table S3), and 33 for isolate *P. restrepiensis* (Supplementary Table S4). The immunoprecipitated exoantigens identified in both the immunized and the control serum were removed from the analysis.



**FIGURE 1 |** Analysis of the antigenic profile of proteins secreted by *Paracoccidioides* species through immunoblotting. Secretome samples of *Paracoccidioides* species probed against polyclonal antibodies obtained from animals immunized with the secretomes (Ab). Secretome samples of *Paracoccidioides* species probed against serum from mice immunized only with Freund's adjuvant (C-). kDa, kilodaltons.



**FIGURE 2 |** Electrophoretic profile of affinity chromatography. One-dimensional (1-D-SDS-PAGE) gel of proteins eluted from Sepharose beads-IgG. Immunoprecipitation using serum from immunized mice (At + Ab) and negative control (C-). Top row: Isolated representatives of *Paracoccidioides* species (*P. lutzii*, *P. americana*, *P. restrepiensis*, and *P. brasiliensis*). The arrows indicate the presence of exoantigens after purification when compared to the negative control. At, antigen; Ab, antibody; IgG HC, immunoglobulin G heavy chain; IgG LC, immunoglobulin G light chain. Electrophoresis stained with Coomassie blue.

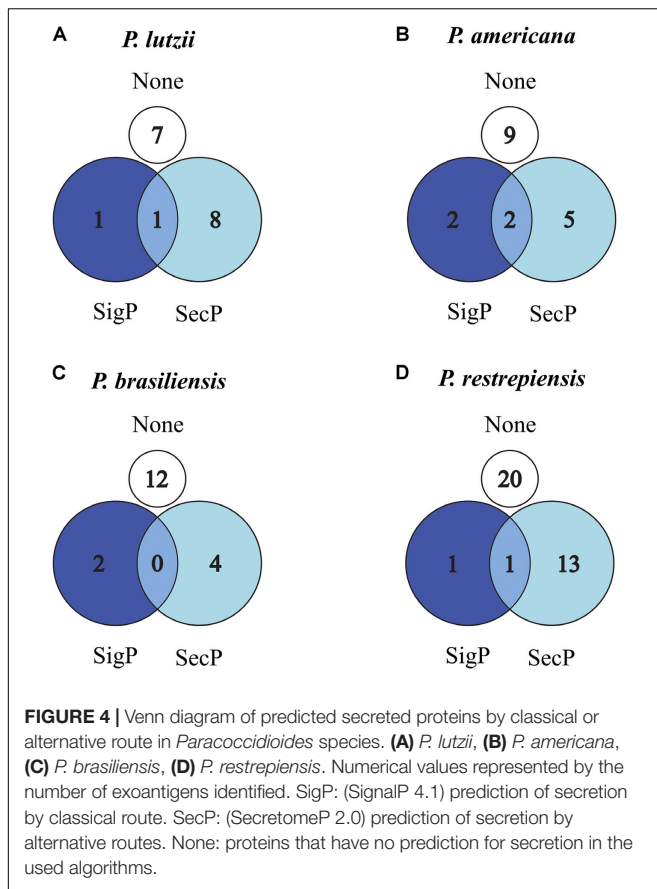


The exoantigens identified in *Paracoccidioides* species were functionally classified in biological processes based on UniProt database. In *P. lutzii*, the most abundant functional class was metabolism (27%), followed by protein fate (20%), energy (6%), transcription (7%), protein synthesis (7%), cell cycle and DNA processing (6%), and hypothetical proteins (27%) (Figure 3A). The most abundant functional classes of *P. americana* after the functional classification were protein fate (43%), metabolism (22%), energy (14%), protein with binding function or cofactor requirement (7%), and hypothetical proteins (14%) (Figure 3B). For *P. brasiliensis*, metabolism (59%) was the most represented functional class, followed by protein fate (17%), energy (12%), and protein synthesis (12%) (Figure 3C). The functional classes of *P. restrepiensis* exoantigens were represented by metabolism (37%), protein fate (18%), protein synthesis (18%), cellular transport (3%), cell cycle and DNA processing (6%), cell rescue, defense, and virulence (3%), energy (6%), and hypothetical proteins (9%) (Figure 3D).

To identify signal peptides related to secretion pathways to the extracellular environment by alternative or classic routes, we used SecretomeP and SignalP software, respectively (Supplementary

Tables S1–S4). The data obtained by the SecretomeP software revealed that 53.33% (*P. lutzii*), 28.57% (*P. americana*), 23.52% (*P. brasiliensis*), and 39.39% (*P. restrepiensis*) of identified exoantigens were predicted for secretion by non-classical pathways (Figures 4A–D). Using the SignalP software, it was revealed that 6.66, 14.20, 11.76, and 03.03% exoantigens of *P. lutzii*, *P. americana*, *P. brasiliensis*, and *P. restrepiensis*, respectively, showed signal peptides for secretion by the classical route (Figures 4A–D).

When comparing the exoantigens identified in *Paracoccidioides* species by software OrthoVenn, seven proteins from *P. lutzii* were exclusives in comparison with other fungus species described in our study. Four, seven, and 17 exoantigens of *P. americana*, *P. brasiliensis*, and *P. restrepiensis* were exclusive to these isolates, respectively (Figure 5 and Supplementary Table S5). The proteins 2-methylcitrate synthase mitochondrial, malate dehydrogenase NAD-dependent, and HSP 70-like protein were identified in all species during the immunoproteomics analyses (Supplementary Table S6). Other proteins, such as endo-1,3(4)-beta-glucanase, dihydrolipoyl dehydrogenase, and glutamate carboxypeptidase, were identified in common



between *P. americana*, *P. brasiliensis*, and *P. restrepiensis* species (Supplementary Table S6).

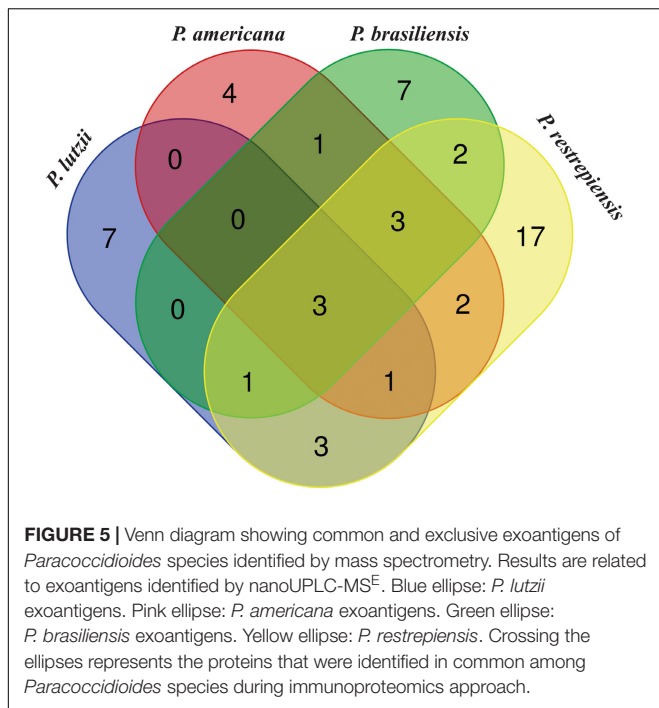
## Non-homologous Exoantigens of *Paracoccidioides* Species

A comparative analysis was carried out to verify which molecules were identified as exclusive and conserved among the studied *Paracoccidioides* species. BLASTp-NCBI algorithm was used, and the genome of *P. venezuelensis* was inserted to analyze its exoantigens homology within the *Paracoccidioides* complex. The exoantigens hypothetical protein (PAAG\_05807) and glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase (PAAG\_06925) were exclusive to *P. lutzii* when their homology was compared to the other species of *Paracoccidioides* (Table 1). In addition, the exoantigen hypothetical protein (PAAG\_12630) of *P. lutzii* showed low homology to *P. brasiliensis* (72%) and *P. restrepiensis* (76%), but the molecule was not homologous to *P. americana* and *P. venezuelensis*. All other exoantigens analyzed have strong homology between the species of *Paracoccidioides*, demonstrating the presence of these conserved proteins among *Paracoccidioides* species (Supplementary Table S7). In addition, the homology of the *Paracoccidioides* spp. exoantigens was analyzed against proteins of other species and pathogens annotated in the NCBI genome, such as *Homo sapiens* (taxid:9606), *Cryptococcus neoformans* (taxid:5207), *Histoplasma capsulatum* (taxid:5037), *S. schenckii* (taxid:29908),

*Coccidioides immitis* (taxid:5501), *C. albicans* (taxid:5476), *A. fumigatus* (taxid:746128), *Mycobacterium tuberculosis* (taxid:1773), *Escherichia coli* (taxid:562), *Leishmania braziliensis* (taxid:5660), and *Streptococcus pneumoniae* (taxid:1313). During the analyses of *P. lutzii* exoantigens, the hypothetical protein (PAAG\_12701) and hypothetical protein (PAAG\_05807) were not homologous to any of the analyzed species, making these molecules excellent biomarkers to be used for the epidemiological monitoring and diagnosis of PCM caused by *P. lutzii*. The exoantigen hypothetical protein (PAAG\_12630) presented homology of 92% to *H. capsulatum*, and glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase (PAAG\_06925) presented low homology to *H. capsulatum* (62%), *C. immitis* (39%), and *C. neoformans* (39%) (Figure 6A). In *P. americana*, the exoantigen serine protease (PABG\_00534) showed homology to *H. capsulatum* (74%) and *C. immitis* (51%). In addition, endo-1,3(4)-beta-glucanase (PABG\_12341), although homologous to *H. capsulatum* (66%), *C. immitis* (64%), *A. fumigatus* (54%), *S. schenckii* (42%), and *C. albicans* (41%), presented low homology to the antigens of these species (Figure 6B). In *P. brasiliensis*, the exoantigen ribosome biogenesis protein BMS1 (PADG\_00459) was homologous to *H. capsulatum* (66%), *C. immitis* (63%), and *A. fumigatus* (65%). In addition, PTH1 family peptidyl-tRNA hydrolase (PADG\_05841) was present in several other pathogens, but exhibited low homology (Figure 6C). For the *P. restrepiensis* species, the exoantigen single-strand binding protein family (A0A1E2Y9T2) presented low homology to *H. capsulatum* (73%), *C. immitis* (33%), *A. fumigatus* (45%), *S. schenckii* (60%), and *E. coli* (39%). Another exoantigen in *P. restrepiensis* that showed low homology was oxidoreductase (A0A1D2JMM5). This molecule was homologous to *H. capsulatum* (61%), *C. immitis* (46%), *A. fumigatus* (45%), *S. schenckii* (28%), *C. neoformans* (35%), and *C. albicans* (24%) (Figure 6D). All comparisons of homology between *Paracoccidioides* spp. and other species of pathogens analyzed during the study are listed in Supplementary Table S8.

## B-Cell Epitope Prediction of Exoantigens of *Paracoccidioides* Complex

Epitopes are specific regions of an antigen to which an antibody binds. These peptide regions are presented by MHC molecules to T lymphocytes (Abbas et al., 2008). Bioinformatics tools were used during analyses to predict and characterize which B-cell epitopes are present in the exoantigens identified by our immunoproteomics analysis. BCPREDs and ABCpred software were used together to verify if the predicted epitopes would be identified by both tools, leading to confirmation and strengthening of the experimentally obtained data. Initially, the proteins were submitted to BCPREDS software, where the epitopes with the highest score were selected (Supplementary Table S9). Predicted epitopes were also counted for each identified exoantigen, totaling 93 epitopes present in 15 proteins of *P. lutzii* and 158 epitopes present in 14 proteins of *P. americana*. For *P. brasiliensis*, 143 epitopes were predicted in 17 proteins, and there were 232 epitopes in 33 proteins



of *P. restrepiensis*. All of these predicted epitopes are listed in **Supplementary Table S9**.

Subsequently, the epitopes were analyzed using ABCpred software, where the sequences predicted by this tool were selected and compared to the sequences predicted by BCPREDS software. This analysis was performed to verify if these two software tools share the same results, strengthening our experimental data (**Supplementary Table S9**). Thus, all epitopes predicted by both tools were verified and showed high score values, except for the exoantigens PAAG\_12701 of *P. lutzii*, which did not show epitope prediction in any software.

In addition, the amount of predicted epitopes for each identified exoantigen was also evaluated. Interestingly, one of the exoantigens that had the largest number of predicted epitopes was endo-1,3 (4) beta-glucanase with 23 epitopes. This antigen was identified in *P. americana*, *P. brasiliensis*, and *P. restrepiensis* species. Next, aminopeptidase 2 presented 18 epitopes and was identified in *P. americana* and *P. brasiliensis* species. Heat shock proteins such as HSP70 and HSP60 presented 17 and 10 predicted epitopes, respectively, and were identified in all species in this study. The glutamate carboxypeptidase was another

exoantigen that showed large numbers of predicted epitopes. A total of 11 epitopes were predicted in this molecule and identified in *P. brasiliensis* and *P. restrepiensis* species. Also, in *P. brasiliensis* and *P. restrepiensis*, the exoantigen dihydrolipoyl dehydrogenase was analyzed and presented nine predicted epitopes (**Supplementary Table S9**).

### Specific B-Cell Epitopes of *Paracoccidioides* Species

After verifying which exoantigens were homologous to antigenic molecules in other organisms, the homology of the B lymphocyte epitopes predicted by BCPREDS and ABCpred software was verified to identify which antigenic sequences were conserved or not in other organisms. For this, all sequences of the epitopes listed in **Supplementary Table S9** were analyzed against homologous epitopes of other important fungi and pathogenic bacteria. Proteins with homology to human molecules were also analyzed to identify and avoid the process of cross-reactivity during future tests. Initially, species such as *C. neoformans*, *H. capsulatum*, *S. schenckii*, *C. immitis*, *C. albicans*, *A. fumigatus*, *M. tuberculosis*, *E. coli*, *S. pneumoniae*, *L. braziliensis*, and *H. sapiens* were selected. All sequences of proteins homologous to the exoantigens identified during the immunoproteomic were obtained from the UniProt database. ClustalX software was used to perform the alignment and all of the sequences were manually checked. After analysis of all identified epitopes, we selected only those that did not present homology with other analyzed organisms. In addition, the epitope topology in the protein structure is important. To check which epitopes were hydrophilic and can be present in the protein surface, we used ProtScale software, as performed by Ejazi et al. (2018). Thus, we selected only the hydrophilic, non-homologous to other related organisms and exclusive epitopes of the *Paracoccidioides* complex (**Table 2**). Therefore, five, 11, 10, and 18 epitopes of *P. lutzii*, *P. americana*, *P. brasiliensis*, and *P. restrepiensis*, respectively, were obtained (**Table 2**). In addition, the homology of all epitopes among *Paracoccidioides* species was evaluated to confirm its presence in all species of this fungus.

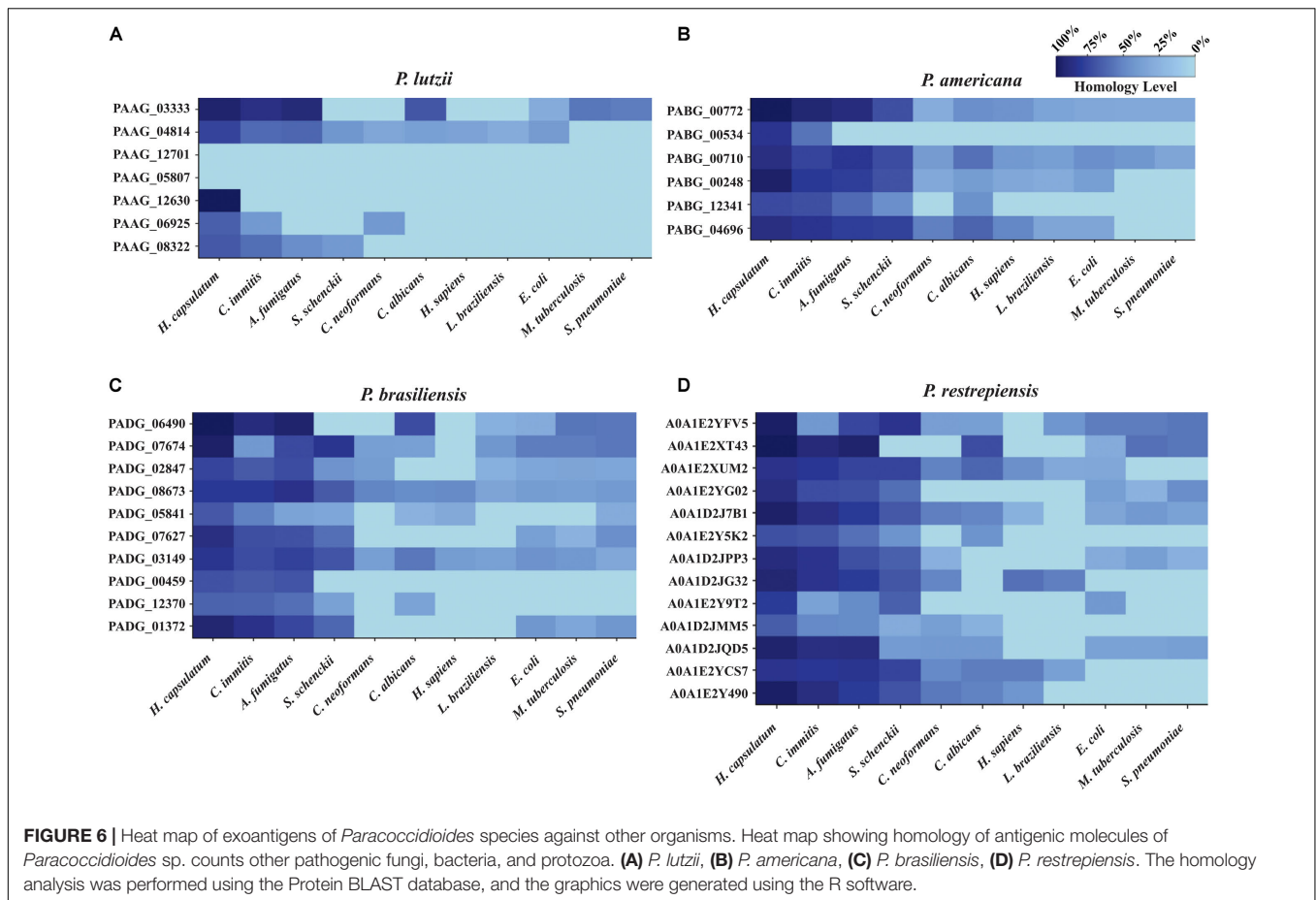
### 3-D Analysis of Exclusive Epitopes of *Paracoccidioides* Species

All exoantigens that showed exclusive epitopes common to all *Paracoccidioides* species (**Table 2**) had their 3-D structure built by using I-TASSER software and were refined by ModRefiner and GalaxyWEB algorithms. The position of each identified

**TABLE 1 |** Level of homology of the exoantigens of *Paracoccidioides* sp. between the species of the complex.

| <i>P. lutzii</i> <sup>1,2</sup>                       | <i>P. americana</i> <sup>3</sup> (%) | <i>P. brasiliensis</i> <sup>4</sup> (%) | <i>P. restrepiensis</i> <sup>5</sup> (%) | <i>P. venezuelensis</i> <sup>6</sup> (%) |
|---|--------------------------------------|---|--|--|
| PAAG_05807 – Hypothetical protein                     | 0                                    | 0                                       | 0  | 0  |
| PAAG_12630 – Hypothetical protein                     | 0                                    | 72                                      | 76                                       | 0  |
| PAAG_06925 – Glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase | 0                                    | 0                                       | 0  | 0  |

<sup>1</sup>Access number of *P. lutzii* exoantigens. <sup>2</sup>Exoantigens of *P. lutzii*. <sup>3</sup>Exoantigens of *P. americana* used for homology analysis. <sup>4</sup>Exoantigens of *P. brasiliensis* used for homology analysis. <sup>5</sup>Exoantigens of *P. restrepiensis* used for homology analysis. <sup>6</sup>Exoantigens of *P. venezuelensis* used for homology analysis. Values in % correspond to the homology levels of exoantigens.



epitope was evaluated in exoantigen models and whether they were present in the surface of the model or not, which possibly facilitates antigen-antibody binding. The epitopes used for the analysis are displayed in **Table 2**, totaling two, four, three, and five exoantigens for *P. lutzii*, *P. americana*, *P. brasiliensis*, and *P. restrepiensis*, respectively. For *P. lutzii*, the exoantigen nucleic acid-binding protein (PAAG\_04814 – 3 epitopes) was evaluated. During the analysis of the 3-D model of this exoantigen, it was possible to verify that one epitope was on the surface (**Figure 7A**). In *P. americana*, molecular modeling of four exoantigens was made: serine protease (PABG\_00534, one epitope), aminopeptidase 2 (PABG\_00710, one epitope), endonuclease G, mitochondrial (PABG\_04696, two epitopes), and endo-1,3(4)-beta-glucanase (PABG\_12341, seven epitopes). After analysis, it was verified that all epitopes analyzed in the exoantigens were present externally to the analyzed models (**Figure 7B**). Regarding *P. brasiliensis* predicted models, the exoantigens aminopeptidase 2 (PADG\_03149, one epitope), carbonic anhydrase (PADG\_07674, two epitopes), and endo-1,3(4)-beta-glucanase (PADG\_12370, seven epitopes) had their epitopes analyzed in the 3-D models obtained, and it was also possible to verify the presence of the antigens on the surface (**Figure 7C**). In *P. restrepiensis*, five exoantigens had their epitopes analyzed in generated 3-D models. Thus, the exoantigens oxidoreductase (A0A1D2JMM5, 3

epitopes), endonuclease G mitochondrial (A0A1E2XUM2, one epitope), endo-1,3(4)-beta-glucanase (A0A1E2Y5K2, seven epitopes), ATP synthase subunit D (A0A1E2YCS7, five epitopes), and carbonic anhydrase (A0A1E2YFV5, two epitopes) were present in the exposed regions in the 3-D models (**Figure 7D**).

### Exclusive Epitopes of Members of the *Paracoccidioides* Complex

After identification of the exclusive epitopes of *Paracoccidioides*, the level of homology of these epitopes was investigated among species. Thus, the FASTA sequences were obtained of proteins of the *Paracoccidioides* species that were homologous to exoantigens identified during the immunoproteomics assays. For this analysis, homologous molecules of the species *P. lutzii*, *P. americana*, *P. brasiliensis*, *P. restrepiensis*, and *P. venezuelensis* were selected. ClustalX software was used to perform the alignment and the homology of these epitopes in the *Paracoccidioides* complex was manually analyzed. Consequently, non-homologous epitopes to other pathogens were identified that were exclusive to each species of *Paracoccidioides* (**Table 3**). In *P. lutzii*, seven epitopes from two proteins, hypothetical protein (PAAG\_05807) and hypothetical protein (PAAG\_12630),

**TABLE 2 |** B-cell epitopes hydrophilic, non-homologous, and exclusive of *Paracoccidioides* species.

| <i>Paracoccidioides lutzii</i>        |   |
|---------------------------------------|---|
| Position <sup>1</sup>                 | Access number – Protein name                      |
|                                       | <b>PAAG_04814 – Nucleic acid-binding protein</b>  |
| 77                                    | VPISRPAPDVRPNETIYIGN                              |
| 166                                   | SRGSANPTPTRSNEPTRTLF                              |
| 261                                   | ARDSTMDRLRTAPSGSNETF                              |
|                                       | <b>PAAG_08322 – Hypothetical protein</b>          |
| 33                                    | HIDAREVINPGPVDSPKFFD                              |
| 264                                   | GTTNPDPISIKDGSSSFASPP                             |
| <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>  |   |
| Position <sup>1</sup>                 | Access number – Protein name                      |
|                                       | <b>PADG_03149 – Aminopeptidase 2</b>              |
| 162                                   | KIEVASNPSVTVNEDNETAT                              |
|                                       | <b>PADG_07674 – Carbonic anhydrase</b>            |
| 11                                    | STLRTQCTAITTPTRSSINK                              |
| 43                                    | NKPLPRFPHPCPTRRTISQM                              |
|                                       | <b>PADG_12370 – Endo-1,3(4)-beta-glucanase</b>    |
| 39                                    | TQFPPTGVRLQATRTPGVYH                              |
| 82                                    | EDHIGLPHPEYPHLDIVPSK                              |
| 109                                   | CYYKGNWCPGLPHAEENRIS                              |
| 130                                   | WLLDQSTGAPPKFATVTSSK                              |
| 163                                   | AAPSATSRSPPRETATVHPS                              |
| 203                                   | SSMSHQDIFEPIDKGPIPSN                              |
| 551                                   | IGFGPDPNTGREATLSNAT                               |
| <i>Paracoccidioides americana</i>     |   |
| Position <sup>1</sup>                 | Access number – Protein name                      |
|                                       | <b>PABG_00534 – Serine protease</b>               |
| 81                                    | AYSPIQPPAEVDDPVLVSWA                              |
|                                       | <b>PABG_00710 – Aminopeptidase 2</b>              |
| 162                                   | KIEVASNPSVTVNEDNETAT                              |
|                                       | <b>PABG_04696 – Endonuclease G, mitochondrial</b> |
| 34                                    | LGTPPPSTRLLPPQTTSQPTS                             |
| 56                                    | IPHPKITTPTDASPVPVG                                |
|                                       | <b>PABG_12341 – Endo-1,3(4)-beta-glucanase</b>    |
| 39                                    | TQFPPTGVRLQATRTPGVYH                              |
| 82                                    | EDHIGLPHPEYPHLDIVPSK                              |
| 109                                   | CYYKGNWCPGLPHAEENRIS                              |
| 130                                   | WLLDQSTGAPPKFATVTSSK                              |
| 163                                   | AAPSATSRSPPRETATAHPS                              |
| 203                                   | SSMSHQDIFEPIDKGPIPSN                              |
| 551                                   | IGFGPDPNTGREATLSNAT                               |
| <i>Paracoccidioides restrepiensis</i> |   |
| Position <sup>1</sup>                 | Access number – Protein name                      |
|                                       | <b>A0A1D2JMM5 – Oxidoreductase</b>                |
| 17                                    | ACQISPQDTTKPPPTVKNRM                              |
| 55                                    | DVDEVQPTAEATARTENAD                               |
| 257                                   | HKEADEHRDQVNVHSPERLC                              |
|                                       | <b>A0A1E2XUM2 – Endonuclease G mitochondrial</b>  |
| 34                                    | LGTPPPSTRLLPPQTTSQPTS                             |
|                                       | <b>A0A1E2Y5K2 – Endo-1,3 (4)-beta-glucanase</b>   |
| 39                                    | TQFPPTGVRLQATRTPGVYH                              |

(Continued)

**TABLE 2 |** Continued

|     |  |
|-----|--|
| 82  | EDHIGLPHPEYPHLDIVPSK                       |
| 109 | CYYKGNWCPGLPHAEENRIS                       |
| 130 | WLLDQSTGAPPKFATVTSSK                       |
| 163 | AAPSATSRSPPRETATVHPS                       |
| 203 | SSMSHQDIFEPIDKGPIPSN                       |
| 551 | IGFGPDPNTGREATLSNAT                        |
|     | <b>A0A1E2YCS7 – ATP synthase subunit D</b> |
| 23  | AADSESEAEAGAEEPSIPGG                       |
| 44  | AVTVHSRNEKKARKAIGKLG                       |
| 80  | VINQPDVYRSPSSNTWIIFG                       |
| 150 | EAVEKKDDEEDGEEVDESG                        |
| 185 | SRKKAIRALKENDNDIVNSI                       |
|     | <b>A0A1E2YFV5 – Carbonic anhydrase</b>     |
| 11  | STLRTQCTAITTPTRSSINK                       |
| 43  | NKPLPRFPHPCPTRRTISQM                       |

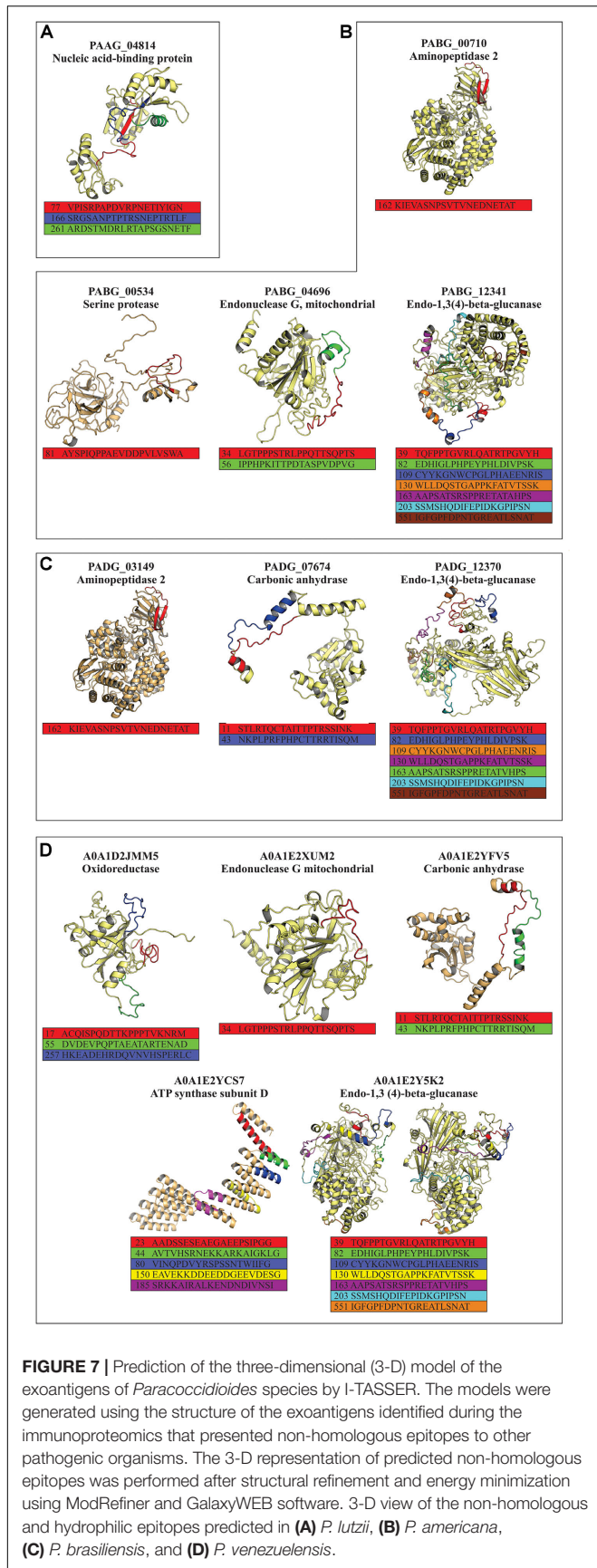
<sup>1</sup>Position of the epitope in the exoantigen.

**TABLE 3 |** Exclusive epitopes of each species of *Paracoccidioides* complex.

| <i>Paracoccidioides lutzii</i>        |   |
|---------------------------------------|---|
| Position <sup>1</sup>                 | Access number – Protein name                              |
|                                       | <b>PAAG_05807 – Hypothetical protein</b>                  |
| 25                                    | NLWRHFNPDTAVVYNHMRL                                       |
| 70                                    | KNSIRKVGFTPLDNSEPEETH                                     |
| 103                                   | SITTPIGQSGHHPNLTTSW                                       |
|                                       | <b>PAAG_12630 – Hypothetical protein</b>                  |
| 43                                    | EIGGEMRDTKGARENIRVK                                       |
| 73                                    | GFRVRGGEGEGSEGETVQEGS                                     |
| 94                                    | AAGCGRAKGGKRGQRGRAK                                       |
| 146                                   | PMGGVDGGTPGPFGRKREDE                                      |
| <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>  |   |
| Position <sup>1</sup>                 | Access number – Protein name                              |
|                                       | <b>PADG_08054 – Malate dehydrogenase NAD-dependent</b>    |
| 7                                     | LGASGGIGQVRGSMYTYNTI                                      |
| 28                                    | KTSSTLWASTPKPNSNKMQP                                      |
|                                       | <b>PADG_12370 – Endo-1,3(4)-beta-glucanase</b>            |
| 637                                   | NNYVWMKSDNVNQPDADTPQ                                      |
| <i>Paracoccidioides restrepiensis</i> |   |
| Position <sup>1</sup>                 | Access number – Protein name                              |
|                                       | <b>A0A1E2Y490 – ER lumen protein retaining receptor 2</b> |
| 42                                    | PSDVHIDSPPEDEVKCLSF                                       |
| 140                                   | RYEFSEVYKAPPYPPPPCIL                                      |

<sup>1</sup>Position of the epitope in the exoantigen.

were identified (Table 3). In *P. brasiliensis*, three predicted epitopes were exclusive. Two epitopes were present in malate dehydrogenase NAD-dependent (PADG\_08054) and one in endo-1,3(4)-beta-glucanase (PADG\_12370) (Table 3). For *P. restrepiensis*, two epitopes were identified and belong to ER lumen protein retaining receptor 2 (A0A1E2Y490) (Table 3). Identification of these epitopes needs to be tested to be used during epidemiological monitoring of the disease, supporting the recognition of which species of *Paracoccidioides* is causing PCM.



**FIGURE 7 |** Prediction of the three-dimensional (3-D) model of the exoantigens of *Paracoccidioides* species by I-TASSER. The models were generated using the structure of the exoantigens identified during the immunoproteomics that presented non-homologous epitopes to other pathogenic organisms. The 3-D representation of predicted non-homologous epitopes was performed after structural refinement and energy minimization using ModRefiner and GalaxyWEB software. 3-D view of the non-homologous and hydrophilic epitopes predicted in (A) *P. lutzii*, (B) *P. americana*, (C) *P. brasiliensis*, and (D) *P. venezuelensis*.

## DISCUSSION

In this work, several exoantigens were identified in the representatives of the *Paracoccidioides* complex: *P. lutzii*, *P. americana*, *P. brasiliensis*, and *P. restrepiensis*. These data provide the first large-scale identification of exoantigens of *Paracoccidioides* species. Some of these exoantigens have already been identified and described as antigens of pathogenic fungi, such as formamidase (Borges et al., 2005, 2010), dihydrolipoyl dehydrogenase (Landgraf et al., 2017), HSP60 (Izacc et al., 2001; Cunha et al., 2002), HSP70 (Bromuro et al., 1998; Bisio et al., 2005), serine protease (Parente et al., 2010; Lacerda Pigosso et al., 2017), and isocitrate lyase (Cruz et al., 2011; Silva et al., 2019). This demonstrates the robustness of method used in our immunoproteomics analyses.

Taking into account that our target is the characterization only of secreted antigens, we were able to produce and purify this group of proteins once no DNA from fungal cell lysis was detected in PCR-based assays. Similar results have already been observed in secretome analyses of *Paracoccidioides* sp. (Weber et al., 2012). Subsequently, we verified the profile of secretome obtained, where the molecular weight profiles were found to vary from 16 to 103 kDa, being compatible with the protein profile secreted by *Paracoccidioides* spp. (Weber et al., 2012; de Oliveira et al., 2018), which secreted a range of complex proteins of several sizes. Additionally, it was observed that *Paracoccidioides* species have differences in the exoantigen profiles, with an immunoreactive profile presenting differences between the studied species, although some exoantigens seem to be shared by all species. These antigenic differences may be related to the singular genetic compositions of each species analyzed, as reported (Pigosso et al., 2013; do Amaral et al., 2019). In *Sporothrix* spp., immunoblotting and immunoproteomics approach also have been demonstrating a dissimilar profile between species of complex, highlighting the importance of antigenic molecules as potential biomarkers of serological diagnosis and candidates for vaccine development (Rodrigues et al., 2015).

Currently, immunoprecipitation is a technique used for the purpose of purifying protein extracts, concentrating low-abundance proteins, analyzing protein-protein interactions, posttranslational modification studies, and can also be employed for antigens precipitation (Lund-Johansen et al., 2000). Employing this technique, we found the presence of immunoreactive bands when compared to control samples. Similar results were observed when immunoprecipitation was used for antigen purification with subsequent construction of new diagnostic tests for African trypanosomiasis (Sullivan et al., 2013). In addition, we found that the immunoreactive proteins depict a distinct pattern among the studied species, although some exoantigens were present in all *Paracoccidioides* species, as demonstrated by our proteomics analyses. It can be inferred that these differences can be related to the genetic background, mechanisms involved in the protein expression, as well as the secretion machinery of each *Paracoccidioides* species (Desjardins et al., 2011; Pigosso et al., 2013; de Oliveira et al., 2018; do Amaral et al., 2019; Peres da Silva et al., 2019). Thus, the use of

this technique for the purification of antigenic molecules has been shown to be highly effective for obtaining exoantigens from *Paracoccidioides* species.

Additionally, we characterized the *Paracoccidioides* identified antigenic proteins in functional classes. The distribution of secreted proteins in the functional classes was consistent with previous analyses of secretome of *Paracoccidioides* spp. (Weber et al., 2012; de Oliveira et al., 2018) and with proteins secreted in vesicles in other pathogenic fungi (Albuquerque et al., 2008; Rodrigues et al., 2008, 2014; Oliveira et al., 2010). Also, we verified that the protein profile obtained, including mass range and isoelectric point (IP), is consistent with other *Paracoccidioides* sp. secretomes (Weber et al., 2012). Most of the identified antigenic proteins depicted prediction of subcellular localization in the cytoplasm and mitochondria, which is in accordance with described secretomes. These proteins should perform non-classical functions at other cellular locations, being described as moonlighting proteins (Karkowska-Kuleta and Kozik, 2014). The secretion of these molecules seems to be related to virulence and/or host-pathogen interaction of *Paracoccidioides* spp. once it has been demonstrated that secretion of immunogenic molecules in other pathogens is implicated in virulence during host-pathogen interaction (Oliveira et al., 2010; Campbell et al., 2015; de Oliveira et al., 2018).

As expected, the identification of similar exoantigens among *Paracoccidioides* species was confirmed by mass spectrometry analysis. When comparing the identified proteins, some molecules, such as malate dehydrogenase NAD-dependent, HSP70-like protein, and 2-methylcitrate synthase, were present in all species. On the other hand, several exoantigens were identified as unique in the analyzed species. Previous analysis has shown constitutively and differentially expressed molecules between *Paracoccidioides* species (Pigosso et al., 2013; do Amaral et al., 2019). However, analyses of exclusive proteins among the isolates could possibly be used in the differential diagnosis of PCM, as well as epidemiology studies.

Homology analyses were used to identify unique exoantigens of *Paracoccidioides* species. These analyses were initially employed among the exoantigens identified by nanoUPLC-MS<sup>E</sup>, resulting in the identification of exclusive exoantigens to *P. lutzii*. The identification of these unique exoantigens enables its use in the differential diagnosis of PCM caused by *P. lutzii*. Subsequently, all exoantigen sequences were compared to sequences of other fungal and bacterial pathogens to verify the homology of these molecules to other organisms. These homology analyses were also employed on human sequences (Virginio et al., 2014; Rodrigues et al., 2015), aiming to select non-homologous molecules and to avoid possible cross-reactivity in future diagnostic tests. However, a small percentage of the exoantigens analyzed presented low homology, being represented by *P. lutzii* and *P. americana* species. Because homology analysis is performed throughout the exoantigen sequence, we decided to check the homology singly analyzing only the homology of the predicted epitopes. Thus, we identified several exclusive and conserved epitopes in the *Paracoccidioides* complex, since these molecules are candidates for the specific diagnosis of PCM. Similar analyses have already

been performed in other works, where linear B-cell epitopes were employed for serological detection of several pathogenic organisms, such as *Borrelia miyamotoi* (Tokarz et al., 2019), *Toxoplasma gondii* (Gatkowska et al., 2019), *Treponema pallidum* (Ogden et al., 2019), *Leishmania* spp. (Bremer Hinckel et al., 2019; Vale et al., 2019), and several human viruses (Amrun et al., 2019; Mutsvunguma et al., 2019; Yao et al., 2019). This reinforces the importance of these analyses, demonstrating the applications of linear B-cell epitopes in the diagnosis of human pathogenic organisms.

Similar to findings for other fungi, the cell wall of *Paracoccidioides* spp. is composed of a network of glycoproteins and polysaccharides, which act to protect the cell from environmental stressors (De Groot et al., 2005). Recent studies have demonstrated that both the yeast and mycelial phases of *Paracoccidioides* spp. present different amounts of  $\beta$ -(1,3) glucans (Camacho and Nino-Vega, 2017). However, enzymes, such as endo  $\beta$ -(1,3)-glucanase, act by hydrolyzing the  $\beta$ -glucan chains, making these enzymes extremely important because they play a fundamental role in the morphological processes of the fungal cell (Adams, 2004). Endo-1,3(4)-beta-glucanase was found as an antigen secreted in yeasts of *P. americana*, *P. brasiliensis*, and *P. restrepiensis* during our analyses. This enzyme has also been detected as secreted in yeast proteomes of *H. capsulatum* (Garfoot et al., 2017). In addition, the endo-1,3(4)-beta-glucanase showed low homology when compared to other fungi and pathogenic bacteria. Despite the low homology, we decided to investigate the level of homology between the epitopes of this molecule. During analysis, seven specific B-cell epitopes presented as exclusive for the *Paracoccidioides* complex, being excellent candidates for synthesis of new diagnostic tests for PCM.

Interestingly, the carbonic anhydrase (CA) of *Paracoccidioides* spp. was first reported as a secreted antigen in the present study. This is a metalloenzyme and acts by catalyzing the reversible hydration of CO<sub>2</sub> to generate HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Supuran, 2008). Additionally, in *Paracoccidioides* sp., four coding genes for carbonic anhydrase have already been described, leading to the synthesis of CA1, CA2, and CA3 proteins for Class  $\beta$  and CA4 protein for Class  $\alpha$ . In addition, this enzyme was positively regulated in *Paracoccidioides* yeast when compared to the mycelium phase of the fungus (Tomazett et al., 2016). In *Stenocarpella macrospora*, CA has already been described in the mitochondrial, cytoplasmic, and extracellular compartments (Elleuche and Poggeler, 2010). CA has been identified as an exoantigen in the current work and has been associated with the extracellular compartment. In addition, CA presented exclusive epitopes, which makes this molecule a potential candidate as a PCM biomarker. Additionally, this exoantigen can be characterized as a moonlighting protein because it has a metabolic function in the cytoplasm and, when exported to the extracellular environment, it is probably related to the virulence of the fungus. In addition, CA has been described and is related to morphogenesis and growth of *Paracoccidioides* sp. and *C. neoformans* (Bahn et al., 2005; Costa et al., 2007) during the infectious processes, suggesting the importance of this molecule during host-pathogen interactions.

Amino peptidase 2 was identified as an exoantigen during analyses. These molecules are characterized as exopeptidases and act as cleaving proteins in their N-terminal region (Gonzales and Robert-Baudouy, 1996). In *Aspergillus oryzae* mycelium secretome, amino peptidase was related to collagen degradation processes (Ding et al., 2014). Furthermore, in a recent study, amino peptidase demonstrated its antigenic potential during the expression of recombinant proteins of *Fasciola hepatica* when probed against antibodies from patients with fascioliasis (Mirzadeh et al., 2018) and against anti-amino peptidase monoclonal antibodies from *Taenia pisiformis* (Zhang et al., 2018). The antigenicity of this molecule was also attested to in eggs and adult worms of *Schistosoma mansoni* following mouse infection assays (Maggioli et al., 2018). In *Aspergillus terreus* mycelium exoantigens, this molecule showed a high antigenicity when probed against monoclonal antibodies, demonstrating its antigenic profile (Nayak et al., 2011). During analyses, these molecules were identified in *P. americana* and *P. brasiliensis*, where one epitope was characterized as exclusive of the *Paracoccidioides* complex. These characteristics indicate that this molecule may be an excellent candidate to be tested as a potential specific biomarker for *Paracoccidioides* species infections.

Therefore, further analyses are underway to investigate the potential of these molecules as biomarkers, which may be used in the design of a rapid diagnostic test for PCM, in patient treatment follow-ups, as well as to investigate the immunogenic potential of these molecules and their possible use in the therapy of this important neglected human systemic mycosis.

## CONCLUSION

The differences among exoantigen expression profiles were essential to identify specific biomarkers for each *Paracoccidioides* species. Here, the use of an immunoproteomics approach allowed us the characterization of 15, 14, 17, and 33 exoantigens in *P. lutzii*, *P. americana*, *P. brasiliensis*, and *P. restrepiensis*, respectively. Additionally, bioinformatics analyses made it possible to perform a series of other characterizations, allowing us to verify the biological functions, homology of exoantigens, epitopes prediction, as well as strengthen the data accuracy. Two exoantigens were identified and described in this work as unique in *P. lutzii*. Also, 44 epitopes exclusive to the *Paracoccidioides* complex were mapped using bioinformatics. Regarding the epitopes that could be used for epidemiological monitoring of the disease, a total of 12 antigenic sequences were identified in exoantigens in the four *Paracoccidioides* species studied. Therefore, these findings demonstrate that *Paracoccidioides* species have a range of epitopes exclusive to the complex, as well as specific to each fungal species. Finally, the current serological tests could be improved further with combinations of two and more synthetic peptides, as well as modifications that can optimize these tests. It is important to highlight that the reactivity of these proposed epitopes is under evaluation and will be tested against clinical samples to provide a new tool for diagnosis, patient follow-ups, and/or PCM therapy.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation, to any qualified researcher.

## ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by the Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFG) under the registry number 030/2016.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

AM, CB, MO, AB, and CA conceptualized and designed the study. AM, LS, VC-L, and JP worked on data acquisition. AM, CB, AB, SW, JP-R, MI, and CA analyzed and interpreted the data. AM, CB, and JP drafted the manuscript. CA, SW, JP, and CB critically revised the manuscript.

## FUNDING

This work at Universidade Federal de Goiás was supported in part by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Finance Code 001, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT-IPH), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), and FUNDECT/DECIT-MS/CNPq/SES No. 03/2016-PPSUS-MS. We thank the Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) for the support of publication fee (EDITAL PROPP\_RTR/UFMS 109/2019).

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.02968/full#supplementary-material>

**FIGURE S1** | Affinity chromatography obtained by immunoprecipitation. **(A)** Scheme used for purifying and obtaining the antigens using serum from immunized and control animals. **(B)** Scheme demonstrating the interaction of sepharose bead – G protein bound antibody and antibody antigen interaction.

**FIGURE S2** | Confirmation by PCR of the extracts secreted by *Paracoccidioides* species. The sensitivity of the PCRs to the formamidase gene were obtained using the genomic DNA of *P. lutzii*, *P. americana*, *P. brasiliensis*, and *P. restrepiensis* in five dilutions ranging from 50 ng to 1 pg (Top panel). C–: Negative control (without genomic DNA). Sec: Cell-free secretome. bp: Base pairs according to the molecular weight marker. The amplicons obtained by PCR were evaluated by 1% agarose gel electrophoresis and stained by GelRed DNA intercalator.

**FIGURE S3** | Integrity analysis of the proteome profile of the secreted isolates of *Paracoccidioides* species by one-dimensional electrophoresis. Twenty micrograms of samples were separated by one-dimensional electrophoresis

(SDS-PAGE) at 12%. *P. lutzii*, *P. americana*, *P. restrepiensis*, and *P. brasiliensis*. kDa, Kilodaltons. Coomassie Blue staining was used to visualize the proteins.

**TABLE S1** | Identification of exoantigens recognized by serum from animals immunized with *P. lutzii* secretome.

**TABLE S2** | Identification of exoantigens recognized by serum from animals immunized with *P. americana* secretome.

**TABLE S3** | Identification of exoantigens recognized by serum from animals immunized with *P. brasiliensis* secretome.

**TABLE S4** | Identification of exoantigens recognized by serum from animals immunized with *P. restrepiensis* secretome.

**TABLE S5** | Exoantigens of *Paracoccidioides* species identified as exclusive during immunoproteomic analyzes.

**TABLE S6** | Exoantigens of *Paracoccidioides* species identified as common during immunoproteomic analyzes.

**TABLE S7** | Level of homology of the exoantigens of *Paracoccidioides* spp. between the species of the complex.

**TABLE S8** | Heat map of homology levels of *Paracoccidioides* exoantigens against other organisms.

**TABLE S9** | *In silico* mapping of B-cell epitopes of all exoantigens identified during the immunoproteome by BCPREDS and ABCpreds.

## REFERENCES

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., and Pillai, S. (2008). *Imunologia Celular e Molecular*. Amsterdam: Elsevier.
- Adams, D. J. (2004). Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology* 150(Pt 7), 2029–2035. doi: 10.1099/mic.0.26980-0
- Albuquerque, P. C., Nakayasu, E. S., Rodrigues, M. L., Frases, S., Casadevall, A., Zancope-Oliveira, R. M., et al. (2008). Vesicular transport in *Histoplasma capsulatum*: an effective mechanism for trans-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes. *Cell Microbiol.* 10, 1695–1710. doi: 10.1111/j.1462-5822.2008.01160.x
- Amrun, S. N., Yee, W. X., Abu Bakar, F., Lee, B., Kam, Y. W., Lum, F. M., et al. (2019). Novel differential linear B-cell epitopes to identify Zika and dengue virus infections in patients. *Clin. Transl. Immunol.* 8:e1066. doi: 10.1002/cti2.1066
- Bahn, Y. S., Cox, G. M., Perfect, J. R., and Heitman, J. (2005). Carbonic anhydrase and CO<sub>2</sub> sensing during *Cryptococcus neoformans* growth, differentiation, and virulence. *Curr. Biol.* 15, 2013–2020. doi: 10.1016/j.cub.2005.09.047
- Bailao, E. F., Parente, J. A., Pigosso, L. L., de Castro, K. P., Fonseca, F. L., Silva-Bailao, M. G., et al. (2014). Hemoglobin uptake by *Paracoccidioides* spp. is receptor-mediated. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8:e2856. doi: 10.1371/journal.pntd.0002856
- Bar, E., Gladiator, A., Bastidas, S., Roschitzki, B., Acha-Orbea, H., Oxenius, A., et al. (2012). A novel Th cell epitope of *Candida albicans* mediates protection from fungal infection. *J. Immunol.* 188, 5636–5643. doi: 10.4049/jimmunol.1200594
- Bisio, L. C., Silva, S. P., Pereira, I. S., Xavier, M. A., Venancio, E. J., Puccia, R., et al. (2005). A new *Paracoccidioides brasiliensis* 70-kDa heat shock protein reacts with sera from paracoccidioidomycosis patients. *Med. Mycol.* 43, 495–503. doi: 10.1080/13693780400029478
- Borges, C. L., Parente, J. A., Barbosa, M. S., Santa, J. M., Bao, S. N., de Sousa, M. V., et al. (2010). Detection of a homotetrameric structure and protein-protein interactions of *Paracoccidioides brasiliensis* formamidase lead to new functional insights. *FEMS Yeast Res.* 10, 104–113. doi: 10.1111/j.1567-1364.2009.00594.x
- Borges, C. L., Pereira, M., Felipe, M. S., de Faria, F. P., Gomez, F. J., Deepe, G. S. Jr., et al. (2005). The antigenic and catalytically active formamidase of *Paracoccidioides brasiliensis*: protein characterization, cDNA and gene cloning, heterologous expression and functional analysis of the recombinant protein. *Microbes Infect.* 7, 66–77. doi: 10.1016/j.micinf.2004.09.011
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Bremer Hinkel, B. C., Marlais, T., Airs, S., Bhattacharyya, T., Imamura, H., Dujardin, J. C., et al. (2019). Refining wet lab experiments with *in silico* searches: a rational quest for diagnostic peptides in visceral leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 13:e0007353. doi: 10.1371/journal.pntd.0007353
- Bromuro, C., La Valle, R., Sandini, S., Urbani, F., Ausiello, C. M., Morelli, L., et al. (1998). A 70-kilodalton recombinant heat shock protein of *Candida albicans* is highly immunogenic and enhances systemic murine candidiasis. *Infect. Immun.* 66, 2154–2162. doi: 10.1128/iai.66.5.2154-2162.1998
- Brummer, E., Castaneda, E., and Restrepo, A. (1993). Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin. Microbiol. Rev.* 6, 89–117. doi: 10.1128/cmr.6.2.89
- Camacho, E., and Nino-Vega, G. A. (2017). *Paracoccidioides* spp.: virulence factors and immune-evasion strategies. *Med. Inflamm.* 2017:5313691. doi: 10.1155/2017/5313691
- Campbell, L. T., Simonin, A. R., Chen, C., Ferdous, J., Padula, M. P., Harry, E., et al. (2015). *Cryptococcus* strains with different pathogenic potentials have diverse protein secretomes. *Eukaryot Cell* 14, 554–563. doi: 10.1128/EC.00052-15
- Costa, A. N., Benard, G., Albuquerque, A. L., Fujita, C. L., Magri, A. S., Salge, J. M., et al. (2013). The lung in paracoccidioidomycosis: new insights into old problems. *Clinics* 68, 441–448. doi: 10.6061/clinics/2013(04)02
- Costa, M., Borges, C. L., Bailao, A. M., Meirelles, G. V., Mendonca, Y. A., Dantas, S. F., et al. (2007). Transcriptome profiling of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast-phase cells recovered from infected mice brings new insights into fungal response upon host interaction. *Microbiology* 153(Pt 12), 4194–4207. doi: 10.1099/mic.0.2007/009332-0
- Cruz, A. H., Brock, M., Zambuzzi-Carvalho, P. F., Santos-Silva, L. K., Troian, R. F., Goes, A. M., et al. (2011). Phosphorylation is the major mechanism regulating isocitrate lyase activity in *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells. *FEBS J.* 278, 2318–2332. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08150.x
- Cunha, D. A., Zancope-Oliveira, R. M., Sueli, M., Felipe, S., Salem-Izacc, S. M., Deepe, G. S. Jr., et al. (2002). Heterologous expression, purification, and immunological reactivity of a recombinant HSP60 from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9, 374–377. doi: 10.1128/cdli.9.2.374-377.2002
- de Curcio, J. S., Silva, M. G., Silva Bailao, M. G., Bao, S. N., Casaletti, L., Bailao, A. M., et al. (2017). Identification of membrane proteome of *Paracoccidioides lutzii* and its regulation by zinc. *Future Sci.* 3:FSO232. doi: 10.4155/fsoa-2017-0044
- De Groot, P. W., Ram, A. F., and Klis, F. M. (2005). Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls. *Fungal Genet. Biol.* 42, 657–675. doi: 10.1016/j.fgb.2005.04.002
- de Oliveira, A. R., Oliveira, L. N., Chaves, E. G. A., Weber, S. S., Bailao, A. M., Parente-Rocha, J. A., et al. (2018). Characterization of extracellular proteins in members of the *Paracoccidioides* complex. *Fungal Biol.* 122, 738–751. doi: 10.1016/j.funbio.2018.04.001
- Desjardins, C. A., Champion, M. D., Holder, J. W., Muszewska, A., Goldberg, J., Bailao, A. M., et al. (2011). Comparative genomic analysis of human fungal pathogens causing paracoccidioidomycosis. *PLoS Genet.* 7:e1002345. doi: 10.1371/journal.pgen.1002345
- Ding, G. W., Zhou, N. D., and Tian, Y. P. (2014). Over-expression of a proline specific aminopeptidase from *Aspergillus oryzae* JN-412 and its application in collagen degradation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 173, 1765–1777. doi: 10.1007/s12010-014-0963-6
- do Amaral, C. C., Fernandes, G. F., Rodrigues, A. M., Burger, E., and de Camargo, Z. P. (2019). Proteomic analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* complex isolates: correlation of the levels of differentially expressed proteins with *in vivo* virulence. *PLoS One* 14:e0218013. doi: 10.1371/journal.pone.0218013
- Ejazi, S. A., Bhattacharyya, A., Choudhury, S. T., Ghosh, S., Sabur, A., Pandey, K., et al. (2018). Immunoproteomic identification and characterization of *Leishmania* membrane proteins as non-invasive diagnostic candidates for clinical visceral leishmaniasis. *Sci. Rep.* 8:12110. doi: 10.1038/s41598-018-30546-y
- Elleuche, S., and Poggeler, S. (2010). Carbonic anhydrases in fungi. *Microbiology* 156(Pt 1), 23–29. doi: 10.1099/mic.0.032581-0
- Fava-Netto, C. (1955). Estudos quantitativos sobre a fixacao do complemento na blastomicose sulamericana com antigenos polissacaridicos. *Arq. Circ. Clin. Exp.* 18, 197–254.

- Franco, M., Sano, A., Kera, K., Nishimura, K., Takeo, K., and Miyaji, M. (1989). Chlamyospore formation by *Paracoccidioides brasiliensis* mycelial form. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 31, 151–157. doi: 10.1590/s0036-46651989000300004
- Garfoot, A. L., Dearing, K. L., VanSchoiack, A. D., Wysocki, V. H., and Rappleye, C. A. (2017). Eng1 and Exg8 Are the Major beta-Glucanases Secreted by the Fungal Pathogen *Histoplasma capsulatum*. *J. Biol. Chem.* 292, 4801–4810. doi: 10.1074/jbc.M116.762104
- Gatkowska, J., Dzitko, K., Ferra, B. T., Holec-Gasior, L., Kawka, M., and Dziadek, B. (2019). The impact of the antigenic composition of chimeric proteins on their immunoprotective activity against chronic toxoplasmosis in mice. *Vaccines* 7:E154. doi: 10.3390/vaccines7040154
- Gautam, P., Sundaram, C. S., Madan, T., Gade, W. N., Shah, A., Sirdeshmukh, R., et al. (2007). Identification of novel allergens of *Aspergillus fumigatus* using immunoproteomics approach. *Clin. Exp. Allergy* 37, 1239–1249. doi: 10.1111/j.1365-2222.2007.02765.x
- Gonzales, T., and Robert-Baudouy, J. (1996). Bacterial aminopeptidases: properties and functions. *FEMS Microbiol. Rev.* 18, 319–344. doi: 10.1111/j.1574-6976.1996.tb00247.x
- Izacc, S. M., Gomez, F. J., Jesuino, R. S., Fonseca, C. A., Felipe, M. S., Deepe, G. S., et al. (2001). Molecular cloning, characterization and expression of the heat shock protein 60 gene from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med. Mycol.* 39, 445–455. doi: 10.1080/714031053
- Jobbins, S. E., Hill, C. J., D'Souza-Bassel, J. M., Padula, M. P., Herbert, B. R., and Krockenberger, M. B. (2010). Immunoproteomic approach to elucidating the pathogenesis of cryptococcosis caused by *Cryptococcus gattii*. *J. Proteome Res.* 9, 3832–3841. doi: 10.1021/pr100028t
- Karkowska-Kuleta, J., and Kozik, A. (2014). Moonlighting proteins as virulence factors of pathogenic fungi, parasitic protozoa and multicellular parasites. *Mol. Oral Microbiol.* 29, 270–283. doi: 10.1111/omi.12078
- Lacaz, C. D. S., Porto, E., Martins, J. E. C., Heins-Vaccari, E. M., and Melo, N. T. D. (2002). *Tratado de Micologia Médica Lacaz*. São Paulo: Sarvier.
- Lacerda Pigosso, L., Baeza, L. C., Vieira Tomazett, M., Batista Rodrigues, Faleiro, M., Brianezi Dignani de Moura, V. M., et al. (2017). *Paracoccidioides brasiliensis* presents metabolic reprogramming and secretes a serine proteinase during murine infection. *Virulence* 8, 1417–1434. doi: 10.1080/21505594.2017.1355660
- Laemmlis, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685. doi: 10.1038/227680a0
- Landgraf, T. N., Costa, M. V., Oliveira, A. F., Ribeiro, W. C., Panunto-Castelo, A., and Fernandes, F. F. (2017). Involvement of dihydrolipoil dehydrogenase in the phagocytosis and killing of *Paracoccidioides brasiliensis* by macrophages. *Front. Microbiol.* 8:1803. doi: 10.3389/fmicb.2017.01803
- Lee, P. Y., Gam, L. H., Yong, V. C., Rosli, R., Ng, K. P., and Chong, P. P. (2014). Immunoproteomic analysis of antibody response to cell wall-associated proteins of *Candida tropicalis*. *J. Appl. Microbiol.* 117, 854–865. doi: 10.1111/jam.12562
- Lund-Johansen, F., Davis, K., Bishop, J., and de Waal Malefyt, R. (2000). Flow cytometric analysis of immunoprecipitates: high-throughput analysis of protein phosphorylation and protein-protein interactions. *Cytometry* 39, 250–259. doi: 10.1002/(sici)1097-0320(20000401)39:4<250::aid-cyto2>3.0.co;2-s
- Maggioli, G., Rinaldi, G., Giaudrone, I., Berasain, P., Tort, J. F., Brindley, P. J., et al. (2018). Expression, purification and characterization of two leucine aminopeptidases of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 219, 17–23. doi: 10.1016/j.molbiopara.2017.11.006
- Martinez, R. (2015). Epidemiology of paracoccidioidomycosis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 57(Suppl. 19), 11–20. doi: 10.1590/S0036-46652015000700004
- Martinez, R. (2017). New trends in paracoccidioidomycosis epidemiology. *J. Fungi* 3:1. doi: 10.3390/jof3010001
- McEwen, J. G., Bedoya, V., Patino, M. M., Salazar, M. E., and Restrepo, A. (1987). Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. *J. Med. Vet. Mycol.* 25, 165–175. doi: 10.1080/02681218780000231
- Mendes, R. P. (1994). The gamut of clinical manifestations. *Paracoccidioidomycosis* 2, 233–258. doi: 10.1201/9781351075329-16
- Mirzadeh, A., Yoosyfy, A., Kazemirad, E., Barati, Z., Golkar, M., Babaie, J., et al. (2018). Evaluation of a set of refolded recombinant antigens for serodiagnosis of human fascioliasis. *PLoS One* 13:e0203490. doi: 10.1371/journal.pone.0203490
- Morejon, K. M., Machado, A. A., and Martinez, R. (2009). Paracoccidioidomycosis in patients infected with and not infected with human immunodeficiency virus: a case-control study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 80, 359–366. doi: 10.4269/ajtmh.2009.80.359
- Munoz, J. F., Farrer, R. A., Desjardins, C. A., Gallo, J. E., Sykes, S., Sakthikumar, S., et al. (2016). Genome diversity, recombination, and virulence across the major lineages of *Paracoccidioides*. *mSphere* 1:e213-16.
- Murad, A. M., and Rech, E. L. (2012). NanoUPLC-MSE proteomic data assessment of soybean seeds using the Uniprot database. *BMC Biotechnol.* 12:82. doi: 10.1186/1472-6750-12-82
- Mutsunguma, L. Z., Rodriguez, E., Escalante, G. M., Muniraju, M., Williams, J. C., Warden, C., et al. (2019). Identification of multiple potent neutralizing and non-neutralizing antibodies against Epstein-Barr virus gp350 protein with potential for clinical application and as reagents for mapping immunodominant epitopes. *Virology* 536, 1–15. doi: 10.1016/j.virol.2019.07.026
- Nayak, A. P., Green, B. J., Janotka, E., Hettick, J. M., Friend, S., Vesper, S. J., et al. (2011). Monoclonal antibodies to hyphal exoantigens derived from the opportunistic pathogen *Aspergillus terreus*. *Clin. Vaccine Immunol.* 18, 1568–1576. doi: 10.1128/CVI.05163-11
- Ogden, N. E., Kurnik, M., Parolo, C., and Plaxco, K. W. (2019). An electrochemical scaffold sensor for rapid syphilis diagnosis. *Analyst* 144, 5277–5283. doi: 10.1039/c9an00455f
- Oliveira, D. L., Freire-de-Lima, C. G., Nosanchuk, J. D., Casadevall, A., Rodrigues, M. L., and Nimrichter, L. (2010). Extracellular vesicles from *Cryptococcus neoformans* modulate macrophage functions. *Infect. Immunol.* 78, 1601–1609. doi: 10.1128/IAI.01171-09
- Parente, J. A., Salem-Izacc, S. M., Santana, J. M., Pereira, M., Borges, C. L., Bailao, A. M., et al. (2010). A secreted serine protease of *Paracoccidioides brasiliensis* and its interactions with fungal proteins. *BMC Microbiol.* 10:292. doi: 10.1186/1471-2180-10-292
- Peres da Silva, R., Longo, L. G. V., Cunha, J., Sobreira, T. J. P., Rodrigues, M. L., Faoro, H., et al. (2019). Comparison of the RNA content of extracellular vesicles derived from *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii*. *Cells* 8:E765. doi: 10.3390/cells8070765
- Pigosso, L. L., Parente, A. F., Coelho, A. S., Silva, L. P., Borges, C. L., Bailao, A. M., et al. (2013). Comparative proteomics in the genus *Paracoccidioides*. *Fungal Genet. Biol.* 60, 87–100. doi: 10.1016/j.fgb.2013.07.008
- Pitarch, A., Nombela, C., and Gil, C. (2016). Seroproteotyping at the *Candida albicans* protein species level unveils an accurate molecular discriminator for candidemia. *J. Proteomics* 134, 144–162. doi: 10.1016/j.jprot.2015.10.022
- Queiroz-Telles, F. (1994). "Paracoccidioides brasiliensis: ultrastructural findings," in *Paracoccidioidomycosis*, ed. M. Franco, (Boca Raton: CRC Press), 27–48. doi: 10.1201/9781351075329-3
- Restrepo, A., and Jimenez, B. E. (1980). Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase in a chemically defined culture medium. *J. Clin. Microbiol.* 12, 279–281. doi: 10.1128/jcm.12.2.279-281.1980
- Restrepo, A., McEwen, J. G., and Castaneda, E. (2001). The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med. Mycol.* 39, 233–241. doi: 10.1080/714031028
- Rodrigues, A. M., Kubitschek-Barreira, P. H., Fernandes, G. F., de Almeida, S. R., Lopes-Bezerra, L. M., and de Camargo, Z. P. (2015). Immunoproteomic analysis reveals a convergent humoral response signature in the *Sporothrix schenckii* complex. *J. Proteomics* 115, 8–22. doi: 10.1016/j.jprot.2014.11.013
- Rodrigues, M. L., Nakayasu, E. S., Almeida, I. C., and Nimrichter, L. (2014). The impact of proteomics on the understanding of functions and biogenesis of fungal extracellular vesicles. *J. Proteomics* 97, 177–186. doi: 10.1016/j.jprot.2013.04.001
- Rodrigues, M. L., Nakayasu, E. S., Oliveira, D. L., Nimrichter, L., Nosanchuk, J. D., Almeida, I. C., et al. (2008). Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryot Cell* 7, 58–67.
- Sambrook, J., and Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, the Third Edition*. New York, NY: Cold spring harbor laboratory press.
- Shikanai-Yasuda, M. A., Mendes, R. P., Colombo, A. L., Queiroz-Telles, F., Kono, A. S. G., Paniago, A. M. M., et al. (2017). Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 50, 715–740. doi: 10.1590/0037-8682-0230-2017

- Shikanai-Yasuda, M. A., Mendes, R. P., Colombo, A. L., Telles, F. D. Q., Kono, A., Paniago, A. M. M., et al. (2018). II consenso brasileiro em paracoccidioidomicose - 2017. *Epidemiol. Serv. Saúde* 27:e0500001.
- Shikanai-Yasuda, M. A., Telles Filho Fde, Q., Mendes, R. P., Colombo, A. L., and Moretti, M. L. (2006). [Guidelines in paracoccidioidomycosis]. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 39, 297–310.
- Silva, K. S. F., Lima, R. M., Baeza, L. C., Lima, P. S., Cordeiro, T. M., Charneau, S., et al. (2019). Interactome of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase points to the existence of metabolons in *Paracoccidioides lutzii*. *Front. Microbiol.* 10:1537. doi: 10.3389/fmicb.2019.01537
- Sircar, G., Chakrabarti, H. S., Saha, B., and Gupta-Bhattacharya, S. (2012). Identification of aero-allergens from *Rhizopus oryzae*: an immunoproteomic approach. *J. Proteomics* 77, 455–468. doi: 10.1016/j.jprot.2012.09.023
- Sullivan, L., Wall, S. J., Carrington, M., and Ferguson, M. A. (2013). Proteomic selection of immunodiagnostic antigens for human African trypanosomiasis and generation of a prototype lateral flow immunodiagnostic device. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7:e2087. doi: 10.1371/journal.pntd.0002087
- Supuran, C. T. (2008). Carbonic anhydrases—an overview. *Curr. Pharm. Des.* 14, 603–614. doi: 10.2174/138161208783877884
- Tarcha, E. J., Basrur, V., Hung, C. Y., Gardner, M. J., and Cole, G. T. (2006). Multivalent recombinant protein vaccine against coccidioidomycosis. *Infect. Immunol.* 74, 5802–5813. doi: 10.1128/IAI.00961-06
- Teixeira, M. M., Theodoro, R. C., de Carvalho, M. J., Fernandes, L., Paes, H. C., Hahn, R. C., et al. (2009). Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol. Phylogenet. Evol.* 52, 273–283. doi: 10.1016/j.ympev.2009.04.005
- Teixeira, M. M., Theodoro, R. C., Nino-Vega, G., Bagagli, E., and Felipe, M. S. (2014). *Paracoccidioides* species complex: ecology, phylogeny, sexual reproduction, and virulence. *PLoS Pathog.* 10:e1004397. doi: 10.1371/journal.ppat.1004397
- Theodoro, R. C., Teixeira Mde, M., Felipe, M. S., Paduan Kdos, S., Ribolla, P. M., San-Blas, G., et al. (2012). Genus paracoccidioides: species recognition and biogeographic aspects. *PLoS One* 7:e37694. doi: 10.1371/journal.pone.0037694
- Tokarz, R., Tagliaferro, T., Caciula, A., Mishra, N., Thakkar, R., Chauhan, L. V., et al. (2019). Identification of immunoreactive linear epitopes of *Borrelia miyamotoi*. *Ticks Tick Borne Dis.* 11:101314. doi: 10.1016/j.ttbdis.2019.101314
- Tomazett, M. V., Zanoelo, F. F., Bailao, E. F., Bailao, A. M., Borges, C. L., and Soares, C. M. (2016). Molecular and biochemical characterization of carbonic anhydrases of *Paracoccidioides*. *Genet. Mol. Biol.* 39, 416–425. doi: 10.1590/1678-4685-GMB-2015-0213
- Turissini, D. A., Gomez, O. M., Teixeira, M. M., McEwen, J. G., and Matute, D. R. (2017). Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*. *Fungal Genet. Biol.* 106, 9–25. doi: 10.1016/j.fgb.2017.05.007
- Vale, D. L., Dias, D. S., Machado, A. S., Ribeiro, P. A. F., Lage, D. P., Costa, L. E., et al. (2019). Diagnostic evaluation of the amastin protein from *Leishmania infantum* in canine and human visceral leishmaniasis and immunogenicity in human cells derived from patients and healthy controls. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 95, 134–143. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2019.04.015
- Virginio, E. D., Kubitschek-Barreira, P. H., Batista, M. V., Schirmer, M. R., Abdelhay, E., Shikanai-Yasuda, M. A., et al. (2014). Immunoproteome of *Aspergillus fumigatus* using sera of patients with invasive aspergillosis. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 14505–14530. doi: 10.3390/ijms150814505
- Wanke, B., and Londero, A. T. (1994). Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection. *Paracoccidioidomycosis* 1, 109–120. doi: 10.1201/9781351075329-7
- Weber, S. S., Parente, A. F., Borges, C. L., Parente, J. A., Bailao, A. M., and de Almeida Soares, C. M. (2012). Analysis of the secretomes of *Paracoccidioides* mycelia and yeast cells. *PLoS One* 7:e52470. doi: 10.1371/journal.pone.0052470
- Yao, L., Chen, Y., Wang, X., Bi, Z., Xiao, Q., Lei, J., et al. (2019). Identification of antigenic epitopes in the haemagglutinin protein of H7 avian influenza virus. *Avian Pathol.* 49, 62–73. doi: 10.1080/03079457.2019.1666971
- Zancope-Oliveira, R. M., Pizzini, C. V., de Medeiros Muniz, M., do Valle, A. C. F., and Almeida-Paes, R. (2014). Diagnostic aspects of paracoccidioidomycosis. *Curr. Trop. Med. Rep.* 1, 111–118. doi: 10.1007/s40475-014-0022-y
- Zhang, S., Cai, X., Luo, X., Wang, S., Guo, A., Hou, J., et al. (2018). Molecular cloning and characterization of leucine aminopeptidase gene from *Taenia pisiformis*. *Exp. Parasitol.* 186, 1–9. doi: 10.1016/j.exppara.2018.01.012

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Moreira, Oliveira, Silva, Inácio, Bailão, Parente-Rocha, Cruz-Leite, Pაცეც, de Almeida Soares, Weber and Borges. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## 5 DISCUSSÃO

---

Neste trabalho, um total de 79 proteínas foram identificadas em *P. lutzii*, *P. americana*, *P. brasiliensis* e *P. restrepiensis*. Entre essas, 73 foram caracterizadas e 6 identificadas como proteínas hipotéticas. Esses dados fornecem a primeira identificação em larga escala de antígenos secretados por espécies de *Paracoccidioides*. Algumas dessas proteínas já foram identificadas e caracterizadas como antígenos de fungos patogênicos, como a HSP60 (Izacc *et al.*, 2001; Cunha *et al.*, 2002), HSP70 (Bromuro *et al.*, 1998; Bisio *et al.*, 2005), Serino protease (Parente *et al.*, 2010; Lacerda Pigosso *et al.*, 2017), Formamidase (Borges *et al.*, 2005; Borges *et al.*, 2010), Dihidrolipoil desidrogenase (Landgraf *et al.*, 2017) e Isocitrato liase (Cruz *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2019). Isso demonstra a robustez das técnicas imunoproteômicas utilizadas em nossas análises.

No atual estudo, a integridade celular de *Paracoccidioides* spp., foi confirmada por PCR. Por meio destas análises, foi verificada a ausência de material genético em amostra de extrato secretado por fungos. Caso contrário, a amplificação por PCR demonstraria o processo de lise celular de leveduras de *Paracoccidioides* e, conseqüentemente, a presença de proteínas citoplasmáticas nas amostras, o que poderia interferir em futuras análises. Isso evidencia a qualidade dos dados obtidos, uma vez que comprova a pureza dos extratos utilizados para análises. Além disso, resultados semelhantes foram obtidos em análises de secretomas de *Paracoccidioides lutzii* (Weber *et al.*, 2012).

Subseqüentemente, verificamos o perfil proteico dos extratos secretados obtidos pelas espécies de *Paracoccidioides* utilizadas no estudo. Com isso, observamos que o perfil eletroforético entre as espécies de *Paracoccidioides* apresentavam similaridades, exceto na faixa de 45 kDa, onde foram observadas diferenças no perfil de expressão de proteínas nos secretomas analisados. Entre as espécies analisadas, *P. lutzii* e *P. restrepiensis* apresentaram o perfil eletroforético semelhante. Porém, em *P. americana*, foi observado uma elevada expressão de proteínas nessa faixa 45 kDa, enquanto que

para *P. brasiliensis* essa expressão não foi observada. Em adição, os perfis de pesos moleculares das proteínas obtidas apresentaram uma variação entre 16 a 103 kDa, sendo compatíveis com os perfis eletroforéticos de secretomas de *Paracoccidioides* spp. descritos em estudos anteriores (Weber *et al.*, 2012; De Oliveira *et al.*, 2018), sustentando que os fungos do gênero *Paracoccidioides* secretam uma variedade complexa de proteínas de diversos pesos moleculares.

Analisamos também os perfis de exoantígenos secretados por espécies de *Paracoccidioides* e realizamos análises comparativas dos perfis antigênicos das quatro espécies estudadas. Com isso, observou-se que nenhuma espécie de *Paracoccidioides* apresentava o perfil de exoantígenos semelhante. Esta heterogeneidade de perfis antigênicos entre as espécies pode ser explicada por diferentes constituições genéticas dos fungos deste gênero, conforme relatado anteriormente (Pigozzo *et al.*, 2013; Do Amaral *et al.*, 2019).

Atualmente, a imunoprecipitação é uma técnica usada para purificar extratos protéicos, analisar interações proteína-proteína, concentrar moléculas de baixa abundância, precipitar antígenos e também pode ser utilizada em estudos de modificações pós-traducionais (Lund-Johansen *et al.*, 2000). Após a utilização dessa técnica, observamos a presença de bandas imunorreativas quando o soro de animais imunizados foi utilizado em comparação às amostras controle. Em adição, esse perfil de resposta também foi observado durante a análise imunoproteômica. Resultados similares foram observados quando a imunoprecipitação foi usada para a purificação de antígenos de *Trypanosoma brucei gambiense*, com subsequente construção de novos testes diagnósticos para a Tripanossomíase Africana (Sullivan *et al.*, 2013). Além disso, verificamos que os padrões de bandas imunorreativas observadas durante as análises são distintas entre as espécies, embora alguns exoantígenos estivessem presentes em todas as espécies de *Paracoccidioides* analisadas, como demonstrado pelas análises imunoproteômicas. Pode-se concluir que essas diferenças são devidas as variabilidades genéticas entre as espécies de *Paracoccidioides*, como observado em outros trabalhos (Pigozzo *et al.*, 2013; Do Amaral *et al.*, 2019). Assim, a utilização desta técnica para a purificação de moléculas antigênicas demonstrou-se altamente eficaz na obtenção dos exoantígenos de *Paracoccidioides* spp..

Adicionalmente, verificamos que as classes funcionais mais abundantes de exoantígenos foram relacionadas ao metabolismo, energia e endereçamento proteico. Estes dados são condizentes com análises de secretoma de *P. lutzii* e *P. restrepiensis*

(Weber et al., 2012; De Oliveira et al., 2018) e vesículas secretadas por outros fungos patogênicos (Albuquerque *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2010; Rodrigues *et al.*, 2014). Além disso, verificamos que o perfil proteico obtido, incluindo análises da massa molecular e ponto isoelétrico (*pI*), são consistentes com outras análises realizadas em secretomas de *Paracoccidioides* sp., onde o *pI* caracterizado apresentou variações de 3,76 a 10,18 (Weber et al., 2012). Adicionalmente, a predição de localização subcelular demonstrou que a maioria das proteínas pertencem ao compartilhamento citoplasmático e mitocondrial, porém essas moléculas foram identificadas como secretadas durante o nosso estudo. Além disso, em outro trabalho, proteínas pertencentes ao compartimento citoplasmático foram identificadas e descritas apresentando funções não-clássicas em outras localizações celulares, sendo denominadas proteínas *moonlighting* (Karkowska-Kuleta e Kozik, 2014). Acreditamos que a secreção desses exoantígenos possam estar relacionadas à virulência de *Paracoccidioides* spp., uma vez que, demonstrou-se a secreção de moléculas antigênicas em outros patógenos, sendo estas implicadas na virulência durante a interação patógeno-hospedeiro (Oliveira *et al.*, 2010; Campbell *et al.*, 2015).

Como esperado, a identificação de exoantígenos similares foi detectada entre as espécies de *Paracoccidioides*. Quando comparadas as proteínas identificadas, algumas moléculas, como Malato desidrogenase NAD-dependente, HSP70 e 2-metilcitrato sintase foram presentes em todas as espécies analisadas. Por sua vez, 7, 4, 7 e 17 exoantígenos de *P. lutzii*, *P. americana*, *P. brasiliensis* e *P. restrepiensis*, respectivamente, foram identificados como exclusivos para cada um desses isolados durante as análises imunoproteômicas. Análises anteriores demonstraram moléculas expressas de forma diferenciada e constitutiva entre as espécies de *Paracoccidioides* (Pigosso et al., 2013; Do Amaral et al., 2019). Porém, análises de proteínas exclusivas entre os isolados se tornam excelentes biomarcadores a serem utilizadas no diagnóstico diferencial da PCM, no entanto, análises adicionais devem ser realizadas para elucidar o potencial antigênico dessas proteínas.

Análises de homologia foram utilizadas com o objetivo de identificar exoantígenos únicos entre as espécies de *Paracoccidioides*. Estas análises foram inicialmente empregadas entre os exoantígenos identificados por nanoUPLC-MS<sup>E</sup>, o que permitiu a identificação de 2 antígenos (PAAG\_05807 e PAAG\_06925) exclusivos para espécie *P. lutzii*. A identificação destes exoantígenos exclusivos abre perspectivas de potenciais biomarcadores a serem utilizados no diagnóstico diferencial da PCM

causada por *P. lutzii*. Posteriormente, todas as sequências dos exoantígenos foram comparadas às sequências antigênicas de outros fungos e bactérias patogênicas, a fim de verificar a homologia dessas moléculas a outros organismos. Para essas análises comparativas, também foram empregadas em sequências humanas (Virginio *et al.*, 2014; Rodrigues *et al.*, 2015), com o objetivo de selecionar moléculas não homólogas a esse organismo e evitar possíveis reações cruzadas em futuros testes diagnósticos. No entanto, uma pequena porcentagem dos exoantígenos apresentaram uma baixa homologia, sendo representada, em grande parte, nas espécies *P. lutzii* e *P. americana*. Como a análise de homologia é realizada em toda a sequência do exoantígeno, decidimos verificar a homologia de forma pontual, analisando apenas a homologia dos epítomos preditos por ferramentas bioinformáticas. Assim, foram identificados 44 epítomos exclusivos e conservados pertencentes ao complexo *Paracoccidioides*, sendo estas moléculas, biomarcadores candidatos ao diagnóstico da PCM. Além disso, os epítomos exclusivos e conservados que foram identificados durante as análises, foram presentes em maiores quantidades nos exoantígenos Endo-1,3(4)-beta-glucanase, Anidrase carbônica, Aminopeptidase 2, endonuclease G, Serine protease e ATP sintase, subunidade D.

Similarmente a outros fungos, a parede celular de *Paracoccidioides* spp. é composto por uma rede de polissacarídeos e glicoproteínas, que agem para proteger a célula de agentes estressores ambientais (De Groot *et al.*, 2005). Estudos recentes demonstraram que tanto a fase leveduriforme, quanto a miceliana de *Paracoccidioides* spp. apresentam quantidades significativas de  $\beta$ - (1,3) glucanas (Camacho e Nino-Vega, 2017). No entanto, enzimas como endo  $\beta$ -(1,3)-glucanase atuam hidrolisando as cadeias  $\beta$ -glucanas, sendo estas, de extrema importância nos processos morfológicos da célula fúngica (Adams, 2004). A endo-1,3(4)-beta-glucanase foi encontrada como um antígeno secretado em leveduras de *P. americana*, *P. brasiliensis* e *P. restrepiensis* durante nossas análises. Esta enzima também foi detectada como secretada em análises proteômicas de levedura de *H. capsulatum* (Garfoot *et al.*, 2017). Adicionalmente, a Endo-1,3(4)-beta-glucanase apresentou baixa homologia quando comparada a outros fungos e bactérias patogênicas como *C. immitis*, *H. capsulatum*, *A. fumigatus*, *S. schenckii*, *C. albicans*, *M. tuberculosis* e *S. pneumoniae*. Apesar de apresentar baixa homologia, decidimos investigar o nível de homologia entre os epítomos dessa molécula. Durante a análise, 7 epítomos específicos de células B apresentaram-se como epítomos

exclusivos para o complexo *Paracoccidioides*, sendo excelentes moléculas candidatas à síntese de novos testes de diagnóstico para PCM.

Curiosamente, a anidrase carbônica (CA) de *Paracoccidioides* spp. foi primeiramente relatada como um exoantígeno no presente estudo. Esta molécula é apresentada como uma metaloenzima e age catalisando uma hidratação reversível de CO<sub>2</sub> para gerar HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Supuran, 2008). Além disso, em *Paracoccidioides* sp. 4 genes codantes para anidrase carbônica já foram descritos, levando à síntese de proteínas CA1, CA2 e CA3 para a classe β e proteína CA4 para a classe α. Adicionalmente, esta enzima foi positivamente regulada em leveduras de *Paracoccidioides* sp. quando comparada à fase miceliana do fungo (Tomazett *et al.*, 2016). Em *Stenocarpella macrospora*, a CA já foi descrita nos compartimentos citoplasmático, mitocondriais e extracelular (Elleuche e Poggeler, 2010). No trabalho atual, a CA foi identificada como um exoantígeno e foi associada ao compartimento extracelular. Além disso, CA apresentou 2 epítomos exclusivos do complexo *Paracoccidioides*, o que torna esta molécula um biomarcador candidato ao diagnóstico da PCM. Em adição, este exoantígeno pode ser caracterizado como uma proteína *moonlighting*, uma vez que tem uma função metabólica no citoplasma e quando exportado para o ambiente extracelular, provavelmente está relacionado à virulência do fungo. Além disso, essa molécula foi descrita como relacionada à morfogênese e crescimento de *Paracoccidioides* sp. e *C. neoformans* (Bahn *et al.*, 2005; Costa *et al.*, 2007) durante o processo infeccioso, sugerindo a importância dessa molécula durante a interação patógeno-hospedeiro.

A aminopeptidase 2 foi identificada como exoantígeno durante as nossas análises. Estas moléculas são caracterizadas como exopeptidases e atuam na clivagem de peptídeos de proteínas em sua região N-terminal (Gonzales e Robert-Baudouy, 1996). Em secretomas do micélio de *Aspergillus oryzae*, a aminopeptidase estava relacionada aos processos de degradação do colágeno (Ding *et al.*, 2014). Além disso, em um estudo recente, esta molécula demonstrou seu potencial antigênico durante a expressão de proteínas recombinantes de *Fasciola hepática*, quando sondadas por anticorpos de pacientes com fasciolíase (Mirzadeh *et al.*, 2018) e contra anticorpos monoclonais anti-aminopeptidase de *Tenia pisiformis* (Zhang *et al.*, 2018). A antigenicidade dessa molécula também foi atestada em ovos e vermes adultos de *Schistosoma mansoni* após testes de infecção de camundongos (Maggioli *et al.*, 2018). Durante análises imunoproteômicas de micélios de *Aspergillus terreus*, esta molécula apresentou alta antigenicidade quando sondada por anticorpos monoclonais 13E11,

demonstrando seu perfil antigênico (Nayak *et al.*, 2011). Em nossas análises, essa molécula foi identificada em *P. americana* e *P. brasiliensis*, onde 1 epítipo foi caracterizado (KIEVASNPSVTVNEDNETAT) como sendo exclusivo do complexo *Paracoccidioides*. Estas características indicam que este exoantígeno pode ser um excelente candidato a ser testado como biomarcador específico para o diagnóstico de infecções causadas por espécies de *Paracoccidioides*.

Portanto, uma análise mais aprofundada deve ser realizada para investigar o potencial dessas moléculas como biomarcadores, o que pode contribuir para a preparação de um teste de diagnóstico rápido e específico para PCM, bem como para investigar o potencial imunogênico dessas moléculas e seu possível uso na terapia de doença.

## 6 CONCLUSÕES

---

Aqui, novos conhecimentos sobre exoantígenos de leveduras de *Paracoccidioides* spp. foram obtidos. Durante nossas análises, foram observadas diferenças nos perfis de expressão de exoantígenos entre as espécies de *Paracoccidioides*. Isto é extrema importância, uma vez que as diferenças nos níveis de expressão dos antígenos secretados podem levar à identificação de novos biomarcadores específicos para cada espécie do fungo em estudo.

Além disso, a utilização de *nanoUPLC-MS<sup>E</sup>* permitiu a caracterização de 15, 14, 17 e 33 exoantígenos em *P. lutzii*, *P. americana*, *P. brasiliensis* e *P. restrepiensis*, respectivamente. Adicionalmente, a utilização de ferramentas de bioinformática permitiu verificar as funções biológicas, homologia dos exoantígenos identificados e também prever os epítomos exclusivos durante as análises. Dois exoantígenos foram identificados e descritos neste trabalho como únicos para a espécie *P. lutzii* (PAAG\_05807 e PAAG\_06925). Além disso, 44 epítomos exclusivos do complexo de *Paracoccidioides* foram mapeados utilizando as ferramentas de bioinformática. Também identificamos um total de 13 epítomos presente entre as 4 espécies de *Paracoccidioides* estudadas, sendo essas moléculas excelentes biomarcadores a serem utilizados em futuros estudos epidemiológicos da PCM. Com isso, esses achados demonstram que espécies de *Paracoccidioides* possuem uma gama de epítomos exclusivos para o complexo e para cada espécie de fungo. Os achados de moléculas exclusivas do complexo *Paracoccidioides* poderão levar à síntese de testes diagnósticos específicos para PCM, bem como evidenciar qual espécie do fungo podem estar causando a doença.

## 7 RECOMENDAÇÕES

---

Recomenda-se:

- Avaliar as moléculas PAAG\_05807 e PAAG\_06925 como potenciais biomarcadores da PCM ocasionada por *P. lutzii*;
- Realizar a síntese dos epítopos antigênicos identificados durante as análises e avaliar os níveis de sensibilidade/especificidade por meio de ELISA;
- Após atestar os níveis de sensibilidade/especificidade, realizar a confecção de testes de diagnóstico rápido (imunocromatografia de fluxo lateral) para a PCM;
- Verificar os índices de especificidade/sensibilidade dos epítopos exclusivos para cada espécie do fungo, com o objetivo de utilização no monitoramento epidemiológico da doença.

## REFERÊNCIAS

---

ADAMS, D. J. Fungal cell wall chitinases and glucanases. **Microbiology**, v. 150, n. Pt 7, p. 2029-35, Jul 2004.

ALBUQUERQUE, C.; DA SILVA, S. M.; CAMARGO, Z. P. Improvement of the specificity of an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of paracoccidioidomycosis. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1944-1946, 2005.

ALBUQUERQUE, P. C. et al. Vesicular transport in *Histoplasma capsulatum*: an effective mechanism for trans-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes. **Cell Microbiol**, v. 10, n. 8, p. 1695-710, Aug 2008.

ALMEIDA, S. R.; UNTERKIRCHER, C. S.; CAMARGO, Z. P. Involvement of the major glycoprotein (gp43) of *Paracoccidioides brasiliensis* in attachment to macrophages. **Med Mycol**, v. 36, n. 6, p. 405-11, Dec 1998.

ANGELA RESTREPO, M. Immune response to *Paracoccidioides brasiliensis* in human and animal hosts. **Curr Top Med Mycol**, v. 2, p. 239-77, 1988.

ARISTIZABAL, B. H. et al. Experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice: influence of the hormonal status of the host on tissue responses. **Med Mycol**, v. 40, n. 2, p. 169-78, Apr 2002.

BAGAGLI, E. et al. *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 197-207, Apr-May 2008.

BAHN, Y. S. et al. Carbonic anhydrase and CO<sub>2</sub> sensing during *Cryptococcus neoformans* growth, differentiation, and virulence. **Curr Biol**, v. 15, n. 22, p. 2013-20, Nov 22 2005.

BAR, E. et al. A novel Th cell epitope of *Candida albicans* mediates protection from fungal infection. **J Immunol**, v. 188, n. 11, p. 5636-43, Jun 1 2012.

BELLISSIMO-RODRIGUES, F.; MACHADO, A. A.; MARTINEZ, R. Paracoccidioidomycosis epidemiological features of a 1,000-cases series from a hyperendemic area on the southeast of Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, v. 85, n. 3, p. 546-50, Sep 2011.

BICALHO, R. N. et al. Oral paracoccidioidomycosis: a retrospective study of 62 Brazilian patients. **Oral Dis**, v. 7, n. 1, p. 56-60, Jan 2001.

- BISIO, L. C. et al. A new *Paracoccidioides brasiliensis* 70-kDa heat shock protein reacts with sera from paracoccidioidomycosis patients. **Med Mycol**, v. 43, n. 6, p. 495-503, Sep 2005.
- BJELLQVIST, B. et al. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. **Journal of biochemical and biophysical methods**, v. 6, n. 4, p. 317-339, 1982.
- BORGES, C. L. et al. Detection of a homotetrameric structure and protein-protein interactions of *Paracoccidioides brasiliensis* formamidase lead to new functional insights. **FEMS Yeast Res**, v. 10, n. 1, p. 104-113, Feb 2010.
- BORGES, C. L. et al. The antigenic and catalytically active formamidase of *Paracoccidioides brasiliensis*: protein characterization, cDNA and gene cloning, heterologous expression and functional analysis of the recombinant protein. **Microbes Infect**, v. 7, n. 1, p. 66-77, Jan 2005.
- BROMURO, C. et al. A 70-kilodalton recombinant heat shock protein of *Candida albicans* is highly immunogenic and enhances systemic murine candidiasis. **Infect Immun**, v. 66, n. 5, p. 2154-62, May 1998.
- CAMACHO, E.; NINO-VEGA, G. A. *Paracoccidioides* Spp.: Virulence Factors and Immune-Evasion Strategies. **Mediators Inflamm**, v. 2017, p. 5313691, 2017.
- CAMARGO, Z. P. et al. Monoclonal antibody capture enzyme immunoassay for detection of *Paracoccidioides brasiliensis* antibodies in paracoccidioidomycosis. **J Clin Microbiol**, v. 32, n. 10, p. 2377-81, Oct 1994.
- CAMPBELL, L. T. et al. *Cryptococcus* strains with different pathogenic potentials have diverse protein secretomes. **Eukaryot Cell**, v. 14, n. 6, p. 554-63, Jun 2015.
- CARRERO, L. L. et al. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. **Fungal Genet Biol**, v. 45, n. 5, p. 605-12, May 2008.
- CAVALCANTI, M. C. et al. Managing structural genomic workflows using Web services. **Data & Knowledge Engineering**, v. 53, p. 45-74, 2005.
- CHAURAND, P. et al. Proteomics in diagnostic pathology: profiling and imaging proteins directly in tissue sections. **Am J Pathol**, v. 165, n. 4, p. 1057-68, Oct 2004.
- CISALPINO, P. S. et al. Cloning, characterization, and epitope expression of the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Biol Chem**, v. 271, n. 8, p. 4553-60, Feb 23 1996.
- CORREA, M. M. et al. Diagnosis of paracoccidioidomycosis by a dot blot assay using a recombinant *Paracoccidioides brasiliensis* p27 protein. **Mycoses**, v. 50, n. 1, p. 41-7, Jan 2007.

COSTA, A. N. et al. The lung in paracoccidioidomycosis: new insights into old problems. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 68, n. 4, p. 441-8, Apr 2013.

COSTA, M. et al. Transcriptome profiling of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast-phase cells recovered from infected mice brings new insights into fungal response upon host interaction. **Microbiology**, v. 153, n. Pt 12, p. 4194-207, Dec 2007.

COSTA, M. E. et al. Conventional versus molecular diagnostic tests. **Sabouraudia**, v. 38, n. Supplement\_1, p. 139-145, 2000.

COUTINHO, Z. F. et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cad Saude Publica**, v. 18, n. 5, p. 1441-54, Sep-Oct 2002.

COUTINHO, Z. F. et al. Hospital morbidity due to paracoccidioidomycosis in Brazil (1998-2006). **Trop Med Int Health**, v. 20, n. 5, p. 673-680, May 2015.

CRUZ, A. H. et al. Phosphorylation is the major mechanism regulating isocitrate lyase activity in *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells. **FEBS J**, v. 278, n. 13, p. 2318-32, Jul 2011.

CUNHA, D. A. et al. Heterologous expression, purification, and immunological reactivity of a recombinant HSP60 from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 9, n. 2, p. 374-7, Mar 2002.

CURCIN, V.; GHANEM, M.; GUO, Y. Web services in the life sciences. **Drug Discov Today**, v. 10, n. 12, p. 865-71, Jun 15 2005.

DA FONSECA, C. A. et al. Two-dimensional electrophoresis and characterization of antigens from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes Infect**, v. 3, n. 7, p. 535-42, Jun 2001.

DA SILVA NETO, B. R. et al. The malate synthase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a linked surface protein that behaves as an anchorless adhesin. **BMC Microbiol**, v. 9, p. 272, Dec 24 2009.

DA SILVA, S. H. et al. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* gp70 circulating antigen and follow-up of patients undergoing antimycotic therapy. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 10, p. 4480-6, Oct 2004.

DANTAS, S. F. et al. Identification and characterization of antigenic proteins potentially expressed during the infectious process of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes Infect**, v. 11, n. 10-11, p. 895-903, Sep 2009.

DE BASTOS ASCENCO SOARES, R. et al. Vaccination with heat shock protein 60 induces a protective immune response against experimental *Paracoccidioides brasiliensis* pulmonary infection. **Infect Immun**, v. 76, n. 9, p. 4214-21, Sep 2008.

DE CAMARGO, Z. P. Serology of paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 289-302, Apr-May 2008.

- DE CAMARGO, Z. P.; DE FRANCO, M. F. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Rev Iberoam Micol**, v. 17, n. 2, p. 41-8, Jun 2000.
- DE GROOT, P. W.; RAM, A. F.; KLIS, F. M. Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls. **Fungal Genet Biol**, v. 42, n. 8, p. 657-75, Aug 2005.
- DE MATTOS GROSSO, D. et al. Characterization of gp70 and anti-gp70 monoclonal antibodies in *Paracoccidioides brasiliensis* pathogenesis. **Infect Immun**, v. 71, n. 11, p. 6534-42, Nov 2003.
- DE OLIVEIRA, A. R. et al. Characterization of extracellular proteins in members of the *Paracoccidioides* complex. **Fungal Biol**, v. 122, n. 8, p. 738-751, Aug 2018.
- DEL NEGRO, G. et al. General clinical aspects: polar forms of paracoccidioidomycosis, the disease in childhood. **Paracoccidioidomycosis**. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla, p. 225-232, 1994.
- DEL NEGRO, G. M. et al. Evaluation of tests for antibody response in the follow-up of patients with acute and chronic forms of paracoccidioidomycosis. **J Med Microbiol**, v. 49, n. 1, p. 37-46, Jan 2000.
- DESJARDINS, C. A. et al. Comparative genomic analysis of human fungal pathogens causing paracoccidioidomycosis. **PLoS Genet**, v. 7, n. 10, p. e1002345, Oct 2011.
- DIEZ, S. et al. *Paracoccidioides brasiliensis* 87-kilodalton antigen, a heat shock protein useful in diagnosis: characterization, purification, and detection in biopsy material via immunohistochemistry. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 2, p. 359-65, Feb 2002.
- DING, G. W.; ZHOU, N. D.; TIAN, Y. P. Over-expression of a proline specific aminopeptidase from *Aspergillus oryzae* JN-412 and its application in collagen degradation. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 173, n. 7, p. 1765-77, Aug 2014.
- DINIZ, S. N. et al. Expression in bacteria of the gene encoding the gp43 antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*: immunological reactivity of the recombinant fusion proteins. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 9, n. 6, p. 1200-4, Nov 2002.
- DO AMARAL, C. C. et al. Proteomic analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* complex isolates: Correlation of the levels of differentially expressed proteins with in vivo virulence. **PLoS One**, v. 14, n. 7, p. e0218013, 2019.
- DURAN, C. et al. Molecular Genetic Markers: Discovery, Applications, Data Storage and Visualisation. v. 61, p. 16-27, 2009.
- ELLEUCHE, S.; POGGELER, S. Carbonic anhydrases in fungi. **Microbiology**, v. 156, n. Pt 1, p. 23-9, Jan 2010.
- ERJAVEC, Z.; VERWEIJ, P. E. Recent progress in the diagnosis of fungal infections in the immunocompromised host. **Drug Resist Updat**, v. 5, n. 1, p. 3-10, Feb 2002.

EUBEL, H. et al. Novel proteins, putative membrane transporters, and an integrated metabolic network are revealed by quantitative proteomic analysis of Arabidopsis cell culture peroxisomes. **Plant Physiol**, v. 148, n. 4, p. 1809-29, Dec 2008.

FABRIS, L. R. et al. Decreasing prevalence of the acute/subacute clinical form of paracoccidioidomycosis in Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 56, n. 2, p. 121-5, Mar-Apr 2014.

FAÇANHA, M. C. et al. Paracoccidioidomycosis—description of two cases autochthonous in Ceará. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 86-88, 2010.

FAVA, S. D. C.; NETTO, C. F. Epidemiologic surveys of histoplasmin and paracoccidioidin sensitivity in Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 40, n. 3, p. 155-64, May-Jun 1998.

FERREIRA-DA-CRUZ, M. F. et al. Study of antibodies in paracoccidioidomycosis: follow-up of patients during and after treatment. **J Med Vet Mycol**, v. 28, n. 2, p. 151-7, 1990.

FERREIRA, A. W.; DO LAGO MORAES, S. **Diagnóstico Laboratorial Das Principais Doenças Infecciosas E Autoimunes**. Grupo Gen-Guanabara Koogan, 2000.

FLAVIA POPI, A. F.; LOPES, J. D.; MARIANO, M. GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. **Cell Immunol**, v. 218, n. 1-2, p. 87-94, Jul-Aug 2002.

FRANCO, M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 25, n. 1, p. 5-18, 1987.

FRANCO, M. et al. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 20, n. 2, p. 129-32, Apr-Jun 1987.

FRANCO, M. et al. Chlamyospore formation by *Paracoccidioides brasiliensis* mycelial form. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 31, n. 3, p. 151-7, May-Jun 1989.

FRANCO, M. D.; FAVA NETTO, C.; CHAMMA, L. Reação de imunofluorescência indireta para o diagnóstico sorológico da blastomicose sul-americana. Padronização da reação e comparação dos resultados com a reação de fixação do complemento. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v. 15, p. 393-398, 1973.

GANESAN, V.; ASCHERMAN, D. P.; MINDEN, J. S. Immunoproteomics technologies in the discovery of autoantigens in autoimmune diseases. **Biomol Concepts**, v. 7, n. 2, p. 133-43, May 01 2016.

GARFOOT, A. L. et al. Eng1 and Exg8 Are the Major beta-Glucanases Secreted by the Fungal Pathogen *Histoplasma capsulatum*. **J Biol Chem**, v. 292, n. 12, p. 4801-4810, Mar 24 2017.

GAUTAM, P. et al. Identification of novel allergens of *Aspergillus fumigatus* using immunoproteomics approach. **Clin Exp Allergy**, v. 37, n. 8, p. 1239-49, Aug 2007.

GIRES, O. et al. Profile identification of disease-associated humoral antigens using AMIDA, a novel proteomics-based technology. **Cell Mol Life Sci**, v. 61, n. 10, p. 1198-207, May 2004.

GOMEZ, B. L. et al. Use of monoclonal antibodies in diagnosis of paracoccidioidomycosis: new strategies for detection of circulating antigens. **J Clin Microbiol**, v. 35, n. 12, p. 3278-83, Dec 1997.

GONZALES, T.; ROBERT-BAUDOY, J. Bacterial aminopeptidases: properties and functions. **FEMS Microbiol Rev**, v. 18, n. 4, p. 319-44, Jul 1996.

GRINYER, J. et al. Proteomic response of the biological control fungus *Trichoderma atroviride* to growth on the cell walls of *Rhizoctonia solani*. **Curr Genet**, v. 47, n. 6, p. 381-8, Jun 2005.

HARTL, D.; JONES, E. W. Introduction to molecular genetics and genomics. In: Genetics: Analysis of genes and genomes. 6<sup>a</sup> ed. Jones & Bartlett Publishers. p. 854 p, 2004.

HERBERT, B. R. et al. Improved 2-DE of microorganisms after acidic extraction. **Electrophoresis**, v. 27, n. 8, p. 1630-40, Apr 2006.

HERNANDEZ-HARO, C. et al. Immunoproteomic profiling of *Saccharomyces cerevisiae* systemic infection in a murine model. **J Proteomics**, v. 112, p. 14-26, Jan 1 2015.

IZACC, S. M. et al. Molecular cloning, characterization and expression of the heat shock protein 60 gene from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med Mycol**, v. 39, n. 5, p. 445-55, Oct 2001.

JOBINS, S. E. et al. Immunoproteomic approach to elucidating the pathogenesis of cryptococcosis caused by *Cryptococcus gattii*. **J Proteome Res**, v. 9, n. 8, p. 3832-41, Aug 6 2010.

JUNGBLUT, P. R. Proteome analysis of bacterial pathogens. **Microbes Infect**, v. 3, n. 10, p. 831-40, Aug 2001.

KANETSUNA, F. et al. Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Bacteriol**, v. 97, n. 3, p. 1036-41, Mar 1969.

KARKOWSKA-KULETA, J.; KOZIK, A. Moonlighting proteins as virulence factors of pathogenic fungi, parasitic protozoa and multicellular parasites. **Mol Oral Microbiol**, v. 29, n. 6, p. 270-83, Dec 2014.

KNIEMEYER, O. et al. Immunoproteomics of *Aspergillus* for the development of biomarkers and immunotherapies. **Proteomics Clin Appl**, v. 10, n. 9-10, p. 910-921, Oct 2016.

LACAZ, C. D. S. et al. **Tratado de micologia médica**: SciELO Brasil 2002.

LACAZ, C. S. *Paracoccidioides brasiliensis*: morphology; evolutionary cycle; maintenance during saprophytic life; biology, virulence, taxonomy. **Paracoccidioidomycosis**, p. 13-25, 1994.

LACERDA PIGOSSO, L. et al. *Paracoccidioides brasiliensis* presents metabolic reprogramming and secretes a serine proteinase during murine infection. **Virulence**, v. 8, n. 7, p. 1417-1434, Oct 3 2017.

LANDGRAF, T. N. et al. Involvement of Dihydrolipoyl Dehydrogenase in the Phagocytosis and Killing of *Paracoccidioides brasiliensis* by Macrophages. **Front Microbiol**, v. 8, p. 1803, 2017.

LECLERC, M. C.; PHILIPPE, H.; GUEHO, E. Phylogeny of dermatophytes and dimorphic fungi based on large subunit ribosomal RNA sequence comparisons. **J Med Vet Mycol**, v. 32, n. 5, p. 331-41, 1994.

LEE, P. Y. et al. Identification of immunogenic proteins of *Candida parapsilosis* by serological proteome analysis. **J Appl Microbiol**, v. 116, n. 4, p. 999-1009, Apr 2014a.

\_\_\_\_\_. Immunoproteomic analysis of antibody response to cell wall-associated proteins of *Candida tropicalis*. **J Appl Microbiol**, v. 117, n. 3, p. 854-65, Sep 2014b.

LESK, A. M. Introdução à bioinformática. 2ª ed. - Porto Alegre. **Artmed**, p. 384 p, 2008.

LOTH, E. A. et al. Occurrence of 102 cases of paracoccidioidomycosis in 18 months in the Itaipu Lake region, Western Paraná. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 5, p. 636-637, 2011.

LUND-JOHANSEN, F. et al. Flow cytometric analysis of immunoprecipitates: high-throughput analysis of protein phosphorylation and protein-protein interactions. **Cytometry**, v. 39, n. 4, p. 250-9, Apr 1 2000.

LUO, T. et al. Immunoproteomic Analysis of Antibody Responses to Extracellular Proteins of *Candida albicans* Revealing the Importance of Glycosylation for Antigen Recognition. **J Proteome Res**, v. 15, n. 8, p. 2394-406, Aug 05 2016.

MAGALHAES, B. S. et al. Post-secretory events alter the peptide content of the skin secretion of *Hypsiobas raniceps*. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 377, n. 4, p. 1057-61, Dec 26 2008.

MAGGIOLI, G. et al. Expression, purification and characterization of two leucine aminopeptidases of the blood fluke, *Schistosoma mansoni*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 219, p. 17-23, Jan 2018.

- MANGIATERRA, M. et al. Histoplasmin and paracoccidioidin skin reactivity in infantile population of northern Argentina. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 38, n. 5, p. 349-53, Sep-Oct 1996.
- MARQUES, A. F. et al. Additive effect of P10 immunization and chemotherapy in anergic mice challenged intratracheally with virulent yeasts of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes Infect**, v. 10, n. 12-13, p. 1251-8, Oct 2008.
- MARQUES, A. F. et al. Peptide immunization as an adjuvant to chemotherapy in mice challenged intratracheally with virulent yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 8, p. 2814-9, Aug 2006.
- MARQUES, S. A. Paracoccidioidomycose. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 73, 1998.
- MARQUES, S. A. Paracoccidioidomycosis: epidemiological, clinical, diagnostic and treatment up-dating. **An Bras Dermatol**, v. 88, n. 5, p. 700-11, Sep-Oct 2013.
- MARTINEZ, R. Epidemiology of Paracoccidioidomycosis. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 57 Suppl 19, p. 11-20, Sep 2015.
- MATOS, W. B. D. et al. Paracoccidioidomycosis in the state of Maranhão, Brazil: geographical and clinical aspects. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 3, p. 385-389, 2012.
- MATUTE, D. R. et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Mol Biol Evol**, v. 23, n. 1, p. 65-73, Jan 2006.
- MCEWEN, J. G. et al. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. **J Med Vet Mycol**, v. 25, n. 3, p. 165-75, Jun 1987.
- MCEWEN, J. G. et al. Molecular cloning, nucleotide sequencing, and characterization of a 27-kDa antigenic protein from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Fungal Genet Biol**, v. 20, n. 2, p. 125-31, Jun 1996.
- MENDES-GIANNINI, M.; DEL NEGRO, G.; SIQUEIRA, A. Serodiagnosis. **Paracoccidioidomycosis**. **CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla**, p. 345-363, 1994.
- MENDES-GIANNINI, M. J. et al. Detection of the 43,000-molecular-weight glycoprotein in sera of patients with paracoccidioidomycosis. **J Clin Microbiol**, v. 27, n. 12, p. 2842-5, Dec 1989.
- MENDES, R. The gamut of clinical manifestations. **Paracoccidioidomycosis**, v. 2, p. 233-258, 1994.
- MINI, R. et al. Comparative proteomics and immunoproteomics of *Helicobacter pylori* related to different gastric pathologies. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 833, n. 1, p. 63-79, Mar 20 2006.

- MIRZADEH, A. et al. Evaluation of a set of refolded recombinant antigens for serodiagnosis of human fascioliasis. **PLoS One**, v. 13, n. 10, p. e0203490, 2018.
- MOREIRA, A. P. V. Paracoccidioidomicose: histórico, etiologia, epidemiologia, patogênese, formas clínicas, diagnóstico laboratorial e antígenos. **BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista (Online)**, v. 5, n. 51, p. 11-24, 2008.
- MOREJON, K. M.; MACHADO, A. A.; MARTINEZ, R. Paracoccidioidomycosis in patients infected with and not infected with human immunodeficiency virus: a case-control study. **Am J Trop Med Hyg**, v. 80, n. 3, p. 359-66, Mar 2009.
- MUNOZ, J. F. et al. Genome Diversity, Recombination, and Virulence across the Major Lineages of *Paracoccidioides*. **mSphere**, v. 1, n. 5, Sep-Oct 2016.
- MURAD, A. M.; RECH, E. L. NanoUPLC-MSE proteomic data assessment of soybean seeds using the Uniprot database. **BMC Biotechnol**, v. 12, p. 82, Nov 5 2012.
- MURAD, A. M. et al. Detection and expression analysis of recombinant proteins in plant-derived complex mixtures using nanoUPLC-MS(E). **J Sep Sci**, v. 34, n. 19, p. 2618-30, Oct 2011.
- NAYAK, A. P. et al. Monoclonal antibodies to hyphal exoantigens derived from the opportunistic pathogen *Aspergillus terreus*. **Clin Vaccine Immunol**, v. 18, n. 9, p. 1568-76, Sep 2011.
- O'FARRELL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **Journal of biological chemistry**, v. 250, n. 10, p. 4007-4021, 1975.
- OLIVEIRA, D. L. et al. Extracellular vesicles from *Cryptococcus neoformans* modulate macrophage functions. **Infect Immun**, v. 78, n. 4, p. 1601-9, Apr 2010.
- ORTIZ, B. L. et al. Use of the 27-kilodalton recombinant protein from *Paracoccidioides brasiliensis* in serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 5, n. 6, p. 826-30, Nov 1998.
- PANIAGO, A. M. M. et al. Paracoccidioidomicose: estudo clínico e epidemiológico de 422 casos observados no Estado de Mato Grosso do Sul. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 36, n. 4, p. 455-459, 2003.
- PARENTE, J. A. et al. A secreted serine protease of *Paracoccidioides brasiliensis* and its interactions with fungal proteins. **BMC Microbiol**, v. 10, p. 292, Nov 16 2010.
- PEDERSEN, S. K. et al. An immunoproteomic approach for identification of clinical biomarkers for monitoring disease: application to cystic fibrosis. **Mol Cell Proteomics**, v. 4, n. 8, p. 1052-60, Aug 2005.
- PEREIRA, L. A. et al. Analysis of the *Paracoccidioides brasiliensis* triosephosphate isomerase suggests the potential for adhesin function. **FEMS Yeast Res**, v. 7, n. 8, p. 1381-8, Dec 2007.

PEREIRA, L. A. et al. Proteomic identification, nucleotide sequence, heterologous expression and immunological reactivity of the triosephosphate isomerase of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes Infect**, v. 6, n. 10, p. 892-900, Aug 2004.

PIGOSSO, L. L. et al. Comparative proteomics in the genus *Paracoccidioides*. **Fungal Genet Biol**, v. 60, p. 87-100, Nov 2013.

PITARCH, A.; NOMBELA, C.; GIL, C. *Candida albicans* biology and pathogenicity: insights from proteomics. **Methods Biochem Anal**, v. 49, p. 285-330, 2006.

\_\_\_\_\_. Seroprofiling at the *Candida albicans* protein species level unveils an accurate molecular discriminator for candidemia. **J Proteomics**, v. 134, p. 144-162, Feb 16 2016.

PRADO, M. et al. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 3, p. 513-521, 2009.

PROSDOCIMI, F. et al. Manual do usuário. biotecnologia ciência e desenvolvimento., v. 29, p. 15-25, 2002.

PUCCIA, R. et al. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. **Infect Immun**, v. 53, n. 1, p. 199-206, Jul 1986.

QUEIROZ-TELLES, F. *Paracoccidioides brasiliensis*: Ultrastructural findings. **CRS Press, London**, p. 27-44, 1994.

RAPPLEYE, C. A.; GOLDMAN, W. E. Defining virulence genes in the dimorphic fungi. **Annu Rev Microbiol**, v. 60, p. 281-303, 2006.

RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis. **Acta. Med. Colomb**, v. 3, p. 33-36, 1978.

RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **Sabouraudia**, v. 23, n. 5, p. 323-34, Oct 1985.

RESTREPO, A.; CANO, L. E.; TABARES, A. M. A comparison of mycelial filtrate - and yeast lysate - paracoccidioidin in patients with paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 84, n. 1, p. 49-54, Dec 01 1983.

RESTREPO, A.; MCEWEN, J. G.; CASTANEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Med Mycol**, v. 39, n. 3, p. 233-41, Jun 2001.

RESTREPO, A. et al. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. **Infect Immun**, v. 46, n. 2, p. 346-53, Nov 1984.

RIVITTI, E. A.; AOKI, V. Deep fungal infections in tropical countries. **Clin Dermatol**, v. 17, n. 2, p. 171-90; discussion 105-6, Mar-Apr 1999.

- RODRIGUES, A. M. et al. Immunoproteomic analysis reveals a convergent humoral response signature in the *Sporothrix schenckii* complex. **J Proteomics**, v. 115, p. 8-22, Feb 6 2015.
- RODRIGUES, M. L. et al. The impact of proteomics on the understanding of functions and biogenesis of fungal extracellular vesicles. **J Proteomics**, v. 97, p. 177-86, Jan 31 2014.
- RODRIGUES, M. L. et al. Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. **Eukaryot Cell**, v. 7, n. 1, p. 58-67, Jan 2008.
- ROUSSEL, S. et al. Immuno-reactive proteins from *Mycobacterium immunogenum* useful for serodiagnosis of metalworking fluid hypersensitivity pneumonitis. **Int J Med Microbiol**, v. 301, n. 2, p. 150-6, Feb 2011.
- SALINA, M. A. et al. Detection of circulating *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in urine of paracoccidioidomycosis patients before and during treatment. **J Clin Microbiol**, v. 36, n. 6, p. 1723-8, Jun 1998.
- SAN-BLAS, G. *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall glucans, pathogenicity, and dimorphism. **Curr Top Med Mycol**, v. 1, p. 235-57, 1985.
- SAN-BLAS, G.; NINO-VEGA, G.; ITURRIAGA, T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Med Mycol**, v. 40, n. 3, p. 225-42, Jun 2002.
- SHANKAR, J. et al. Influence of 17 beta-estradiol on gene expression of *Paracoccidioides* during mycelia-to-yeast transition. **PLoS One**, v. 6, n. 12, p. e28402, 2011.
- SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. **Rev Soc Bras Med Trop**, p. 0, Jul 20 2017.
- SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. [Guidelines in paracoccidioidomycosis]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 39, n. 3, p. 297-310, May-Jun 2006.
- SHIN, G. W. et al. Immunoproteomic analysis of capsulate and non-capsulate strains of *Lactococcus garvieae*. **Vet Microbiol**, v. 119, n. 2-4, p. 205-12, Jan 31 2007.
- SILVA-VERGARA, M. L. et al. Isolation of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibia, State of Minas Gerais, Brazil. **Med Mycol**, v. 36, n. 1, p. 37-42, Feb 1998.
- SILVA, K. S. F. et al. Interactome of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Points to the Existence of Metabolons in *Paracoccidioides lutzii*. **Front Microbiol**, v. 10, p. 1537, 2019.

SIRCAR, G. et al. Identification of aero-allergens from *Rhizopus oryzae*: an immunoproteomic approach. **J Proteomics**, v. 77, p. 455-68, Dec 21 2012.

SPOSTO, M. R. et al. Oral paracoccidioidomycosis. A study of 36 South American patients. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 75, n. 4, p. 461-5, Apr 1993.

SULLIVAN, L. et al. Proteomic selection of immunodiagnostic antigens for human African trypanosomiasis and generation of a prototype lateral flow immunodiagnostic device. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 2, p. e2087, 2013.

SUPURAN, C. T. Carbonic anhydrases--an overview. **Curr Pharm Des**, v. 14, n. 7, p. 603-14, 2008.

TABORDA, C. P. et al. Mapping of the T-cell epitope in the major 43-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* which induces a Th-1 response protective against fungal infection in BALB/c mice. **Infect Immun**, v. 66, n. 2, p. 786-93, Feb 1998.

TAKAHACHI, G. et al. Importância do western blott no diagnóstico seguro da Paracoccidioidomicose. **VII Encontro Internacional sobre Paracoccidioidomicose**, p. 87, 1999.

TARCHA, E. J. et al. Multivalent recombinant protein vaccine against coccidioidomycosis. **Infect Immun**, v. 74, n. 10, p. 5802-13, Oct 2006.

TEIXEIRA, M. M. et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Mol Phylogenet Evol**, v. 52, n. 2, p. 273-83, Aug 2009.

TEIXEIRA, M. M. et al. *Paracoccidioides* species complex: ecology, phylogeny, sexual reproduction, and virulence. **PLoS Pathog**, v. 10, n. 10, p. e1004397, Oct 2014.

TEIXEIRA, M. M. et al. *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications. **Med Mycol**, v. 52, n. 1, p. 19-28, Jan 2014.

THEODORO, R. C. et al. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. **Med Mycol**, v. 43, n. 8, p. 725-9, Dec 2005.

THEODORO, R. C. et al. Genus *Paracoccidioides*: Species recognition and biogeographic aspects. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e37694, 2012.

THOMAZ, L. et al. Monoclonal antibodies to heat shock protein 60 induce a protective immune response against experimental *Paracoccidioides lutzii*. **Microbes Infect**, v. 16, n. 9, p. 788-95, Sep 2014.

TOMAZETT, M. V. et al. Molecular and biochemical characterization of carbonic anhydrases of *Paracoccidioides*. **Genet Mol Biol**, v. 39, n. 3, p. 416-25, Jul-Sep 2016.

TORRES, I. et al. *Paracoccidioides brasiliensis* PbP27 gene: knockdown procedures and functional characterization. **FEMS Yeast Res**, v. 14, n. 2, p. 270-80, Mar 2014.

TRAVASSOS, L. R. et al. Biochemistry and molecular biology of the main diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Arch Med Res**, v. 26, n. 3, p. 297-304, Autumn 1995.

TSENG, S. C. et al. Proteomic study of biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* ETS 323 in response to *Rhizoctonia solani*. **J Agric Food Chem**, v. 56, n. 16, p. 6914-22, Aug 27 2008.

TURISSINI, D. A. et al. Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*. **Fungal Genet Biol**, v. 106, p. 9-25, Sep 2017.

VALLE, A.; COSTA, R. Paracoccidioidomicose. **Batista RS, Igreja RP, Gomes AD, Huggins DW. Medicina Tropical: abordagem atual das doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro: Cultura Médica**, p. 943-58, 2001.

VICENTINI, A. P. et al. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. **Infect Immun**, v. 62, n. 4, p. 1465-9, Apr 1994.

VIEIRA GDE, D. et al. Paracoccidioidomycosis in a western Brazilian Amazon State: clinical-epidemiologic profile and spatial distribution of the disease. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 47, n. 1, p. 63-8, Jan-Feb 2014.

VIRGINIO, E. D. et al. Immunoproteome of *Aspergillus fumigatus* using sera of patients with invasive aspergillosis. **Int J Mol Sci**, v. 15, n. 8, p. 14505-30, Aug 20 2014.

WALSH, G. M. et al. Mass spectrometry-based proteomics in biomedical research: emerging technologies and future strategies. **Expert Rev Mol Med**, v. 12, p. e30, Sep 23 2010.

WANKE, B.; LONDERO, A. Epidemiology and paracoccidioidomycosis. . In: FRANCO, M.; LACAZ, CS; RESTREPO-MORENO, A. & DEL NEGRO, G. **Boca Raton: CRC Press**, p. 109-120, 1994.

WEBER, S. S. et al. Analysis of the secretomes of *Paracoccidioides* mycelia and yeast cells. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e52470, 2012.

WEISS, W.; GORG, A. Two-dimensional electrophoresis for plant proteomics. **Methods Mol Biol**, v. 355, p. 121-43, 2007.

WILKINS, M. R. et al. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnol Genet Eng Rev**, v. 13, p. 19-50, 1996.

ZHANG, Q. et al. Immune epitope database analysis resource (IEDB-AR). **Nucleic Acids Res**, v. 36, n. Web Server issue, p. W513-8, Jul 1 2008.

ZHANG, S. et al. Molecular cloning and characterization of leucine aminopeptidase gene from *Taenia pisiformis*. **Exp Parasitol**, v. 186, p. 1-9, Mar 2018.

## ANEXOS

### Parecer do Comitê de Ética; Submissão de Artigos; Prêmio; Colaborações

#### Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética, TCLE



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Goiânia, 09 de maio de 2016.

#### PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA DO PROTOCOLO N. 030/2016

I - Finalidade do projeto de pesquisa: Pesquisa

II - Identificação:

- Título do projeto:** Utilização da proteômica na caracterização de antígenos de isolados do complexo *Paracoccidioides* com potencial aplicação na patogenia e diagnóstico da micose sistêmica humana Paracoccidioidomicose
- Pesquisador Responsável/ Unidade:** Dr. Clayton Luiz Borges/ICB 2
- Pesquisadores Participantes:** André Luis Elias Moreira / IPTSP; Vanessa Rafaela Milhomen Cruz Leite / PGBM; Jordana M Carvalho Pardiniho/Faculdade União de Goyases; Alexandre Melo Bailão / UFG; Célia Maria de Almeida Soares/UFG
- Unidade onde será realizado:** Biotério ICB 2
- Data de apresentação a CEUA** 26/04/2016

VI - Parecer da CEUA:

De acordo com a documentação apresentada à CEUA, consideramos o projeto **APROVADO**. Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar à CEUA-PRPI-UFG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, prevista para conclusão em fevereiro de 2018.

VII - Data da reunião: 09/05/2016

  
**Dra. Marina Pacheco Miguel**  
Vice-Coordenadora da CEUA/PRPI/UFG

## Anexo 2 – Comprovantes de submissão dos artigos/ aceite para publicação para artigos ainda não publicados/ dói dos artigos publicados

### Artigo 1:

Frontiers: Your manuscript submission - 492634



Frontiers Microbiology Editorial Office <microbiology.editorial.office@frontiersin.org>  
Ter, 20/08/2019 10:52  
Você



Dear Dr Moreira,

Frontiers Microbiology Editorial Office has sent you a message. Please click 'Reply' to send a direct response

We are pleased to inform you that we have received the manuscript ""Immunoproteomic approach of extracellular antigens from Paracoccidioides species reveals exclusive B-cell epitopes"" to be considered for publication in Frontiers in Microbiology, section Microbial Immunology.

You can access the review forum and track the progress of your manuscript using the following link:  
<http://www.frontiersin.org/Journal/MySubmission.aspx?stage=100>

If you have already created a Frontiers account using a different email address, please add this one as a secondary email to your Frontiers profile following this link:  
<http://loop.frontiersin.org/settings/email>

For any questions on the above, you can contact support@frontiersin.org

You will receive a notification as soon as the interactive review forum is activated and you receive access the review reports. You will then be able to interact directly with the reviewers in the interactive review forum and also re-submit a revised manuscript.

Best regards,

### Artigo 2

Track your recent Co-Authored submission to FUNBIO



Fungal Biology <eesserver@eesmail.elsevier.com>  
Sex, 06/12/2019 17:20  
Você



\*\*\* Automated email sent by the system \*\*\*

Dear Dr. André Luís Moreira,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: **Fungal Biology**

Title: Proteome characterization of Paracoccidioides lutzii conidia by using nanoUPLC-MSE

Corresponding Author: Clayton Borges

Co-Authors: André Luís E Moreira, PhD; Vanessa Rafaela M Cruz-Leite, PhD; Lana O'Hara S Silva, MSc; Ana Flávia A Parente, PhD; Alexandre Melo M Bailão, PhD; Célia Maria A Soares, PhD; Juliana A Parente-Rocha, PhD; Orville H Ruiz, PhD;

To be kept informed of the status of your submission, register or log in (if you already have an Elsevier profile).

Register here: [https://ees.elsevier.com/funbio/default.asp?acw=&qq=preRegistration.asp&user=coauthor&fname=André Luís&lname=Moreira&email=andre.bio.br@hotmail.com](https://ees.elsevier.com/funbio/default.asp?acw=&qq=preRegistration.asp&user=coauthor&fname=André+Luís&lname=Moreira&email=andre.bio.br@hotmail.com)

Or log in: <https://ees.elsevier.com/funbio/default.asp?acw=&qq=logIn.asp&email=andre.bio.br@hotmail.com>

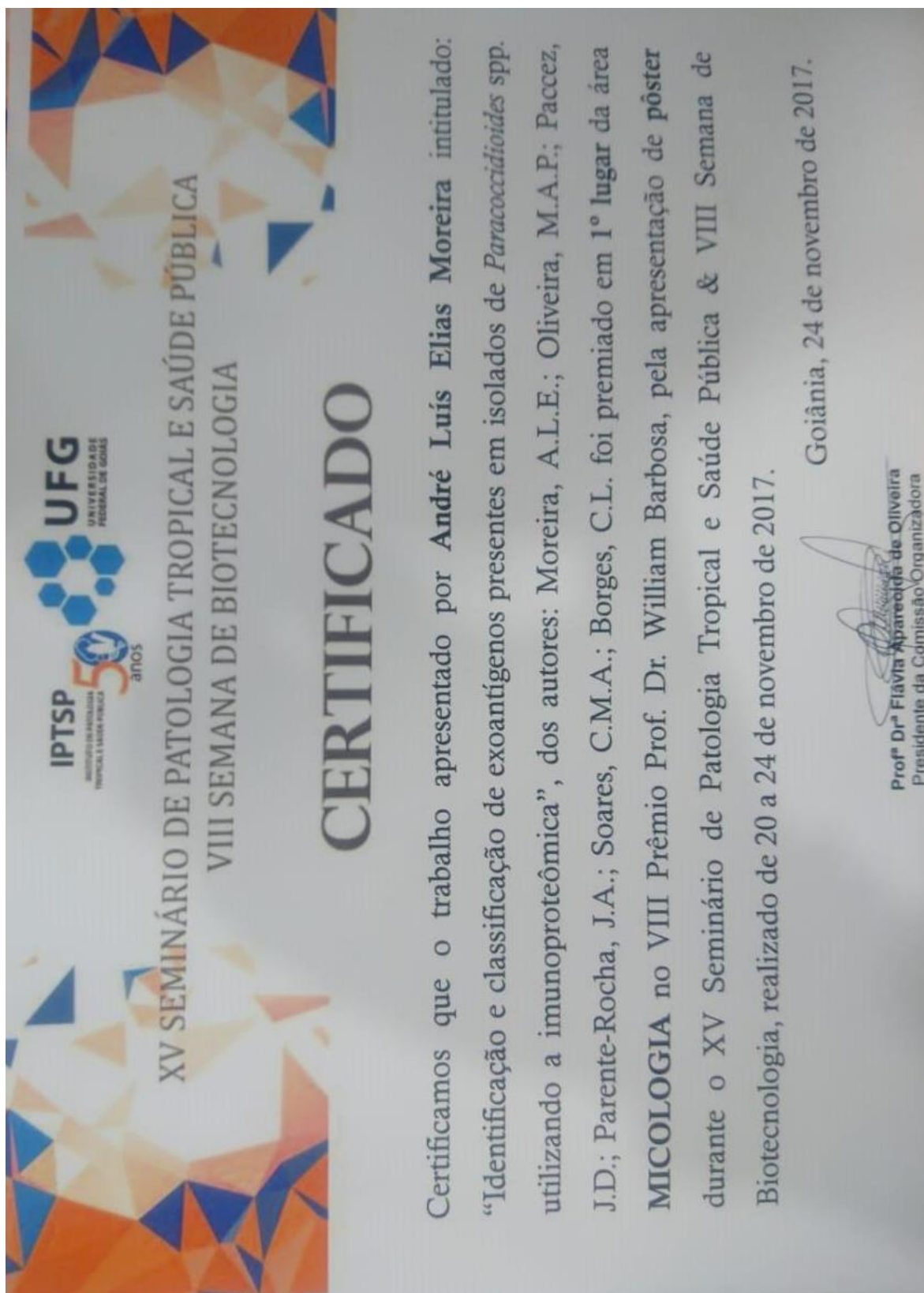
If you did not co-author this submission, please do not follow the above link but instead contact the Corresponding Author of this submission at cbluiz2@gmail.com;clayton@ufg.br.

Thank you,

**Fungal Biology**

### Anexo 3 – Outros anexos

**Prêmio:** (2017) VIII Prêmio Prof. Dr. William Barbosa no XV Seminário de Patologia Tropical e Saúde Pública/VIII Semana de biotecnologia, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública - Universidade Federal de Goiás (IPTSPUFG)



#### Anexo 4: Colaborações.

1 **Artigo 2: Proteome characterization of *Paracoccidioides lutzii* conidia by using**  
2 **nanoUPLC-MS<sup>E</sup>**

3

4 André Luís Elias Moreira<sup>1</sup>, Vanessa Rafaela Milhomem Cruz-Leite<sup>1</sup>, Lana O'Hara Souza  
5 Silva<sup>1</sup>, Ana Flávia Alves Parente<sup>4</sup>, Alexandre Melo Bailão<sup>1</sup>, Célia Maria de Almeida Soares<sup>1</sup>,  
6 Juliana Alves Parente-Rocha<sup>1</sup>, Orville Hernandez Ruiz<sup>2,3</sup>, Clayton Luiz Borges<sup>1\*</sup>.

7 <sup>1</sup>Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal  
8 de Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil.

9 <sup>2</sup>Unidad de Biología Celular y Molecular, Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB),  
10 Medellín, Colombia.

11 <sup>3</sup>Grupo de Investigación MICROBA, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia,  
12 Medellín, Colombia.

13 <sup>4</sup>Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil.

14 \*Corresponding author: Phone/Fax: +55 62 3521 1110. Address: Laboratório de Biologia  
15 Molecular, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências  
16 Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 74690-900, Goiás, Brazil. Clayton Luiz  
17 Borges, e-mail: [clbluiz2@gmail.com](mailto:clbluiz2@gmail.com)



## Potential anti-inflammatory effect of LQFM-021 in carrageenan-induced inflammation: The role of nitric oxide



Iziara F. Florentino<sup>a,\*</sup>, Daiany P.B. Silva<sup>a</sup>, Dayane M. Silva<sup>a</sup>, Carina Sofia Cardoso<sup>a</sup>, André L.E. Moreira<sup>b</sup>, Clayton L. Borges<sup>b</sup>, Célia M. de A. Soares<sup>b</sup>, Pablinny M. Galdino<sup>c</sup>, Luciano M. Lião<sup>d</sup>, Paulo C. Ghedini<sup>a</sup>, Ricardo Menegatti<sup>e</sup>, Elson A. Costa<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Institute of Biological Sciences, Department of Pharmacology, Federal University of Goiás, Campus Samambaia, Goiânia, GO, Brazil

<sup>b</sup> Institute of Biological Sciences, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Goiás, Campus Samambaia, Goiânia, GO, Brazil

<sup>c</sup> Center of Biological Sciences and Health, Federal University of Western Bahia, Barreiras, BA, Brazil

<sup>d</sup> Chemistry Institute, Federal University of Goiás, Campus Samambaia, Goiânia, GO, Brazil

<sup>e</sup> Faculty of Pharmacy, Laboratory of Medicinal Pharmaceutical Chemistry, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 27 October 2016

Received in revised form

22 March 2017

Accepted 11 April 2017

Available online 13 April 2017

#### Keywords:

Anti-inflammatory activity

Cytokines

LQFM-021

Nitric oxide

Pyrazole compound

### ABSTRACT

The pyrazole compound LQFM-021 exhibits vasorelaxant, antinociceptive and anti-inflammatory activities. Furthermore, it has low toxicity, indicating that this compound may be considered to be a good prototype for the development of new analgesic/anti-inflammatory drugs. Therefore, the aim of this study was to investigate the potential anti-inflammatory activity of LQFM-021 using a model of carrageenan-induced inflammation as well as the mechanism of action and role of nitric oxide in this effect. Acute treatments with LQFM-021 (30 and 60 mg/kg p.o.) reduced paw edema formation dose-dependently 2 h after carrageenan injection. In the carrageenan-induced pleurisy test, LQFM-021 (30 mg/kg p.o.) reduced the leukocyte (polymorphonuclear) count in the pleural cavity, as well as decreased protein extravasation and myeloperoxidase activity. This dose of LQFM-021 increased the NO (nitrite/nitrate) and IL-4 levels and decreased the TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels in the pleural cavity. Moreover, pre-treatment with L-NAME reversed the effect of LQFM-021 on NO, leukocyte migration, and the TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels. Additionally, we observed that LQFM-021 showed weak inhibitory activity on cyclooxygenases, but reduced the PGE<sub>2</sub> levels in the pleural cavity. Immunoblot analyses showed that LQFM-021 promoted a decrease in COX-2 levels and increase in iNOS levels. In conclusion, we demonstrated that LQFM-021 has marked anti-inflammatory activity by reducing polymorphonuclear recruitment, which is associated with the inhibition of the production of inflammatory cytokines and eicosanoids. In addition, we found that the synthase/release of nitric oxide promoted by LQFM-021 is essential for the anti-inflammatory effect observed.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.