



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR

AYDA LUZ MALAVER SALAMANCA

**Análise proteômica da parede celular de leveduras de
Paracoccidioides americana e *Paracoccidioides brasiliensis***

GOIÂNIA-GOIÁS

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) 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 9.610/98](#), 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.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese

2. Nome completo do autor

Ayda Luz Malaver Salamanca

3. Título do trabalho

"Análise proteômica da parede celular de leveduras de Paracoccidioides americana e Paracoccidioides brasiliensis"

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado 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.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Celia Maria De Almeida Soares, Professor do Magistério Superior**, em 02/02/2022, às 19:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **AYDA LUZ MALAVER SALAMANCA, Discente**, em 08/02/2022, às 09:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2665698** e o código CRC **04A6EFD2**.

Referência: Processo nº 23070.066615/2021-11

SEI nº 2665698

AYDA LUZ MALAVER SALAMANCA

**Análise proteômica da parede celular de leveduras de
Paracoccidioides americana e *Paracoccidioides brasiliensis***

Tese de doutorado apresentada ao programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás como requisito para a obtenção do título de Doutor em Genética e Biologia Molecular. Área de concentração: Genética e Biologia Molecular. Linha de pesquisa: Genômica funcional, estrutural e proteômica. Trabalho financiado com recursos da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) no projeto Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Interação Patógeno-Hospedeiro (IPH).

Orientadora: Dra. Célia Maria de Almeida Soares

Co-orientadora: Dra. Maristela Pereira

Goiânia

2022

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

Salamanca, Ayda Luz Malaver

Análise proteômica da parede celular de leveduras de *Paracoccidioides americana* e *Paracoccidioides brasiliensis* [manuscrito] / Ayda Luz Malaver Salamanca. - 2021. CXXVI, 126 f.

Orientador: Prof. Dr. Célia Maria de Almeida Soares; co orientador Maristela Pereira.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Goiânia, 2021.

Bibliografia. Anexos.

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

1. PCM. 2. *Paracoccidioides* spp., . 3. CWP. 4. Parede celular. 5. Proteoma. I. Soares, Célia Maria de Almeida , orient. II. Título.

CDU 575



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ATA DE DEFESA DE TESE

Ata Nº 34 da sessão de Defesa de Tese de **Ayda Luz Malaver Salamanca** que confere o título de Doutor(a) em **Genética e Biologia Molecular**, na área de concentração em **Genética e Biologia Molecular**.

Ao/s **vinte e um dias do mês de dezembro de dois mil e vinte e um**, a partir da(s) **14h00**, por videoconferência, seguindo portaria CAPES no. 36 de 16 de março de 2020 e recomendação da UFG, realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese intitulada **“Análise proteômica da parede celular de leveduras de Paracoccidioides americana e Paracoccidioides brasiliensis”**. Os trabalhos foram instalados pelo(a) Orientador(a), Professor(a) Doutor(a) **Célia Maria de Almeida Soares (ICB/UFG)** com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professor(a) Doutor(a) **Relber Aguiar Gonçalves (UMinho)**, membro titular externo; Professor(a) Doutor(a) **Laurine Lacerda Pigosso**, membro titular externo; Professor(a) Doutor(a) **Juliana Alves Parente Rocha (ICB/UFG)**, membro titular interno; Professor(a) Doutor(a) **Maristela Pereira (ICB/UFG)**, membro titular interno; Professor(a) Doutor(a) **Juliana Santana de Curcio**, membro titular externo. Durante a argüição os membros da banca **fizeram** sugestão de alteração do título do **trabalho**. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Tese tendo sido a candidata **aprovada** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo(a) Professor(a) Doutor(a) **Célia Maria de Almeida Soares**, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, ao(s) **vinte e um dias do mês de dezembro de dois mil e vinte e um**.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

“Análise proteômica da parede celular de leveduras de *Paracoccidioides americana* e *Paracoccidioides brasiliensis*”



Documento assinado eletronicamente por **Laurine Lacerda Pigosso, Usuário Externo**, em 21/12/2021, às 17:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Juliana Alves Parente Rocha, Professora do Magistério Superior**, em 21/12/2021, às 17:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Celia Maria De Almeida Soares, Professor do Magistério Superior**, em 21/12/2021, às 17:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Relber Aguiar Goncales, Usuário Externo**, em 21/12/2021, às 17:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Juliana Santana de Curcio, Usuário Externo**, em 21/12/2021, às 17:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2588745** e o código CRC **32558EBF**.

Referência: Processo nº 23070.066615/2021-11

SEI nº 2588745

Banca examinadora

Membros titulares

Dr^a Célia Maria de Almeida Soares

Dr^a Juliana Santana de Curcio

Dr^a Juliana Alves Parente Rocha

Dr. Relber Aguiar Gonçalves

Dr^a Laurine Lacerda Pigosso

Suplentes

Dr^a Mirelle Garcia Silva Bailão

Dr^a Lilian Cristiane Baeza

Data: 21 de Dezembro de 2021

Horario: 14 horas

Local: Defesa realizada por videoconferência via Google Meet, código de reunião:
meet.google.com/qkf-pdaq-cko.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que tem sido meu fiel companheiro em todas as jornadas, em segundo agradeço ao Governo da República Federativa do Brasil e as instituições de fomento por me permitir adiantar meus estudos de doutoramento, assim mesmo, agradeço à Universidade Federal de Goiás por me abrir as portas e me dar a oportunidade de evoluir na minha formação.

Agradeço também a minha orientadora, professora Célia Maria de Almeida Soares que pacientemente me há ajudado no desenvolvimento da minha pesquisa, assim como na revisão e correção de meu portunhol. Agradeço a minha Co-orientadora, professora Maristela Pereira pela orientação e interesse no meu trabalho. Agradeço á professora Angela Adamski, que me permitiu fazer o estágio em docência junto com ela, foi uma etapa de muita aprendizagem.

Agradeço especialmente a meus pais, minha mãe Blanca Cecilia Salamanca Rodriguez, grande guerreira, grande exemplo de mulher, minha melhor amiga e confidente, que sempre tem uma palavra de alento para me dar força para seguir, a meu pai Juan Nepomuceno Malaver meu grande exemplo, exemplo de luta, exemplo de coragem e valentia, que está sempre presente no meu coração e que desde o céu sei que torce pelo melhor para mim e para meus irmãos. Agradeço também especialmente a meus filhos Nadia Sophia e Adrian Roger, os melhores presentes que a vida pode me dar, obrigada meus filhos pela presença na minha vida. Agradeço a meus irmãos Leidy e Andrés, meus eternos cúmplices, minhas almas gêmeas; obrigada a minhas sobrinhas Isabella e Mariana, que aguardam pacientemente o amor da tia; obrigada também a Renan Augusto; você se converteu, em mais que o pai de meus filhos, você se converteu num bom amigo; espero poder contar som sua amizade sempre.

Obrigada também a todo o grupo de profissionais do LBM que me assistiram em momentos de dúvida; obrigada especialmente ao Kleber que sempre teve tão boa disposição para qualquer inquietude que eu tivesse; ao Relber que me animou para escrever um artigo conjuntamente; a Danielle que me orientou nos primeiros passos no laboratório; a Dienny que se converteu numa grande amiga, a Marta com quem tenho sofrido tantas vezes as fases duras deste doutoramento; ao Aparecido que sempre esteve disponível com seu, pois não; ao Igor que foi grande parceiro referente ao proteoma; ao

Leandro pela ajuda nas análises. Agradeço a Amanda que sempre esteve à disposição e me divertia com suas conversas. Obrigada a todos que não consegui lembrar, mas que de algum modo contribuíram no meu trabalho.

*O insucesso é apenas uma oportunidade
para recomeçar com mais inteligência (Henry
Ford)*

SUMÁRIO

| | |
|--------------------------------------------------------|-----|
| CAPÍTULO I..... | 19 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 20 |
| 1.1. Paracoccidioidomicose | 20 |
| 1.2. Biologia do fungo e imunopatogênese | 21 |
| 1.3. Parede celular fúngica | 22 |
| 1.3.1. Estrutura e componentes da parede celular | 22 |
| 1.3.2. Polissacarídeos, quitina e glicanas | 23 |
| 1.3.3. Proteínas de parede celular | 24 |
| 1.3.4. Função das proteínas de parede | 27 |
| 1.3.5. Identificação de proteínas de parede | 32 |
| 2. JUSTIFICATIVA | 35 |
| 3. OBJETIVOS | 37 |
| 3.1. Objetivo geral | 37 |
| 3.2. Objetivos específicos | 37 |
| CAPÍTULO II..... | 38 |
| 4. MANUSCRITO..... | 39 |
| CAPÍTULO III | 108 |
| 5. DISCUSSÃO | 109 |
| 6. CONCLUSÕES/RECOMENDAÇÕES FINAIS | 114 |
| 7. PERSPECTIVAS | 115 |
| 7. BIBLIOGRAFIA | 116 |
| 8. PRODUÇÃO CIENTÍFICA E COLABORAÇÕES | 126 |

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Capítulo I

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Descrição das proteínas da parede celular e suas vias de secreção..... | 25 |
| Figura 2. Estrutura da âncora de GPI..... | 27 |

Capítulo II

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 1. Analysis of protein secretion pathway..... | 48 |
| Figure 2. Functional classification of cell wall proteins..... | 49 |
| Figure 3. Heat map of adhesion-related proteins..... | 52 |
| Figure 4. Western blot of the ENO and FBP in <i>P. americana</i> and <i>P.brasiliensis</i> cell wall extracts..... | 52 |
| Figure 5. Heat map of response to thermal shock associated proteins..... | 54 |
| Figure 6. Western blot of Catalase P in the <i>P. americana</i> and <i>P.brasiliensis</i> cell wall extracts..... | 55 |
| Table 1. Proteins described in the literature as related to adhesion regulated in <i>P. brasiliensis</i> and <i>P. americana</i> cell wall proteome..... | 51 |
| Table 2. Regulated proteins of <i>P. brasiliensis</i> and <i>P. americana</i> associated with heat stress response..... | 53 |
| Table 3. Proteins regulated in pared of <i>P. brasiliensis</i> and <i>P. americana</i> associated with oxidative stress response..... | 55 |

Figuras e tabelas suplementares

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Supplemental Figure 1. Electrophoretic evaluation of proteins from <i>P. americana</i> and <i>P. brasiliensis</i> cell walls extracts..... | 65 |
| Supplemental Figure 2. Quality graphs of proteomic analysis of the <i>P. americana</i> replicate 1..... | 66 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Supplemental Figure 3. Quality graphs of proteomic analysis of the <i>P. brasiliensis</i> replicate 1..... | 67 |
| Supplemental Figure 4. Quality graphs of proteomic analysis of the <i>P. americana</i> replicate 2..... | 68 |
| Supplemental Figure 5. Quality graphs of proteomic analysis of the <i>P. brasiliensis</i> , replicate 2..... | 69 |
| Supplemental table 1. Proteins found in <i>P. americana</i> and <i>P. brasiliensis</i> cell wall proteome | 70 |

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

AMY: α -amylase

AS-CWP: *Alkali sensitive cell wall proteins*

BCIP: 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato

BHI: *Brain Heart infusion*

CLRs: *C-type lectin receptors*

CWP: *Cell wall proteins*

CWI: *Cell wall integrity*

DAMPs: *Damage-Associated Molecular Patterns*

DTT: Ditioneitol

ECM: Matriz extracelular

ENO: Enolase

ESTs: Etiquetas de sequências expressas

FBP: Frutose-1,6, bifosfato aldolase

Gel: *Glucan enlogating protein*

GlcNAc: N-acetilglicosamina

GAPDH: Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GPI: Glicosilfosfatidilinositol

GPI-CWP: *Glycosil Phosphatidyl Inositol-Cell Wall Anchored Proteins*

IFN- γ : Interferon gama

MET: Microscopia eletrônica de transmissão

MR: Receptor de manose

NBT: Nitroazul de tetrazólio

PAMPs: *Pathogen-associated molecular pattern*

PbAgs: α -1,3-glicana sintase de *Paracoccidioides brasiliensis*

PbCatP: Catalase P de *Paracoccidioides brasiliensis*

PBS: Tampão fosfato salino

PCM: Paracoccidiodomicose

PGK: Fosfoglicerato quinase

PHB: *Rabbit phosphorilase B*

PIR: Proteínas com repetições internas

PMSF: Fenil-metil-sulfonil-fluoreto

PRRs: *Pattern recognition receptors*

RE: Retículo endoplasmático

SDS: Dodecil sulfato de sódio

TFMS: Ácido trifluormetanossulfônico

TNF: Fator de necrose tumoral

TLR: *Toll-like receptors*

TPI: Triose fosfato isomerase

UDP: Uridina difosfato

ω : Sítio ômega

RESUMO

Paracoccidioidomicose (PCM) é a micose sistêmica mais importante da América Latina. A PCM é endêmica no Brasil, entretanto, não é de notificação obrigatória, por isso a sua real incidência e prevalência são desconhecidas. Os agentes etiológicos da PCM são fungos dimórficos do gênero *Paracoccidioides*, os quais no hospedeiro humano transitam da forma micelial à leveduriforme. A parede celular é a estrutura mais superficial do fungo e, portanto, é importante para a infecção. A parede celular fúngica é uma estrutura dinâmica que se encontra em constante remodelação, que para garantir a sobrevivência do patógeno se adapta a múltiplas condições de estresse no hospedeiro humano. Além disso, a parede também cumpre importante função no processo de divisão, crescimento e transição celular, por isso, e pela ausência desta estrutura em células humanas, a parede torna-se um alvo interessante de estudo. O presente trabalho teve como fim o estudo de proteínas da parede celular ligadas covalentemente por pontes dissulfeto, em duas espécies representativas do gênero *Paracoccidioides*, *Paracoccidioides americana* e *Paracoccidioides brasiliensis*, selecionadas por terem seus genomas sequenciados. A análise proteômica permitiu identificar proteínas diferencialmente expressas entre as duas espécies. Proteínas associadas à adesão de componentes da matriz extracelular como a enolase, GAPDH, proteínas da família 14-3-3 e proteínas que ligam e ativam plasminogênio como enolase, frutose-1,6, bifosfato aldolase 1 e fosfoglicerato quinase foram mais expressas na parede de *P. brasiliensis*. Proteínas de resposta ao choque térmico como Hsp90 co-chaperona AHA1 e a Hsp STI1 foram mais expressas na parede de *P. brasiliensis*; enquanto, catalase P foi mais expressa em *P. americana*. Estes resultados auxiliam no conhecimento da relação parasito-hospedeiro e orientam na seleção de proteínas que possam servir como novos alvos farmacológicos.

Palavras chave: PCM, *Paracoccidioides* spp., CWP, parede celular, proteoma.

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is the most important systemic mycosis in Latin America. PCM is endemic in Brazil; however, it is not mandatory to report, so its actual incidence and prevalence are unknown. The etiologic agents of PCM are dimorphic fungi of the genus *Paracoccidioides*, which in the human host transits from mycelial to yeast cells. The cell wall is the most superficial structure of the fungus and, therefore, is important during the infection stage. The cell wall is a dynamic structure that undergoes constant remodeling, to ensure pathogen adaptation to multiple stress conditions within the human host. In addition, the cell wall also plays an important role in the processes of cell division, growth, and transition, therefore, and due to the absence of this structure in human cells, the cell wall becomes an interesting target for study. The aim of the present work was to perform proteomic study of cell wall proteins that are covalently linked by disulfide bridges, in two representative species of the genus *Paracoccidioides*, *Paracoccidioides americana* and *Paracoccidioides brasiliensis*. Proteomic analysis allowed the identification of differentially expressed proteins between the two species. Proteins associated with the adhesion to extracellular matrix components such as enolase, GAPDH, 14-3-3 family proteins, and proteins that bind and activate plasminogen such as enolase, fructose-1, 6-biphosphate aldolase 1 and phosphoglycerate kinase were more expressed in the *P. brasiliensis* cell wall. In addition, heat shock response proteins such as Hsp90 co-chaperone AHA1 and Hsp STII were more expressed on the cell wall of *P. brasiliensis*; while, catalase P was more expressed in *P. americana*. These results can help to understand the host-parasite relationship and guide the selection of proteins that can serve as new pharmacological targets.

Key words: PCM, *Paracoccidioides* spp., CWP, cell wall, proteome.

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

1.1. Paracoccidioidomicose

Paracoccidioidomicose (PCM) é a micose sistêmica de maior importância no Brasil (Shikanai-Yasuda et al., 2018). Os agentes etiológicos da PCM são fungos dimórficos pertencentes ao gênero *Paracoccidioides*. A PCM é geograficamente restrita ao centro e sul da América, tendo prevalência no Brasil, Argentina, Colômbia e Venezuela (Bocca et al., 2013). No Brasil a PCM não é uma doença de notificação compulsória pelo que se desconhece o número exato de casos (Shikanai-Yasuda et al., 2018).

A doença pode apresentar-se de forma aguda, subaguda, crônica e residual. A forma aguda e subaguda (tipo juvenil) representa entre 3-5% dos casos, sendo caracterizada por linfonodomegalias, hepatoesplenomegalia, anemia, febre, sintomas digestivos, articulares e cutâneos (Shikanai-Yasuda et al., 2018). A forma crônica representa 90% dos casos (Wanke et al., 2009) e pode comprometer um ou vários órgãos, sendo o pulmão, o principal órgão afetado (Shikanai-Yasuda et al., 2018). A forma residual são alterações funcionais e/ou físicas que ficam após o tratamento da PCM, que afetam a qualidade de vida do paciente (Shikanai-Yasuda et al., 2018).

A PCM acomete principalmente indivíduos que realizam atividades relacionadas com a agricultura e que fazem manipulação do solo, o que facilita a inalação dos esporos (Franco et al., 2000). A doença é mais frequente em indivíduos do gênero masculino; tal fato é explicado em parte, pelo maior contato de indivíduos do gênero masculino com atividades agrárias, e pelo papel protetor dos estrógenos em mulheres (Loose et al., 1983; Pinzan et al., 2010; Shankar et al., 2011).

Para o tratamento da PCM são usados diferentes antifúngicos, sendo itraconazol o mais empregado nas formas leves a moderadas (Shikanai-Yasuda et al., 2018), e anfotericina B nas formas graves. Para todos os casos, o tratamento só é suspenso até a remissão completa dos sintomas (Shikanai-Yasuda et al., 2018); entretanto, prolongados períodos de medicação e a comprovada toxicidade dos fármacos usados para o tratamento (Fanos et al., 2000) justificam a procura de novas estratégias terapêuticas.

1.2. Biologia do fungo e imunopatogênese

O agente etiológico da PCM são fungos dimórficos pertencentes ao gênero *Paracoccidioides*. O estágio micelial do fungo se desenvolve a temperaturas entre 18 a 28 °C, e o estágio leveduriforme a 37 °C (Bocca et al., 2013). Na infecção, os conídios ou as hifas são inalados e depositados nos pulmões, onde é ativada a mudança para a forma leveduriforme (Shikanai-Yasuda et al., 2018). Além do hospedeiro humano, o fungo tem sido recuperado de animais como tatus (*Dasyus novemcinctus* e *Cabassous centralis*) (Bagagli et al., 2006), cães (de Farias et al., 2011; Mendes et al., 2017) e bicho preguiça (*Choloepus didactylus*) (Trejo-Chavez et al., 2011).

Até 2006, acreditava-se na presença de uma única espécie no gênero *Paracoccidioides*; entretanto, o estudo filogenético de Matute et al. (2006), onde foram comparadas sequências de *loci* nucleares de vários isolados de *Paracoccidioides*, mostraram a presença de três espécies filogenéticas (S1, PS2, e PS3). Mais tarde, Teixeira et al. (2009) determinaram uma nova espécie filogenética (*P. lutzii*), e Salgado-Salazar et al. (2010) descreveram outro grupo filogenético, que depois seria reconhecido como PS4. Turissini et al. (2017), após analisar sequências nucleares e mitocondriais, concluíram que o gênero *Paracoccidioides* está constituído de cinco espécies: *Paracoccidioides lutzii*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Paracoccidioides americana*, *Paracoccidioides restrepiensis* e *Paracoccidioides venezuelensis*. Mais recentemente, Vilela et al. (2021) propuseram duas novas espécies, *Paracoccidioides lobo* que causa infecções cutâneas em humanos, e *Paracoccidioides cetii*, que afeta golfinhos.

Geograficamente a distribuição das espécies do gênero *Paracoccidioides* é delimitada, sendo assim: *P. lutzii* é localizado no Brasil e no Equador; *P. brasiliensis* é encontrado no sul e sudeste do Brasil, na Argentina e no Paraguai; *P. americana* é distribuída na Venezuela e no sudeste do Brasil; enquanto, *P. restrepiensis* e *P. venezuelensis* são encontrados exclusivamente na Colômbia e Venezuela respectivamente (Shikanai-Yasuda et al., 2018). Por sua vez, *P. lobo* se encontra preferencialmente na bacia amazônica, e, *P. cetii* é encontrado nas áreas costeiras da América Latina (Vilela et al., 2021).

Um aspecto relevante na relação parasito-hospedeiro é a resposta imune desencadeada após o contato com o patógeno. Na infecção por fungos, como *Paracoccidioides* spp., a resposta imune é mediada por células da imunidade inata, como células dendríticas, monócitos, macrófagos e neutrófilos (Fortes et al., 2011).

Para a ativação dessa resposta, receptores encontrados em células de defesa denominados receptores de reconhecimento padrão (PRRs), reconhecem moléculas do fungo conhecidos como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (Hopke et al., 2018) e moléculas liberadas por dano celular (DAMPs) (Amarante-Mendes et al., 2018). Após o reconhecimento, cascatas de sinalização são ativadas para a produção de moléculas pró-inflamatórias e citocinas que promovem a ativação e diferenciação celular.

Os principais PAMPs nos fungos são de natureza polissacarídica, como a quitina, mananas e β -glicanas, todos eles localizados na parede celular (Hopke et al., 2018). Já entre os PRRs, destacam-se os receptores tipo Toll (TLR), e os receptores de lectina tipo C (CLRs); dentro dessa última classe encontra-se o receptor delectina-1, que reconhece as β -glicanas, um importante componente de parede fúngica (Hopke et al., 2018).

Na PCM a eficiência na eliminação do fungo do hospedeiro, está sujeita ao tipo de resposta imune desencadeada após da interação entre os PRRs e os PAMPs. A diferenciação de linfócito T naïve, para linfócito auxiliar Th1 ou Th2 prediz o curso da infecção. A diferenciação à Th1 promove a ativação de macrófagos via interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral (TNF- α), o que fornece maiores possibilidades de eliminação do fungo e de inibição de crescimento intracelular, enquanto uma maior ativação de linfócitos Th2 associa-se com menor controle de crescimento e disseminação fúngica (Giusiano, 2021).

1.3. Parede celular fúngica

A parede celular é uma estrutura fundamental para o fungo, ao encontrar-se na interface entre o patógeno e o hospedeiro. A parede é a primeira linha de defesa do fungo, vital na proteção contra diferentes elementos estressantes que o hospedeiro usa para limitar a infecção (Hopke et al., 2018); também cumpre importante função na morfogênese celular, adaptando-se e permitindo o crescimento, divisão e transição fúngica, e por último é a estrutura que media o intercâmbio de moléculas com o exterior (Herrera, 2012; Pitarch et al., 2008).

1.3.1. Estrutura e componentes da parede celular

A parede celular fúngica é formada principalmente de polissacarídeos, proteínas, e lipídeos. A estrutura e composição da parede diferem entre estágios celulares e entre

espécies (Herrera, 2012). Na maior parte dos fungos a camada interna da parede está formada por quitina e polímeros de β -glicanas; enquanto, a estrutura e composição da camada exterior é mais variável entre espécies, por exemplo: a camada externa de leveduras de *Candida albicans* e de *Sacharomyces cerevisiae* está formada principalmente por proteínas altamente manossiladas (Gow et al., 2017); enquanto, em leveduras de *Histoplasma capsulatum* e *P. brasiliensis* está formada por α -glicanas (Gow et al., 2017; Miyazawa et al., 2016).

Até a data, alguns estudos foram realizados com o intuito de conhecer as características físicas e químicas da parede de *Paracoccidioides* spp. Carbonell et al. (1970) mostraram que a densidade da parede do micélio varia de 80 e 150 mm e, da levedura entre 200 e 600 nm (Carbonell et al., 1968). Por outro lado, foi mostrado que a parede celular do micélio apresenta uma única camada homogênea (Carbonell et al., 1968), enquanto, a parede da levedura possuem três camadas: uma fibrilar externa de baixa densidade, uma média mais eletrodensa e uma interna que entra em contato direto com a membrana celular (Carbonell, 1967). Adicionalmente, Kanetsuna e colaboradores realizaram trabalhos para identificar diferenças na composição da parede entre levedura e micélio de *Paracoccidioides* spp; eles não encontraram diferença no teor de lipídeos (5-10%) e de glicanas (36-47%) entre os dois estágios, mas observaram diferença significativa no teor de quitina, identificando maior quantidade na levedura (37-48%) que no micélio (7-18%), e no teor de proteínas, maior no micélio (24-41%) que na levedura (7-14%) (Kanetsuna et al., 1972; Kanetsuna et al., 1969).

1.3.2. Polissacarídeos, quitina e glicanas

Como já foi comentado anteriormente, entre os principais componentes de parede se encontram os polissacarídeos; entre eles destacam-se os polímeros de N-acetilglicosamina (GlcNac), os quais formam a quitina (Herrera, 2012). A quitina é sintetizada pela quitina sintase, uma enzima que catalisa a transferência da GlcNac da uridina difosfato (UDP) N-acetilglicosamina para o crescimento do polímero de quitina através de ligações de tipo β -1,4 (Herrera, 2012); após sua síntese, os polímeros de quitina são liberados através da membrana plasmática para a parede, onde formam microfibrilhas que se entrelaçam através de pontes de hidrogênio (Bowman et al., 2006). Em *P. lutzii*, *P. americana* e *P. brasiliensis* sete genes codificantes de quitina sintase (Chs1-7) foram identificados (Desjardins et al., 2011).

Outro dos principais polímeros de polissacarídeos encontrados na parede de fungos são as glicanas. As glicanas são muito abundantes, representando entre 50% a 60% do peso total da parede (Bowman et al., 2006), sendo formadas por polímeros de glicose que podem ter uma variedade de ligações (α -1,3, α -1,4, β -1,3 e β -1,6) (Herrera, 2012). Os polímeros de glicanas são sintetizados por glicanas sintases, as quais estão localizadas na membrana plasmática. Em *P.lutzii*, uma β -1,3-glicana sintase (*Pbfks1*) foi identificada (Pereira et al., 2000). E em *Paracoccidioides* spp., uma α -1,3-glicana sintase (*PbAgs*) (Sorais et al., 2010) foi identificada.

Na parede celular de micélio de *Paracoccidioides* spp., a principal glicana é a β -1,3- glicana (Kanetsuna et al., 1972), enquanto a α -1,3- glicana é o maior polímero presente na levedura; curiosamente α -1,3- glicana é ausente em outras leveduras como as de *Sacharomyces cerevisiae* e *Candida albicans* (Yoshimi et al., 2017). A α -glicana é localizada na camada externa da parede de levedura de *Paracoccidioides* spp, mascarando a camada interior formada principalmente por quitina e polímeros de β -glicanas (Gow et al., 2017), o que limita o reconhecimento por parte de células do hospedeiro. Recentemente, Souza et al. (2019) mostraram que em *P. brasiliensis* a α -glicana favorece a imunidade mediada por Th2, ao modular negativamente a diferenciação de células dendríticas para CD1a⁺, o que contribui para a persistência da infecção. Outro polímero presente em menor quantidade, mas de muita relevância é a β -1,6-glicana, a qual se liga à manoproteínas através do remanescente de uma molécula de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Ruiz-Herrera et al., 2019).

1.3.3. Proteínas de parede celular

As proteínas de parede (CWP) são outro componente relevante; elas constituem 3 - 20% do peso seco da parede celular dos fungos (Herrera, 2012). As CWP ligam-se à parede através de ligações covalentes ou não covalentes; aquelas proteínas que se encontram ligadas de forma covalente e cumprem funções de degradação e remodelação de componentes de parede, são consideradas típicas ou clássicas (Satala et al., 2020a) (figura 1), enquanto aquelas que não possuem ligação covalente e não possuem função de prover estrutura ou ação enzimática sobre componentes de parede são consideradas atípicas ou não clássicas (Karkowska-Kuleta et al., 2015) (figura 1).

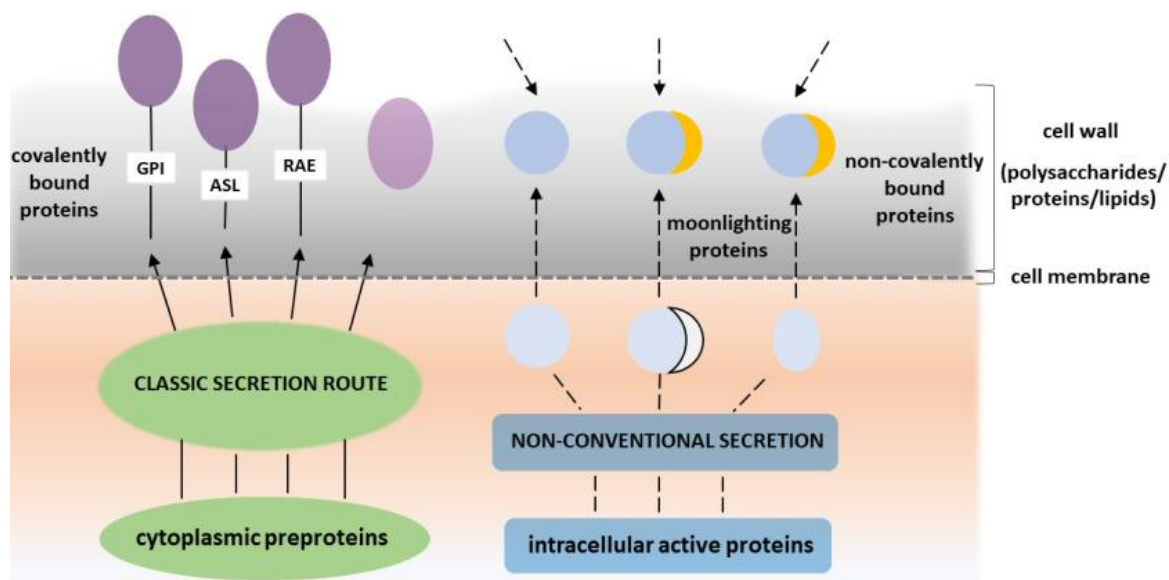


Figura 1. Descrição das proteínas da parede celular e suas vias de secreção. Proteínas encontradas na parede podem ser secretadas por rota clássica e por rotas não convencionais. Proteínas secretadas por via clássica são encontradas no citoplasma em forma de pró-proteínas; após da sua secreção para a parede se ligam através de ligações covalentes como âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI), ligações álcali sensíveis (ASL), e proteínas com ligações que podem ser liberadas com um agente redutor (RAE). Proteínas secretadas por rotas não clássicas podem ter função na parede ou função extracelular, e podem ou não se ligar à parede através de ligações não covalentes; proteínas não clássicas podem chegar à parede também por reabsorção do ambiente exterior. Autoria de Darota Satala e colaboradores (Satala et al., 2020a).

As proteínas que cumprem funções clássicas de parede se caracterizam por ter um peptídeo sinal que as conduz até a parede, esse peptídeo pode ser predito por ferramentas como SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Almagro Armenteros et al., 2019), e por ter domínios ricos em treonina e serina que possuem uma extensa glicosilação (Klis et al., 2011); o padrão de glicosilação pode ser predito por ferramentas como NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) (Gupta et al., 2002), e NetOGlyc 4.0 servers (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) (Steentoft et al., 2013).

As proteínas não clássicas não possuem peptídeo sinal, o que sugere que outros mecanismos não convencionais de secreção dependentes ou independentes do transporte vesicular participam em seu transporte; entretanto, proteínas sem sinal de secreção também podem chegar até a parede por reabsorção de proteínas secretadas por outras células ou liberadas após apoptose (Karkowska-Kuleta et al., 2015; Nickel et al., 2009; Nimrichter et al., 2016; Rocha et al., 2021; Rodrigues et al., 2011; Satala et al., 2020a). A predição de proteínas não clássicas de parede pode ser feita com ferramentas

informáticas como o programa SecretomeP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>) (Bendtsen et al., 2004), ou bases de dados como a fungal secretome (<http://fsd.snu.ac.kr/index.php?a=view>).

Adicionalmente à glicosilação, algumas proteínas clássicas de parede recebem uma âncora de GPI na região C-terminal. GPI é uma estrutura glicolípídica que serve para ligar proteínas na membrana plasmática ou na parede celular. Proteínas ligadas através de uma molécula de GPI na parede são denominadas GPI-CWP (Bowman et al., 2006); as GPI-CWP têm na região C-terminal uma sequência sinal, que permite que no RE o complexo enzimático GPI transamidase adicione uma âncora de GPI; essa sequência caracteriza-se por ter um sítio ômega (ω), o qual é o local onde é realizado o corte para a adição da âncora (Komath et al., 2018).

Estruturalmente uma molécula de GPI está constituída por um resíduo de fosfoetanolamina unido a um grupo de manoses, que por sua vez liga-se a uma molécula de Glc-NAc, que finalmente se junta ao fosfatidilinositol (Paulick et al., 2008) (Figura 2). As GPI-CWP estão ligadas por seu extremo C-terminal a uma molécula de GPI por uma ligação fosfodiéster com a fosfoetanolamina. Na parede celular a ligação entre a Glc-NAc e as manoses é hidrolisada, o que permite que os resíduos de manose se liguem com a β -1,6-glicana (Komath et al., 2018). A localização das proteínas ancoradas com uma molécula de GPI depende dos aminoácidos que se encontram acima do sítio ω . A presença de aminoácidos hidrofóbicos induz sua localização na parede celular, enquanto, a presença de aminoácidos básicos promove a localização na membrana plasmática.

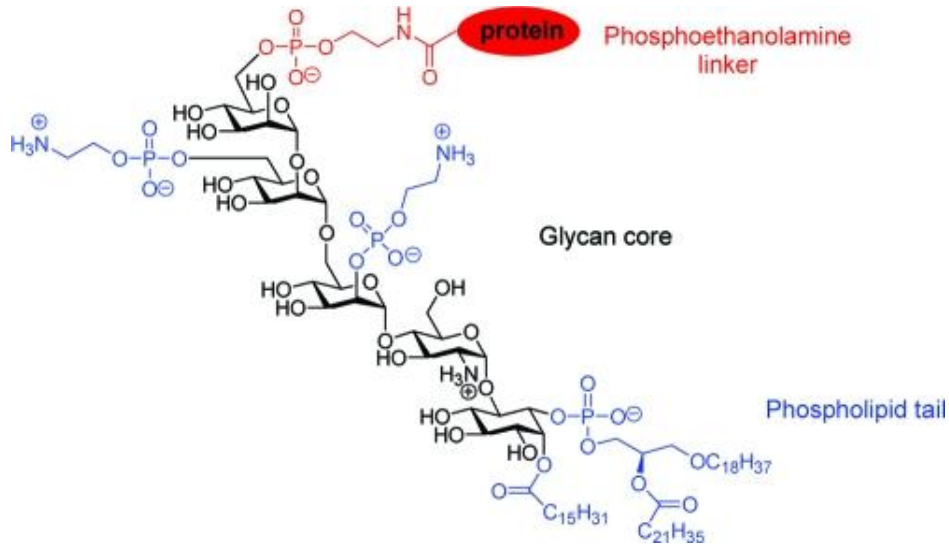


Figura 2. Estrutura da âncora de GPI. Ponte de fosfoetanolamina (vermelho), núcleo conservado de glicanas (preto), fosfatidilinositol e polissacarídeos adicionados lateralmente (azul). Autoria de Paulick e colaboradores (Paulick et al., 2008)

Além da ligação à parede através de uma âncora de GPI, algumas proteínas de parede estão ligadas à β -1,3-glicana por uma ligação sensível a álcali (ASL), pelo que são denominadas como AS-CWP; entre as AS-CWP estão as proteínas com repetições internas (PIR)(Yang et al., 2014). Em *Saccharomyces cerevisiae* foi demonstrado que as proteínas PIR ligam-se com β -glicana através da segunda glutamina da sequência de repetição. Para que essa ligação aconteça a glutamina é modificada à ácido glutâmico e posteriormente o grupo γ -carboxila do ácido glutâmico liga-se por uma ligação tipo éster com o grupo hidroxila da β -1,3-glicana (Yang et al., 2014). Essa ligação é sensível a soluções alcalinas (Ecker et al., 2006; Pitarch et al., 2008). Por outro lado, proteínas Pir podem formar pontes dissulfeto com outras proteínas através de resíduos de cisteína da região C-terminal (Pitarch et al., 2008; Yang et al., 2014); esse tipo de ligação também está presente em outras proteínas além das AS-CWP. Proteínas ligadas à parede através de ponte dissulfeto são liberadas na presença agentes redutores (Pitarch et al., 2008).

1.3.4. Função das proteínas de parede

As CWP apresentam uma variedade de funções; as proteínas clássicas frequentemente cumprem funções relacionadas a hidrólise, remodelação de componentes de parede e função estrutural. As proteínas não clássicas se caracterizam por ter duas ou mais funções, pelo que são conhecidas como proteínas *moonlighting*,

com uma função intracelular e outra extracelular (Karkowska-Kuleta et al., 2015; Satala et al., 2020a).

Dentro do grupo de proteínas identificadas na parede de *Paracoccidioides* spp., consideradas como clássicas, se encontram proteínas com função enzimática sobre componentes polissacarídeos como sintases, glicanases, manosidases e glicosiltransferases, e enzimas com função enzimática sobre outros componentes de parede como proteases e lipases (Karkowska-Kuleta et al., 2019; Muszewska et al., 2018).

Enzimas associadas à síntese de polímeros de parede se localizam na membrana celular, entretanto, eventualmente podem ser encontradas na parede, como é o caso da β -1,3-glicana sintase (Pbfks1) (Tomazett et al., 2010).

Por sua vez, as glicosiltransferases são enzimas que interligam polímeros de polissacarídeos. Entre as glicosiltransferases se destacam o grupo de β -1,3-glicosiltransferases (Gel), as quais interligam polímeros β -1,3-glicana. Este grupo de proteínas são homólogas com a família genica GAS (glicofosfolípido ancorado à superfície) de *S. cerevisiae* (Popolo et al., 2017). As glicosiltransferases são importantes para a patogênese do fungo, como foi demonstrado em *C. albicans*, onde mutantes nulos de PHR1 (ortólogo da família GAS) mostraram ser avirulentos num modelo de infecção sistêmica (De Bernardis et al., 1998); da mesma forma, mutantes de Gel1 e Gel2 foram avirulentos em um modelo de aspergilose invasiva (Mouyna et al., 2005).

Em *Paracoccidioides* spp., uma análise *in silico* identificou os genes codificantes de três glicosiltransferases (Gel1, 2 e 3) (Tomazett et al., 2005). Em análises de proteoma de parede foram recuperadas a Gel4 no extrato de parede de micélio de *P. americana* e *P. brasiliensis* (Longo et al., 2014), e a Gel2 na parede de micélio e levedura de *P. lutzii* (Araujo et al., 2017). Do mesmo modo, Lima et al. (2012) imunolocalizaram a *Pbgel1* na superfície e no núcleo celular de *P. lutzii* e, Castro et al. (2009) localizaram a *PbGel3* na superfície celular de *P. lutzii*.

Outra glicosiltransferase importante é a α -amylase (AMY); acredita-se a que AMY esteja envolvida na estabilização da α -1,3-glicana através da ligação de cadeias de α -1,4, à extremidade redutora do α -1,3-glicana (Yoshimi et al., 2017); a perda de sua função está associada com a diminuição da virulência de *Histoplasma capsulatum* (Marion et al., 2006). Em *Paracoccidioides* spp., foi identificado um gene ortólogo de α -amylase (AMY1), o qual foi mais expresso na fase leveduriforme (Camacho et al., 2012).

Do mesmo modo, proteínas pertencentes à família de proteínas Crh também são consideradas glicosiltransferases. Entre os membros dessa família encontram-se a glicanase extracelular Crf1 e a glicanase Utr2, (Cabib, 2009; Pardini et al., 2006), as quais já foram identificadas no extrato de parede de levedura e micélio de *P. lutzii* (Araujo et al., 2017) e no proteoma de parede de *P. brasiliensis* (Gonçales et al., 2021).

Na parede celular fúngica também se encontram proteínas relacionadas à degradação de componentes polissacarídeos de parede; dentro deste grupo de proteínas encontram-se as quitinases, glicanases e manosidasas. Em *Paracoccidioides* sp., em um estudo *in silico* do transcrito identificou a quitinase 1 (Tomazett et al., 2005), que foi posteriormente caracterizada por Bonfim et al. (2006). Santana et al. (2012) identificaram a proteína quitinase 2, no genoma de *P.americana* e *P. brasiliensis* em estudos de proteoma foram identificadas a endoquitinase 1 (PABG_02565/PADG_00994) (Longo et al., 2014), e a quitinase 2 (PAAG_03849) (Araujo et al., 2017).

Enquanto as glicanases, Villalobos-Duno et al. (2013), identificaram no genoma de *P. brasiliensis* um gene ortólogo de uma α -1,3-glicanase (AGN1); já em estudos de proteoma, um ortólogo da α -glicosidase AB foi identificado no proteoma de parede de *P. americana* (PABG_04069) (Longo et al., 2014); esta proteína também foi recuperada no proteoma de parede de micélio de *P.lutzii* (PAAG_04290) (Araujo et al., 2017).

Entre as β -glicanases, um estudo *in silico* do transcrito de *Paracoccidioides* identificou a β -1,3-endoglicanase egl, e as glicanases scwl e dse4 (Tomazett et al., 2005). No proteoma de parede de *P. americana* e *P. brasiliensis* foram identificadas a glicano-1,3- β -glicosidase (PABG_00450/PADG_02862), a glicano-1,3- β -glicosidase (PABG_06340/PADG_07615), a exo- β -1,3-glicanase Exg0 (PABG_06014/PADG_06700), e a β -glicosidase (PABG_02038/PADG_00483) (Longo et al., 2014).

Outras proteínas com função enzimática são as manosidasas. Uma putativa α -1,6-D- manosidase, conhecida como proteína deficiente para o crescimento filamentososo 5 (Dfg5p) foi imunolocalizada por microscopia eletrônica de transmissão (MET), na parede e no citoplasma de *P. lutzii* (Castro et al., 2008). Além, em estudos de proteoma de parede de *P. americana* e *P. brasiliensis* foi identificada uma α -manosidase (PABG_01538/PADG_04148) (Longo et al., 2014), e a endo-1,6- α manosidase DCW1 (Araujo et al., 2017) foi identificada no proteoma de parede de *P. lutzii*.

Na parede celular também se podem encontrar proteínas relacionadas com degradação de outros componentes não polissacarídeos, tais como lipídeos e proteínas.

Nesse grupo destaca-se a presença em parede de *P. lutzii* da formamidase, a qual hidrolisa as pontes carbono-nitrogênio, sendo fundamental no metabolismo de nitrogênio (Borges et al., 2010).

Outro grupo de proteínas com função enzimática são as proteases; elas estão associadas com virulência, ao degradar proteínas da matriz extracelular (ECM do inglês *extracellular matrix*). Em *P. brasiliensis* uma aspartil protease (*PbSap*), foi localizada na parede celular por MET, e foi identificada em sobrenadante de cultura, o que sugere ser uma proteína secretada (de Assis Tacco et al., 2009). Por outro lado, uma subtilase tipo proteinase psp3 (PADG_07422) foi identificada num estudo de proteoma de parede e de secretoma de *P. brasiliensis* (Longo et al., 2014; Vallejo et al., 2012). Adicionalmente, Pigosso et al. (2017), em um ensaio que procurou conhecer as principais proteínas liberadas por *P. brasiliensis* durante a infecção *in vivo*, identificaram uma serino protease, a qual foi uma das principais proteínas secretadas pelo fungo na fase inicial de infecção.

Por outro lado, em parede também é frequente encontrar proteínas não clássicas que possuem função associada à aderência, interação com cascatas proteolíticas do hospedeiro, proteção ao estresse térmico e oxidativo, e evasão ao sistema imune, as quais são fundamentais para o estabelecimento da infecção, (Satala et al., 2020a)

Dentro do grupo de proteínas com função de adesão são encontradas proteínas relacionadas e não relacionadas com rotas metabólicas intracelulares, entre este último grupo é destacada a Gp43, a qual é considerada o principal antígeno secretado por *Paracoccidioides* spp., e se adere à fibronectina e laminina (Mendes-Giannini et al., 2006; Vicentini et al., 1994); e proteínas da família 14-3-3, que em *P. brasiliensis* se aderem a fibronectina e colágeno (Andreotti et al., 2005).

Por outro lado, no grupo de proteínas associadas a rotas metabólicas, na sua maioria estão envolvidas com o metabolismo de glicose; entre estas proteínas, talvez a que maior interesse tem gerado é a enolase (ENO), a qual media processos de adesão através da ligação a fibronectina, como acontece em *Candida* spp (Satala et al., 2020b) e em *P. brasiliensis* (Donofrio et al., 2009), à vitronectina em *Candida* spp., (Kozik et al., 2015; Satala et al., 2020b), e à laminina em *Candida* spp., (Kozik et al., 2015). Essa função de aderência promove a colonização de tecidos, e em *C. albicans*, promove a formação de biofilme (Thomas et al., 2006). Além da função de aderência, ENO também é importante no processo de fibrinólise conseguindo ativar o próprio sistema fibrinolítico do hospedeiro, através da ativação de plasminogênio (Jong et al., 2003;

Nogueira et al., 2010), o que permite a degradação de componentes da matriz extracelular, o que conseqüentemente favorece a invasão fúngica. Além da função de adesão e da ativação de vias fibrinolíticas, a ENO foi associada mais recentemente com a atividade de transglutaminase (Reyna-Beltran et al., 2018), função que em parede celular seria relevante para a manutenção da estrutura, e a incorporação de proteínas na parede celular.

Outras proteínas com função de adesão, encontradas em parede celular são a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), que em *Paracoccidioides* spp., se liga á laminina, fibronectina, e colágeno tipo 1 (Barbosa et al., 2006), a triose-fosfato isomerase (TPI), que se liga á laminina (Augusto et al., 2007); a malato sintase que se liga à fibronectina e colágeno tipo I e IV (da Silva Neto et al., 2009) e a frutose-1, 6-bifosfato aldolase (FBP) que se liga e ativa o plasminogênio em *P. lutzii* (Chaves et al., 2015).

Em estudos proteômicos de parede de fungos é frequente encontrar também proteínas de resposta ao estresse causado pelo hospedeiro (Araujo et al., 2017; Caminero et al., 2014; Castillo et al., 2008; Hernáez et al., 2010; Longo et al., 2014; Ramírez-Quijas et al., 2015). Dentro desse grupo de proteínas encontram-se aquelas de resposta ao choque térmico (HSP), as quais se acredita, contribuem para a adaptação à temperatura do hospedeiro.

Uma das HSPs mais estudadas e mais promissoras na procura de novas terapias antifúngicas é a HSP90, a qual está relacionada com a regulação das vias da CWI (*cell wall integrity*), o que foi evidenciado em *Aspergillus fumigatus*, onde se observou sua associação com as proteínas PKcA e MpkA (Rocha et al., 2021). A importância de HSP90 na regulação das CWI em *Aspergillus*, já foi mostrada previamente por Lamoth et al. (2012), que observaram que a repressão da HSP90 potencializou o efeito negativo de agentes como caspofungina e congo red, na parede celular. Por outro lado, HSP90 em *Cryptococcus neoformans*, mostrou-se ser um importante fator de virulência, dado que sua inibição e a administração conjunta de equinocandinas, diminuiu significativamente o crescimento fúngico; adicionalmente, a inibição de HSP90 se mostrou importante na indução e manutenção da cápsula (Chatterjee et al., 2017).

Como visto as proteínas de parede, tanto as clássicas como a não clássicas, desempenham funções vitais tanto para a manutenção da parede e adaptação celular, como para a virulência e patogêneses e são alvos promissores de novas alternativas terapêuticas, como sugeriu Champer et al. (2016), que indicaram que proteínas de

parede como as 1,3- β -glicosiltransferases, Gel1-4, Bgt1, os homólogos da glicanase Crf1, endoglucanase EglC e a proteínas Ecm33, sejam potenciais alvos para o desenvolvimento de uma panvacina.

1.3.5. Identificação de proteínas de parede

Os primeiros estudos que tiveram o intuito de identificar proteínas de parede em *Paracoccidioides* spp., foram trabalhos *in silico* do transcrito (Castro et al., 2005; Tomazett et al., 2005). Tomazett et al. (2005) procuraram genes associados à síntese, remodelação e degradação de componentes de parede, para isso usaram um banco de dados de etiquetas de sequências expressas (ESTs) de transcrito de *Paracoccidioides* spp., os resultados desse trabalho permitiram identificar sete genes relacionados com a O-glicosilação de proteínas, degradação de componentes de polissacarídeos de parede e transglicosidases. Por outro lado, Castro et al. (2005) com o intuito de identificar potenciais GPI-CWP fizeram uma análise *in silico*, utilizando um banco de dados de ESTs de *Paracoccidioides* spp., nesse estudo foram identificadas 20 sequências de prováveis proteínas ancoradas com uma molécula de GPI; a análise da região anterior ao sítio ω permitiu inferir que pelo menos seis dessas sequências preditas são direcionadas para a parede celular. Mais recentemente Gonçalves et al. (2021) em um estudo *in silico* do genoma de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* identificaram 100 prováveis GPI-CWP, em ambas as espécies.

Por outro lado, estudos proteômicos também têm sido usados para conhecer o conteúdo proteico da parede fúngica. Nos estudos proteômicos de parede são usados extratos enriquecidos de parede. Para a obtenção de extratos de parede que servem para análises proteômicas existem dois tipos de metodologias, uma sem lise celular conhecida como *cell surface shaving* (CSS) e outra com lise celular.

A CSS é uma técnica onde, células vivas são submetidas ao tratamento direto com tripsina, sem gerar lise celular; essa metodologia foi proposta com o intuito de diminuir a contaminação com proteínas intracelulares. Entretanto, alguns autores consideram que a CSS não permite a recuperação de proteínas que se encontram intrincadas no meio do esqueleto de polissacarídeos, e só libera proteínas de superfície, pelo que a análise proteômica deve ser considerada como surfoma (Gil-Bona et al., 2018; Karkowska-Kuleta et al., 2015). Em *Paracoccidioides* spp., um trabalho usando CSS já foi publicado (Longo et al., 2014). Nesse estudo um total de 208, 148, 164 e 239

proteínas de micélio e de levedura de *P. americana* e *P. brasiliensis*, respectivamente, foram recuperadas. Esse trabalho mostrou que ao redor de 60% das proteínas recuperadas foram proteínas preditas como secretadas por via não clássica, o qual é um achado comum na análise de proteoma de parede de fungos (Araujo et al., 2017; Castillo et al., 2008; Gil-Bona et al., 2015).

De outro modo, existem metodologias para a obtenção de extratos enriquecidos de parede que usam lise celular; nesse caso deve-se garantir que exista mínima contaminação com proteínas citoplasmáticas, para isso são realizados extensivos ciclos de lavagens do extrato proteico (Feiz et al., 2006); após a lise se usam diferentes reagentes, que liberaram as proteínas dependendo da natureza da ligação que as mantêm ligadas na parede (Pitarch et al., 2008). Proteínas ligadas por interações de Van der Waals, pontes de hidrogênio ou ligações iônicas são removidas através do tratamento com soluções salinas como o CaCl_2 (Feiz et al., 2006). Proteínas ligadas através de pontes dissulfeto são retiradas com o uso de agentes redutores, como DTT e β -mercaptoetanol; AS-CWP são liberadas usando um álcali suave ou com β -glicanase e, as GPI-CWP são liberadas com HF-piridina ou com tratamento enzimático com β -glicanases, quitinases ou fosfodiesterases (Feiz et al., 2006; Karkowska-Kuleta et al., 2015; Pitarch et al., 2008).

Em estudos proteômicos, outros recursos são usados com o intuito de liberar as proteínas dos polissacarídeos que as decoram, para isso podem ser usadas enzimas que clivam as N ou O-glicosilações ou também pode ser usado um tratamento químico com ácido trifluormetanossulfônico (TFMS), o qual cliva qualquer tipo de ligação glicosídica (Maddi et al., 2009; Pitarch et al., 2008). A deglicosilação facilita a ionização peptídica e retira a massa diferencial a mais que geram os polissacarídeos na proteína, melhorando a identificação por espectrometria de massas (Edge, 2003).

Estudos de proteoma de parede usando lise celular e posterior tratamento químico ou enzimático são os mais utilizados. Em *C. albicans* estudos usando este tipo de metodologia já foram publicados; (Castillo et al., 2008; de Groot et al., 2004). Em *P. lutzii* uma metodologia usando lise celular já foi empregada para a análise do proteoma de parede de micélio e levedura (Araujo et al., 2017).

Outra metodologia empregada para a identificação de proteínas em parede é a imunolocalização; por esta metodologia varias proteínas foram localizadas na parede de *Paracoccidioides* spp., como é o caso da β -1,3-glicana sintase (Tomazett et al., 2010),

PbGel2 (Lima et al., 2012), *PbGel3* (Castro et al., 2009) e formamidase (Borges et al., 2010).

2. JUSTIFICATIVA

A parede celular é uma estrutura dinâmica que se adapta a múltiplas condições ambientais, entre elas as condições encontradas no hospedeiro humano; nesse sentido, a parede cumpre um importante papel na relação parasito-hospedeiro, fornecendo à célula proteção contra o ataque imune, além de auxiliar no estabelecimento e disseminação da infecção.

Entre os alvos dos antifúngicos mais comumente empregados, se encontram componentes da parede celular, a qual é uma estrutura ausente em células humanas, o que consequentemente diminui o risco de reações cruzadas; entretanto, o crescente número de relatos de resistência a antifúngicos e, o também, ascendente número de pacientes com imunodeficiências adquiridas, aliados à comprovada toxicidade de alguns antimicóticos, sobretudo quando usados a longo prazo, incentivam a procura de novas estratégias terapêuticas.

Entre os novos alvos estudados com fins terapêuticos, se encontram as proteínas da parede celular, as quais cumprem uma diversidade de funções, vitais para a célula fúngica, entre elas, a função de manutenção de componentes de parede, o que é necessário para conservar a estrutura e estabilidade celulares. Essa função é realizada por sintases, glicanases e transglicosidases; por outro lado, na parede também se encontram proteínas envolvidas com funções de virulência e patogênese, que participam em processos de adesão, aquisição de nutrientes, resposta ao choque térmico e estresse oxidativo ou que atuam no mascaramento de componentes de parede, para evitar o reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro. Outra das questões que fazem das proteínas da parede alvos promissores para terapia é sua localização superficial, que facilita o acesso de moléculas terapêuticas.

Uma das ferramentas mais usadas na atualidade para a identificação e caracterização de proteínas de parede é a espectrometria de massas. Estudos usando esta abordagem já foram publicados, principalmente em espécies como *Candida albicans*, *Sacharomyces cerevisiae* e *Aspergillus fumigatus*. Nesse sentido, e sendo a PCM, uma das micoses de maior prevalência no Brasil, se faz necessária a ampliação do conhecimento da parede de *Paracoccidioides* spp.

P. lutzii, *P. americana* e *P. brasiliensis* são as espécies mais frequentemente encontradas no Brasil; num trabalho proteômico anterior, nosso grupo revelou as proteínas de parede *P. lutzii*, ligadas de forma covalente por pontes dissulfeto e ligações

álcali sensíveis, motivo pelo que no presente trabalho foram estudadas as outras duas espécies mais frequentes no Brasil. Outros fatores como a disponibilidade do genoma *P. brasiliensis* e *P. americana* e as divergências metabólicas e na virulência relatadas entre estas duas espécies, incentivaram o estudo proteômico da parede.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Realizar a análise proteômica da parede celular de dois dos membros do complexo *Paracoccidioides*: espécies *P. americana* e *P. brasiliensis*, em sua forma leveduriforme.

3.2. Objetivos específicos

- Obter extratos proteicos de parede de *P. brasiliensis* e *P. americana*.
- Realizar uma análise descritiva do proteoma de parede de *P. brasiliensis* e *P. americana*.
- Realizar uma análise comparativa de expressão, para identificar proteínas relevantes para cada espécie, com o que se aprimoraria o conhecimento da biologia na relação parasito-hospedeiro.

CAPÍTULO II

4. MANUSCRITO

Proteomic analysis of *Paracoccidioides americana* and *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cell wall

Ayda Luz Malaver Salamanca¹, Danielle Silva Araujo^{1,2}, Leandro do Prado Assunção¹
Kleber Santiago Freitas e Silva¹, Lilian Cristiane Baeza^{1,3} Maristela Pereira¹ and Célia
Maria de Almeida Soares¹

1 Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, ICB II, Campus II, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil.

2 Faculdade Unida de Campinas.

3 Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, Brazil

Mailing address:

Célia Maria de Almeida Soares
Universidade Federal de Goiás
Instituto de Ciências Biológicas
Laboratório de Biologia Molecular
cmasoares@gmail.com

Abstract

Paracoccidioidomycosis (PCM) is the most significant systemic mycosis in Latin America and it is endemic in Brazil. The etiologic agents of PCM are dimorphic fungi of the genus *Paracoccidioides* which are thermo dimorphic pathogens that in the human host transit from mycelial to yeast-like form. Currently, seven species of this genus have been suggested, *P. lutzii*, *P. americana*, *P. brasiliensis*, *P. restrepiensis*, *P. venezuelensis*, *P. cetii* and *P. loboii*. Proteomic analysis was performed of the cell wall of the species *P. americana* and *P. brasiliensis*. Using a proteomic approach, differentially expressed proteins were identified; proteins related to the metabolism of glucose such as enolase and GAPDH, which in the cell wall are associated with adhesion to extracellular matrix components, and the enolase, fructose-1, 6-bisphosphate aldolase 1 and phosphoglycerate kinase, that activate plasminogen, were up-regulated in *P. brasiliensis*. Additionally, two proteins belonging to the 14-3-3 family were also up regulated in *P. brasiliensis*, proteins of this family have also been associated with adhesion to components to the extracellular matrix. The greater presence of proteins related to adhesion in the cell wall of *P. brasiliensis* suggests an advantage of this species in the pathogenic process. The co-chaperone Hsp90 AHA1 and the STI1 protein, were more expressed in *P. brasiliensis*, while catalase P was more expressed in *P. americana*. These results indicate that there are differentially expressed proteins related to adhesion and response to thermal stress, mainly in the *P. brasiliensis* cell wall, which directly influences the virulence of these species.

1. Introduction

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis, distributed from Central America to South America, with prevalence in Brazil, Argentina, Colombia, and Venezuela [1, 2]. The etiological agents of PCM are thermo dimorphic fungi belonging to the *Paracoccidioides* genus, which are usually found in soil in the form of a hypha; in infection conidia or hyphae are inhaled and deposited in the lung, where the temperature activates its change to multi-budding yeast [3].

The genus *Paracoccidioides* consists of seven species: *Paracoccidioides lutzii*, which is predominantly found in Brazil and Ecuador, *Paracoccidioides brasiliensis*, which is located mainly in the South and Southeast of Brazil, Argentina and Paraguay, *Paracoccidioides americana*, is distributed in Venezuela and Southeast of Brazil, *Paracoccidioides restrepiensis* and *Paracoccidioides venezuelensis*, that are found mainly in Colombia and Venezuela, respectively [4], *Paracoccidioides loboii*, which is predominantly found in the Amazon basin and *Paracoccidioides cetii* distributed around the Latin American coasts [5]; these last two species are associated with cutaneous and subcutaneous mycosis. Although the species are found predominantly in certain territories, migratory movements have favored their arrival in areas where their presence was not previously contemplated [3, 6].

The cell wall is a fundamental structure for the fungus; it is the interface between host and pathogen, being vital in protecting against different stressful elements that the host uses to counteract the infection [7]. The main immune-stimulating components in the fungus infection are found in the cell wall; they are part of the group of components recognized as molecular patterns associated with the pathogen (PAMPs), which activate the immune response after being recognized by receptors called pattern recognition receptors (PRRs), which are found in defense cells [8, 9].

The cell wall components are of great interest for the pharmaceutical industry [10] because most of them are absent in the human host; second, because the cell wall components represent more exposed targets than intracellular components, which facilitates drug interaction, and third because there are common cell wall components between different species of fungi, making possible to develop broad-spectrum therapy [10, 11].

The fungal cell wall is formed mainly of polysaccharides, proteins, and lipids [12]; the main polysaccharides found in the fungal cell wall are the chitin and β -glycans, which are common in all species; the amount and type of polysaccharides differ between species and the cell stage [12, 13]. In the *Paracoccidioides* spp., mycelium cell wall the main glycan is β -glycan, while α -1,3-glycan is the largest polymer present in yeast [14].

Cell wall proteins (CWP) are another relevant component at the cell wall. They constitute 3-20% of the dry weight of the cell wall of fungi [15]. The fungal CWP can be classified as classical or typical and non-classical or not typical [16, 17]. The classical CWP are mainly located in the cell wall, and have functions related to degradation and remodeling of cell wall components mainly, but may also have a role associated with pathogenesis and virulence [18]; On the other hand, non-classical proteins are proteins that are found in other cell compartments [16], and have functions associated with virulence and pathogenicity mainly [17]. Meanwhile, some non-classical CWP could assist in the maintenance and stability of the cell wall, such as enolase, which has a transglutaminase function that could be associated with incorporation and stabilization of proteins to the cell wall [19].

Another characteristic that differentiates classical from non-classical CWP is the secretion route. Typical proteins are secreted by classic secretion route, while the atypical are secreted for other routes that may involve vesicle mediation [20, 21]; In addition, classical proteins are bound to the cell wall by covalent bonds such as GPI anchors, alkaline sensitive bonds, or disulfide bridges, while non-classical proteins in general, are not covalently linked to cell wall; additionally, typical proteins have a high glycosylation degree [16, 17].

CWPs may be regulated to adapt the cell to the conditions found in host cells [7]. In *Paracoccidioides* spp., various studies have shown the genetic and proteomic modulation of CWPs in various conditions, such as growth in different carbon sources [22], in hemoglobin presence [23], in presence of antifungals [24], and cell wall stressors [25], and in the presence of an inhibitor of N-glycosylation [26]. Meanwhile, very little is known about the divergences and similarities of the cell wall between species. To date, two *Paracoccidioides* cell wall proteomic studies have been published; the first describes proteins found in the surfome the *P. brasiliensis* and *P. americana*

[27], and the other, was made by our group, and describes the mycelium and yeast cell wall proteomes of *P. lutzii* [28].

Additionally, metabolic and virulence divergences between *Paracoccidioides* species have been observed. Pigosso and collaborators [29], at our group, found metabolic divergences between four *Paracoccidioides* species, within these differences it was observed that *P. brasiliensis* has a higher expression of proteins associated with aerobic degradation of fatty acids, meanwhile, *P. americana* has a higher expression of proteins associated with amino acid degradation, probably to obtain energy by aerobic routes, and a higher expression of proteins associated with the pentose cycle, consequently with higher NADPH production, probably used in the degradation of reactive oxygen species, which was corroborated by the higher expression of detoxification enzymes and response to oxidative stress. Additionally, it has been observed by our group metabolic differences between the yeast and mycelium phases of *P. brasiliensis* and *P. lutzii*. Proteomic analysis described a more anaerobic metabolism in the yeast phase of *P. lutzii* compared to mycelium [30]. And, *P. brasiliensis* presents a more aerobic mechanism in the yeast phase, when compared to mycelium [31].

In addition to metabolic divergences, virulence divergences were also found. Siqueira and collaborators [32] described that *P. brasiliensis* generates less activation and cellular responses in macrophages than *P. lutzii*. Carvalho et al., showed that the *P. brasiliensis* developed a type of PCM more aggressive in mice than *P. americana* [33]. More recently Amaral and collaborators [34] in a comparative study between different strains of *Paracoccidioides* spp., derived of in vivo infection, showed that the *P. brasiliensis* had a higher viral load in spleen, liver and, lungs than the other species, which was related with greater virulence.

With this context, the main objective of our work is the identification of cell wall differentially expressed proteins between *P. brasiliensis* strain *Pb18* and *P. americana* strain *Pa03*. Our study demonstrated that there is a difference in protein expression between *P. brasiliensis* and *P. americana* cell wall, which helps in the understanding of the biology of *Paracoccidioides*, and its interaction with the host.

2. Materials and methods

2.1. *Paracoccidioides* species and growth conditions

Yeast cells from *P. americana* and *P. brasiliensis* (ATCC 32069) were maintained *in vitro* in brain heart infusion medium (BHI), plus 4% (w/v) glucose, and 1% (w/v) of base agar at 36 °C pH 7.0, for 4 days. To obtain cells in exponential phase, the yeasts were cultured in BHI liquid medium added of 4% (w/v) glucose 36 °C at 72 hours in agitation by 150 (rpm).

2.2. Cell lysis, obtaining enriched fraction from the cell wall

For cell lysis and obtaining the enriched fraction from the cell wall, the protocol established by Araujo et al. [28] was used. After 72 hours of inoculation in BHI liquid, cells were collected and five washes were made with lysis buffer (10mM Tris-HCl, 2mM CaCl₂, 1mM of PMSF (phenyl-methyl-sulfonyl-fluoride) pH 8.5), at 1200x g, 10 minutes at 4 °C. The cells were resuspended in a 10 mM Tris-HCl pH 8.0 buffer, containing 1 mM PMSF. Cell lysis was mechanically performed by macerating using porcelain mortar in the presence of liquid nitrogen. The obtained material was resuspended in lysis buffer with glass beads and incubated for 1 hour at 4 °C under strong agitation. After incubation, the cells were washed by centrifugation (1200x g, 10 minutes at 4 °C). To remove cytoplasmic contaminants, the sediment was subjected to five washes with ice water and five washes with NaCl at 5%, 2%, and 1% (w/v), respectively. For extraction of proteins bound by ionic interactions and disulfide bridges, extraction buffer (Tris HCl 50mM, pH 7.8, SDS (w/v) 2%, EDTA 100mM, DTT 10mM, β-mercaptoethanol 40mM) was used, in a 1:1 relation. The mixture was incubated at 100 °C for 10 minutes, after which the material was concentrated to 1200g for 10 minutes. To remove remnants of reagents such as SDS, and to concentrate the material, the sediment from the previous step was subjected to three washes with ultrapure water, and three with 50 mM NH₄HCO₃ ammonium bicarbonate solution, pH 8.5, in 10 kDa filters (Amicon Ultra centrifugal filter, Millipore). Subsequently, the proteins were precipitated following the protocol of the 2D-Clean-up Kit (GE Healthcare), and the fractions were concentrated by speed vacuum and stored at 20 °C until digestion.

2.3. Triptic digestion

The protein concentration was determined by fluorimetry with the Qubit Fluorometric quantification kit (ThermoFisher Scientific). For the digestion with trypsin 300 µg/µl of protein extract was used. The extracts were submitted to digestion with trypsin as established by Araujo and collaborators with some modifications [28]; 300 µg/µl of protein was resuspended in 60 µl of the 50mM NH₄HCO₃ solution, pH 8.5; after Rapigest SF 0.2% (v/v) surfactant (Waters, USA) was added, and the mixture was incubated at 80 °C for 15 minutes. After, a reduction step was performed with 100 mM DTT, with incubation for 30 minutes at 60 °C; 300 mM iodoacetamide was added and the material was kept at room temperature, in the dark for 30 minutes. Digestion was performed with trypsin at a ratio of 1:100 (Promega) and the mixture was incubated at 37 °C for 12 hours. Subsequently, 5% (v/v) trifluoroacetic acid was added, and the mixture was incubated for 90 minutes at 37 °C. Finally, the sample was centrifuged at 10,000g for 30 minutes at 4 °C and the supernatant was concentrated in a speed vacuum. For peptides desalination was used Stage Tips (stop and go extraction tips) C18 protocol as described by Yanbao and collaborators [35] and the material was concentrated in a speed vacuum.

2.4. Sample preparation for analysis by Liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS)

The peptides were resuspended in 60 µL of 20 mM ammonium formate, pH 10, and as an endogenous standard, phosphorylase B (PHB) was used at a final concentration of 200 fmol / µL. Aliquots of 5 µg of the sample, in triplicate, were separated by high-performance liquid chromatography, in nanoscale, coupled to a mass spectrometer (nano UPLC-MSE). The samples were subjected to high-resolution liquid chromatography, on a nanoscale using the ACQUITY UPLC® M-Class system (Waters Corporation, USA). The first dimension was an XBridge®Peptide reverse-phase pre-column. The peptides were subjected to five fractionations, with different concentrations of acetonitrile (10.8%, 14%, 16.7%, 20.4% and 65%). In the second dimension, each fraction was eluted in Trap trapping column, 2D Symmetry® 5µm BEH100 C18, 180 µm x 20mm (Waters, USA) and passed through separation in an analytical column Peptide CSHTM BEH130 C18 1.7 µm, 100 µm x 100 mm (Waters, USA), in a flow of 0.4 µl / min at 40 °C. The peptides were identified using the Q-TOF-

MS Synapt mass spectrometer (Waters, Manchester, UK). [Glu1] -Fibrinopeptide B (GFB) was used as a standard for calibrating mass, being measured every 30 seconds. Three experimental replicates were obtained for each sample. The obtained data were processed with ProteinLynxGlobal Server (PLGS) version 3.0.2 (PLGS) software (Waters, Manchester, UK). The identification of peptides was made by comparing the spectra obtained with the sequences available in the genomic database Uniprot (<https://www.uniprot.org>). Proteins identified showed a minimum of 1 matched peptide and 5 fragments, where at least 2 fragments belonged to the same peptide.

2.5. In silico analysis

For the prediction of proteins secreted by non- classical route was used the Secretome P tool (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>), and for classical route was used SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). To establish the identity of hypothetical proteins was used BLASTp (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins). For the functional classification of proteins was used the FUNCAT catalog available in the data bank of the Pedant (<http://pedant.gsf.de/genomes.jsp?prefix=P&category=fungal>). Statistical analyzes were determined with the free software R, and the data significance was determined with the T-student test; the fold change was calculated with the protein concentration (fmol).

2.6. SDS-PAGE and western blot

Protein extract was validated in 12% SDS-PAGE, in a vertical electrophoresis chamber at 150V. Protein visualization was performed by coomassie blue stain. The immunoelectrotransfer to a nitrocellulose membrane for 17 hours at 40 V. Proteins in SDS-PAGE were transferred to a nitrocellulose membrane that was then incubated with polyclonal anti-catalase P at 1:500 [36], anti-enolase at 1:40000 [37], anti-fructose-1, 6-bisphosphate aldolase [38], 1:1000, dilution, for 2 h at room temperature. After washing, the membranes were incubated with peroxidase-coupled mouse anti-IgG secondary antibody (1:1000 dilution) or rabbit anti-IgG (1:30000) (Sigma-Aldrich). The reaction was revealed by 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) and nitroblue tetrazolium (NBT).

3. Results

3.1. Proteomic analysis

In our study, a comparative proteomic analysis of the cell wall was made of *P. brasiliensis* and *P. americana*; for this purpose, enriched cell wall extracts were processed in duplicate, as described above. Enriched extracts were obtained through mechanical lysis of yeast cells of both species and cytoplasmic and extracellular proteins were eliminated through multiple washes. The absence of proteins in the solution of the last wash indicates the predominant presence of cell wall intricate proteins. Subsequently, proteins covalently linked through disulfide bridges were extracted by treatment with reducing agents and SDS; later an assessment of the quality of the extracts was made by SDS-PAGE, (supplemental figure 1). After processing by NanoUPLC-MS^E, a quality analysis of the generated data was performed. The false-positive rate was less than 1.0, the mass error tolerance for peptide identification was under 15 ppm, and the peptide detection class graphs show that less than 20% of the data had a loss of cleavage by trypsin (supplemental figures 2,3,4,5).

A total of 29,531 peptides and 1,713 proteins were identified (data not shown). The integration of the information obtained to shows that 508 proteins identified for the two species (supplemental table 1), 90 were found only in *P. americana*, 207 only in *P. brasiliensis* and 211 were present in both species. The analysis of prediction of protein secretion showed that more than 50% of the proteins recovered from the protein extracts of the wall of both species did not have a signal of secretion by the classical route or by non-conventional routes. This same analysis showed that around 40% of the proteins recovered in both species were predicted as secreted by the non-classical route and that less than 5% were predicted as secreted by the classical route (Figure 1, supplemental Table 1)

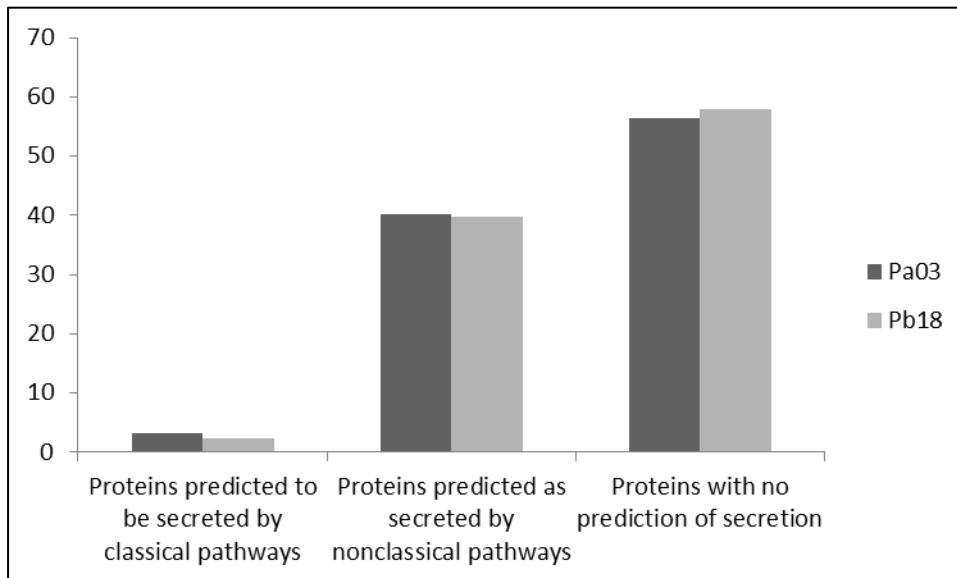


Figure 1. Analysis of protein secretion pathway. Prediction of proteins secreted by conventional and unconventional routes and proteins without prediction of secretion signal in *P. americana* e *P. brasiliensis* cell wall proteome in accordance with the SignalP and SecretomeP programs.

The functional classification was performed and the relative number of proteins in each category was determined (Figure 2). The qualitative analysis did not show differences between both species.

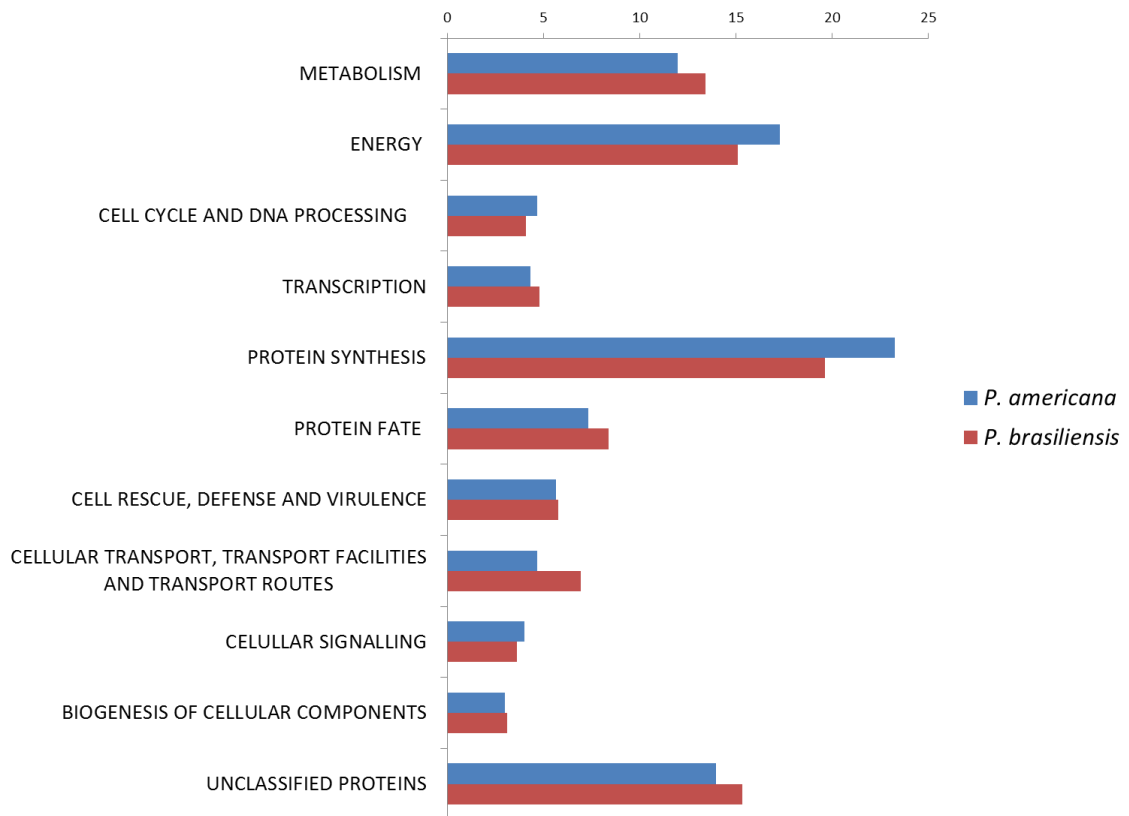


Figure 2. Functional classification of cell wall proteins. Relative classification of proteins found in the cell wall proteome of both species, according to the FunCat catalog.

To establish quantitative differential expression of proteins between species a Student's t-test was performed; the results showed that 90 and 307 proteins were up-regulated in *P.americana* and *P.brasiliensis* respectively (supplemental Table 1).

3.2. Cell adhesion-related proteins present in the cell wall are more induced in *P. brasiliensis* yeast cells.

The quantitative expression analysis showed that proteins associated with adhesion to extracellular matrix components were generally more expressed in *P. brasiliensis* than *P. americana* (table 1, and figure 3). Enolase (ENO) (C1G9X3), Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (C1G5F6), and 14-3-3-like protein 2 (C1GB04) were three times more expressed in *P. brasiliensis* than in *P. americana* (table 1 and figure 3). The 14-3-3-like protein 2, not was predicted as a secreted protein (supplemental table 1) but its adhesion capacity has already been determined [39]. Another, 14-3-3 protein (C1G9X0) was six-time more expressed in *P. brasiliensis* than in *P. americana*. Other proteins with adhesive function as fructose-1, 6-bisphosphate aldolase 1 (FBP) (C1G1C8) and phosphoglycerate kinase (PGK) (C1G4N0), related specifically to plasminogen activation [38], which were strongly more expressed in *P. brasiliensis*; FBP was 14 and PGK was 23 fold more expressed in *P. brasiliensis* than *P. americana* (table 1 and figure 3). In the western blot assay made with cell wall extracts of both species, it shown a greater amount of aldolase in the *Pb18* extract, which confirms the result found in the proteome (figure 4). However, that same test did not show an evident difference between the amount of enolase in the cell wall between species (figure 4). Gp43 (C1GK29) was the only adhesion-related protein [40] that was more expressed in the *P. americana*, being found only in their cell wall proteome. Additionally, the triosephosphate isomerase (C1GI20) that binds preferentially to laminin [41] had no significant difference in expression between the two species (table 1 and figure 3).

Table 1. Proteins described in the literature as related to adhesion, regulated in *P. brasiliensis* and *P. americana* cell wall proteome.

| Accession | Annotation | p-value | Mean protein concentration (fmol) <i>Pa03</i> | Mean protein concentration (fmol) <i>Pb18</i> | Fold change <i>Pb18/Pa03</i> |
|------------------|------------------------------------------|----------------|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| C1GB04 | 14-3-3-like protein 2 | p < 0,05 | 44,42 | 156,02 | 3,51 |
| C1G9X0 | 14-3-3 family protein epsilon | p < 0,05 | 25,38 | 152,77 | 6,02 |
| C1G9X3 | Enolase | p < 0,05 | 101,84 | 333,45 | 3,27 |
| C1G5F6 | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | p < 0,05 | 122,29 | 405,11 | 3,31 |
| C1G1C8 | Fructose-1,6-bisphosphate aldolase 1 | p < 0,05 | 4,56 | 64,08 | 14,05 |
| C1G4N0 | Phosphoglycerate kinase | p < 0,05 | 7,72 | 182,41 | 23,64 |
| C1GI20 | Triosephosphate isomerase | p > 0,05 | 22,92 | 32,27 | 1,41 |
| C1GK29 | Immunodominant antigen Gp43 | * | 6,96 | 0,00 | - |

Accession: number accession of Uniprot database. **Annotation:** description of protein names identified by mass spectrometry. **p-value:** Protein found exclusively in the *P. americana* cell wall: *; protein found exclusively in the *P. brasiliensis* cell wall: **; differentially expressed protein: p < 0,05. **Mean of protein concentration (fmol):** mean of protein concentration (fmol) identified by mass spectrometry. **Fold change:** level of protein expression.

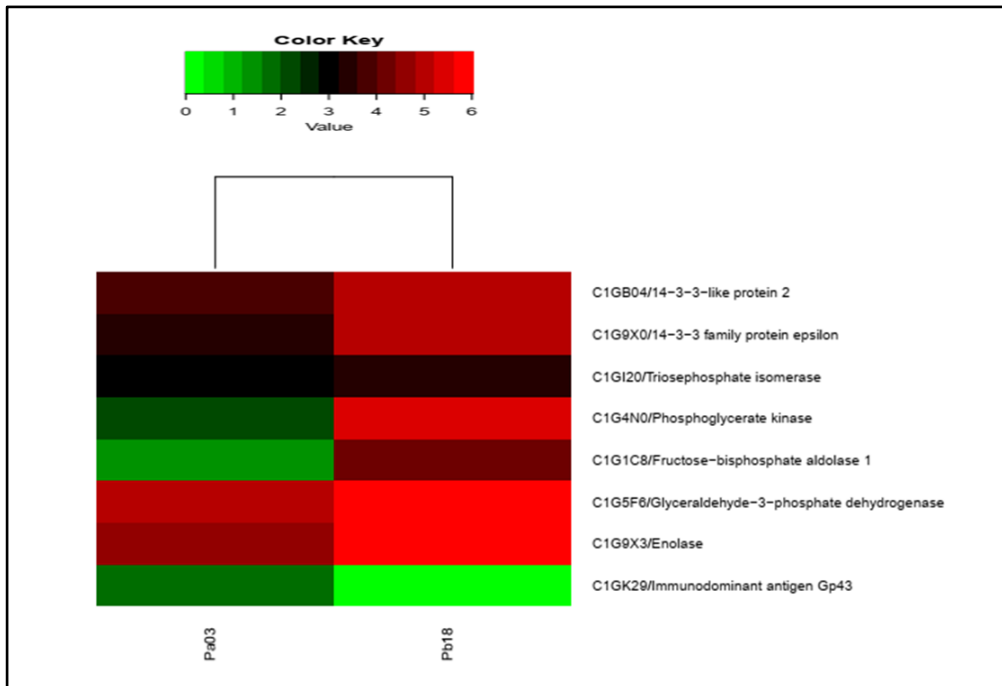


Figure 3. Heat map of adhesion-related proteins. Log of the mean concentration (fmol) of *P. americana* and *P. brasiliensis*. Protein without significant difference (Black), up regulated proteins (Red), down regulated proteins (Green).

3.3. Confirmatory assays using western blot analysis

Western blot assays analyses were performed with ENO and FBP antibody (Figure 4).

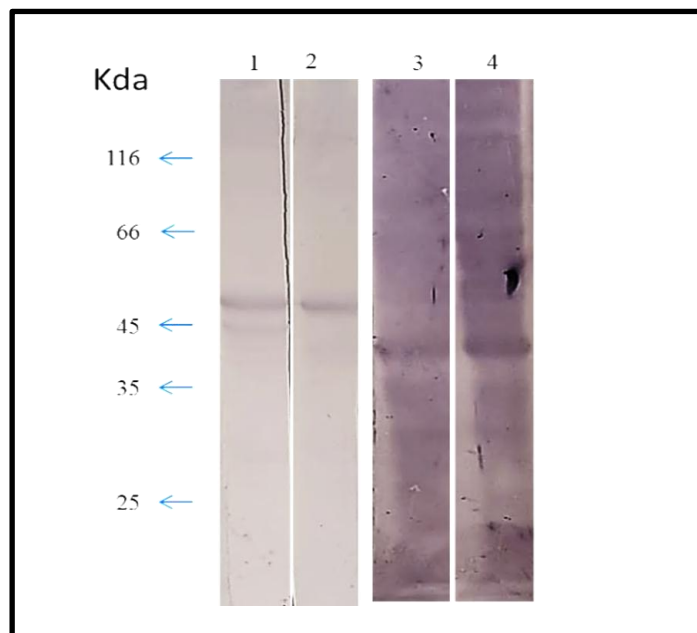


Figure 4. Western blot of the ENO and FBP in *P. americana* and *P. brasiliensis* cell wall extracts. Lane 1: ENO *Pa03*. Lane 2: ENO *Pb18*. Lane 3: FBP *Pa03*. Lane 4: FBP *Pb18*. Enolase (47Kda). FBP (40Kda).

3.4. Differential expression of proteins associated with response to heat shock

Some proteins related to the response to heat shock had a difference in cell wall expression between the two species, and in general, they were more abundant in *P. brasiliensis*; among them, the Hsp90 co-chaperone AHA1 (C1G445) that was 55 times more expresses in *P. brasiliensis* than in *P. americana*. Also the heat shock protein STI1 (C1GAU3), which was found in high concentration, only in the cell wall proteome of *P. brasiliensis* (table 2 and figure 5).

Table 2. Regulated proteins of *P. brasiliensis* and *P. americana* associated with heat stress response.

| Accession | Annotation | p-value | Mean protein concentration (fmol) <i>Pa03</i> | Mean protein concentration (fmol) <i>Pb18</i> | Fold change <i>Pb18/Pb03</i> |
|---------------|--------------------------------|----------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------------|
| C1G0W1 | DnaJ domain-containing protein | ** | 0 | 4,27 | - |
| C1G240 | DnaJ domain protein Psi | ** | 0 | 2,76 | - |
| C1G7T3 | Chaperone DnaJ | ** | 0 | 15,24 | - |
| C1GAU3 | Heat shock protein STI1 | ** | 0 | 107,60 | - |
| C1GMV5 | DnaJ domain protein | ** | 0 | 15,67 | - |
| C1G0P0 | Hsp7-like protein | p < 0,05 | 178,35 | 448,84 | 2,52 |
| C1G1M5 | Hsp98-like protein | p < 0,05 | 26,61 | 79,75 | 3,00 |
| C1G445 | Hsp90 co-chaperone AHA1 | p < 0,05 | 2,97 | 164,53 | 55,41 |
| C1G6F6 | Hsp75-like protein | p < 0,05 | 60,41 | 215,17 | 3,56 |
| C1G6I0 | Heat shock protein Hsp88 | p < 0,05 | 37,67 | 153,86 | 4,08 |
| C1G9U8 | Chaperone DnaJ | p < 0,05 | 22,91 | 181,11 | 7,91 |
| C1GKC9 | Hsp90-like protein | p < 0,05 | 367,35 | 921,44 | 2,51 |
| C1GLX8 | Hsp60-like protein | p < 0,05 | 158,00 | 582,59 | 3,69 |
| C1G514 | Hsp90 co-chaperone Cdc37 | p < 0,05 | 1,64 | 26,94 | 16,46 |
| C1G8H6 | Chaperone DnaK | p < 0,05 | 197,55 | 283,87 | 1,44 |
| C1G9M7 | 30 kDa heat shock protein | p < 0,05 | 23,01 | 80,39 | 3,49 |
| C1GLI2 | Hsp72-like protein | p < 0,05 | 327,45 | 771,64 | 2,36 |

Accession: number accession of Uniprot database. **Annotation:** description of protein names identified by mass spectrometry. **p-value:** Protein found exclusively in the *P. americana* cell wall: *; protein found exclusively in the *P. brasiliensis* cell wall: **; differentially expressed protein: p < 0,05. **Mean of protein concentration (fmol):** mean of protein concentration (fmol) identified by mass spectrometry. **Fold change:** level of protein expression.

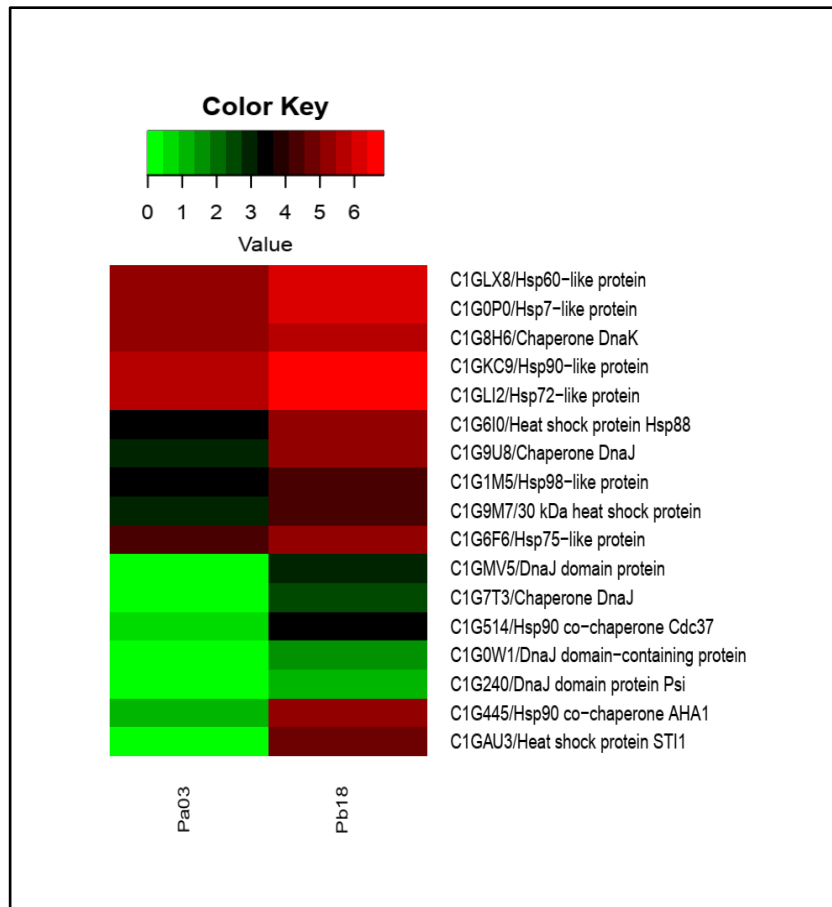


Figure 5. Heat map of response to thermal shock associated proteins. Log of the mean concentration (fmol) of *P. americana* and *P. brasiliensis*. Protein without significant difference (Black), *up* regulated proteins (Red), *down* regulated proteins (Green).

3.5. Differential expression of proteins associated with detoxification

Some proteins associated with detoxification were differentially expressed in the cell wall proteome of the two species studied (table 3); among these proteins, the peroxisomal catalase (C1G0D4), which was found only in the *P. americana* proteome. This protein was previously found to be differentially expressed in this species in a previous proteomic study [29].

To verify this information, a cell wall extract western blot analysis were performed (Figure 6).

A protein that was highly expressed in *P. brasiliensis* was cytochrome c peroxidase, mitochondrial (C1G7K8) (table 3), this protein was shown to be important for survival to the immune response of the host [42].

Table 3. Proteins regulated in pared of *P. brasiliensis* and *P. americana* associated with oxidative stress response.

| Accession | Annotation | p-value | Mean protein concentration (fmol) Pa03 | Mean protein concentration (fmol) Pb18 | Fold change Pb18/Pa03 |
|---------------|----------------------------------------|----------|----------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------|
| C1G0D4 | Peroxisomal catalase | * | 15,83 | 0 | - |
| C1G7E0 | Mitochondrial peroxiredoxin PRX1 | * | 15,64 | 0 | - |
| C1GKT9 | Peroxisomal matrix protein | ** | 0 | 11,49 | - |
| C1G489 | Superoxide dismutase SOD2 | ** | 0 | 8,08 | - |
| C1G5D0 | Glutamate-cysteine ligase | ** | 0 | 0,09 | - |
| C1G7K8 | Cytochrome c peroxidase, mitochondrial | p < 0,05 | 79,94 | 401,97 | 5,02 |
| C1GE18 | Thioredoxin | p > 0,05 | 3,43 | 11,93 | - |

Accession: number accession of Uniprot database. **Annotation:** description of protein names identified by mass spectrometry. **p-value:** Protein found exclusively in the *P. americana* cell wall: *; protein found exclusively in the *P. brasiliensis* cell wall: **; differentially expressed protein: p < 0,05. **Mean of protein concentration (fmol):** mean of protein concentration (fmol) identified by mass spectrometry. **Fold change:** level of protein expression.

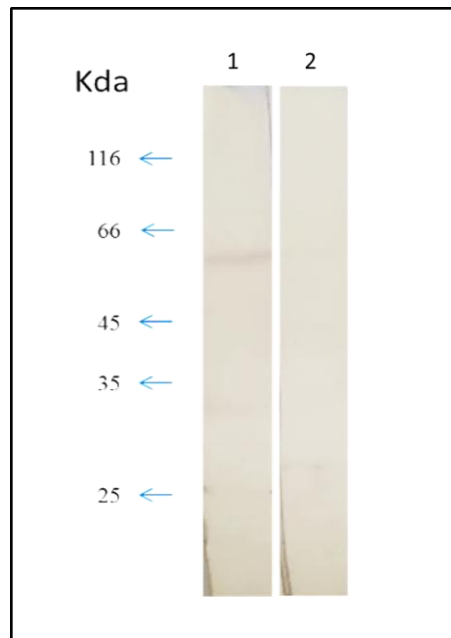


Figure 6. Western blot of Catalase P in the *P. americana* and *P. brasiliensis* cell wall extracts. Lane 1: Cat P Pa03. Lane 2: Cat P Pb18. Catalase P (54 Kda).

4. Discussion

Cell wall proteins are important mediators of virulence and pathogenicity processes, both, proteins secreted by conventional routes [18] and proteins secreted by alternative routes [17, 43] actively participate in these processes. Proteomic analyzes of the fungal cell wall extracts have shown the presence of proteins considered classical and non-classical proteins [11, 16, 44]. In *P. lutzii*, a cell wall proteomic study done by our group [28] showed that 57 and 42% of proteins released by reducing agents, of the yeast and mycelium, respectively, were predicted as secreted by alternative routes, and 4 and 7% of the proteins, from yeast and mycelium, respectively, were predicted to be secreted by the classical route; In addition 40 and 51%, of the yeast and mycelium proteins, were not predicted as secreted by classical or non-classical routes, a little lower number than that found in our study, which corresponded to 56% and 57% of proteins for *P. americana* and *P. brasiliensis* respectively (figure 1).

Although methods of analysis *in silico* have been performed to offer answers more corresponding to reality, it cannot be considered that proteins not predicted as secreted by the classical or non-classical route, are simple contaminants, that remained intricate in the polysaccharide skeleton after cell lysis and treatment with reducing agents [45, 46]; only more accurate studies can establish that answer. In our study, for example, triosephosphate isomerase (C1GI20) and 14-3-3-like protein 2 (C1GB04) were identified, and, they were not predicted as secreted by classic or non-classic route by the *in silico* analysis (supplemental table 1), meanwhile, its location in the *Paracoccidioides* spp., cell wall has already been demonstrated by microscopic analysis [41, 47]. By another hand, to date there are two published works on the proteomic analysis of the *Paracoccidioides* spp., cell wall; one published by our group, which makes a descriptive analysis of the *P. lutzii* cell wall [28], and the other that is a descriptive comparative analysis between the *P. americana* and *P. brasiliensis* surface proteome [27], the same species that we use in our work. Meanwhile, there are two differences between our work and the one published by Longo et al, [27]; the first is the approach used, Longo et al., worked with cell shaving for the extraction of cell surface proteins (surfome) [44], whereas we used cell lysis and subsequent treatment with reducing agents to release primarily disulfide-bound proteins [17]. The second difference is the objective, although both are comparative studies, the Longo et al., work is just descriptive whereas, we

performed a labor free quantitative approach, seeking to find differences in the protein expression.

The analysis of the cell wall proteome of *P. brasiliensis* and *P. americana*, brought us new information that helps in the improvement of the knowledge of the host-parasite relationship. In search of new information, we first made a qualitative analysis of the proteins found in the *P. brasiliensis* and *P. americana* cell wall proteome, which did not evidence the enrichment of a specific functional category (figure 2); being that both species showed a greater number of proteins associated with energy production and metabolism in the cell wall (Figure 2); these categories were also the most represented groups in the previous cell wall *Paracoccidioides* spp., proteomic studies [27, 37].

In order to identify proteins differentially expressed, a quantitative expression analysis was performed. This analysis showed interesting results, the first was the largest expression of adhesion-related proteins in *P. brasiliensis*, like ENO and GAPDH, that consistently also more expressed in the *P. brasiliensis* cell proteome in a comparative study between species [29], thus suggesting that its greater intracellular expression may trigger greater expression in the cell wall, where are associated with adhesive and virulence function. Additionally, two other adhesion-associated proteins were up-regulated in the *P. brasiliensis* cell wall, the 14-3-3-protein 2 and 14-3-3 family protein epsilon, Oliveira et al., showed that the 14-3-3 protein and the ENO were the main proteins associated with adhesion which were up-regulated in *P. brasiliensis* in vitro infection [48], this same work showed that *P. brasiliensis* have major adhesion to pneumocytes and it was more virulent than *P. lutzii*. The 14-3-3 proteins have been shown to be important for pathogenesis; for example, 14-3-3 epsilon peptide was effective in limiting infection with *Paracoccidioides* spp., in *Galleria mellonella* larvae [49]. In the same way, a silenced strain of *P. brasiliensis* Pb14-3-3 aRNA was less pathogenic, as it caused a lower fungal load and less granuloma formation in a murine model [50]. Other up-regulated proteins in our proteomic study were the PGK, and FBP, which together with GAPDH were the main up-regulated enzymes in the in vivo infection with *P. brasiliensis* (Pb18), in a comparative proteomic study that sought to establish the main up-regulated proteins in the infection of B10. A and BALB/c mice with different strains of *Paracoccidioides* [34].

ENO, the FBP and the PGK are associated with sequestration and activation of plasminogen by pathogens. The ability of the ENO and FBP to bind and activate

plasminogen has already been demonstrated in *Paracoccidioides spp.*, [38, 51], while PGK was shown to activate plasminogen in bacteria and the *C. albicans* [52-54], and binds to plasminogen in *P. lutzii* [38]. Plasminogen is an enzyme with fibrinolytic properties, it is known that one of the strategies used by microorganisms for tissue invasion is the sequestration of fibrinolytic enzymes, such as plasminogen, which in its active form, plasmin, disrupts fibrin, consequently contributes to the fungus virulence [55]. The greater expression of these proteins in the *P. brasiliensis* cell wall could be associated with greater fibrinolytic capacity. Another important encounter in the analysis of quantitative expression was the greater expression of proteins associated with the response to thermal shock in *P. brasiliensis*, specifically the Hsp90 co-chaperone AHA1 (Activator of Hsp90 ATPase) which was 55 times more expressed in *P. brasiliensis* and Hsp STI1, which was found only in the *P. brasiliensis* cell wall proteome (Figure 3). This encounter is relevant since, in a previous work demonstrated a greater resistance at 42°C of the *P. brasiliensis* yeast than the *P. americana* yeast [29]. In the cell wall HSP90, has a protective function of proteins located on the surface, as demonstrated in *Aspergillus fumigatus*, in which the protein was important to prevent the aggregation of proteins that form part of the cell wall integrity pathway [55]. Other study demonstrated that the repression of HSP90, potentiates negative effect in the cell wall of stressors such as congo red and casponfungina in *A. fumigatus* [56]; moreover, a recent study showed that HSP90 monoclonal antibodies successfully opsonized *P. lutzii* and *P. brasiliensis* cells in co-incubation with macrophages [57], which opens a possibility for future immunotherapy research.

In our work, oxidative stress response proteins were also differentially expressed; catalase P, an enzyme that converts hydrogen peroxide into water and oxygen, and the main antioxidant enzyme in the peroxisome, was found to be more expressed in *P. americana* than in *P. brasiliensis*; this protein has been recovered in *Paracoccidioides spp.*, cell wall proteome and secretome studies [27, 28]. This protein was also more expressed in *P. americana* in a comparative proteomic study, among four species of *Paracoccidioides* [29]. In *Candida*, the peroxisomal catalase was identified as a plasminogen binding protein [54]. Cytochrome c peroxidase mitochondrial was the most abundant detoxification protein in *P. brasiliensis* cell wall; this protein was positively regulated in *P. brasiliensis* during the interaction with macrophages, and its silencing attenuates fungal virulence [42].

As shown, our data support the hypothesis that *P. brasiliensis* is a species that has a major capacity for adhesion than the *P. americana* and that it possesses a considerable arsenal of proteins to respond to heat shock and oxidative stress in the cell wall, which may partly explain why in some studies this specie was more virulent [32-34]; Meanwhile, and contrastingly clinical studies have not shown evidence of real clinical differences between patients affected by *P. brasiliensis* and *P. americana* [58]; those divergences encourages new studies.

5. References

1. Shikanai-Yasuda MA, Mendes RP, Colombo AL et al. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. *Rev Soc Bras Med Trop* 50(5), 715-740 (2017).
2. Mendes RP, Cavalcante RS, Marques SA et al. Paracoccidioidomycosis: Current Perspectives from Brazil. *Open Microbiol J* 11 224-282 (2017).
3. Chaves AFA, Navarro MV, De Barros YN, Silva RS. Updates in *Paracoccidioides* Biology and Genetic Advances in Fungus Manipulation. 7(2), (2021).
4. Turissini DA, Gomez OM, Teixeira MM, Mcewen JG, Matute DR. Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*. *Fungal Genetics and Biology* 106 9-25 (2017).
5. Vilela R, Huebner M, Vilela C et al. The taxonomy of two uncultivated fungal mammalian pathogens is revealed through phylogeny and population genetic analyses. *Scientific Reports* 11(1), 18119 (2021).
6. Teixeira MDM, Cattana ME, Matute DR et al. Genomic diversity of the human pathogen *Paracoccidioides* across the South American continent. *Fungal Genetics and Biology* 140 103395 (2020).
7. Hopke A, Brown AJP, Hall RA, Wheeler RT. Dynamic Fungal Cell Wall Architecture in Stress Adaptation and Immune Evasion. *Trends Microbiol* 26(4), 284-295 (2018).
8. Hatinguais R, Willment JA, Brown GD. PAMPs of the Fungal Cell Wall and Mammalian PRRs. *Curr Top Microbiol Immunol* 425 187-223 (2020).
9. Amarante-Mendes GP, Adjemian S, Branco LM, Zanetti LC, Weinlich R, Bortoluci KR. Pattern Recognition Receptors and the Host Cell Death Molecular Machinery. *Frontiers in Immunology* 9(2379), (2018).
10. Hasim S, Coleman JJ. Targeting the fungal cell wall: current therapies and implications for development of alternative antifungal agents. *Future Med Chem* 11(8), 869-883 (2019).
11. Champer J, Ito JI, Clemons KV, Stevens DA, Kalkum M. Proteomic Analysis of Pathogenic Fungi Reveals Highly Expressed Conserved Cell Wall Proteins. *J Fungi (Basel)* 2(1), (2016).
12. Gow NaR, Latge J-P, Munro CA. The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. *Microbiology Spectrum* 5(3), (2017).

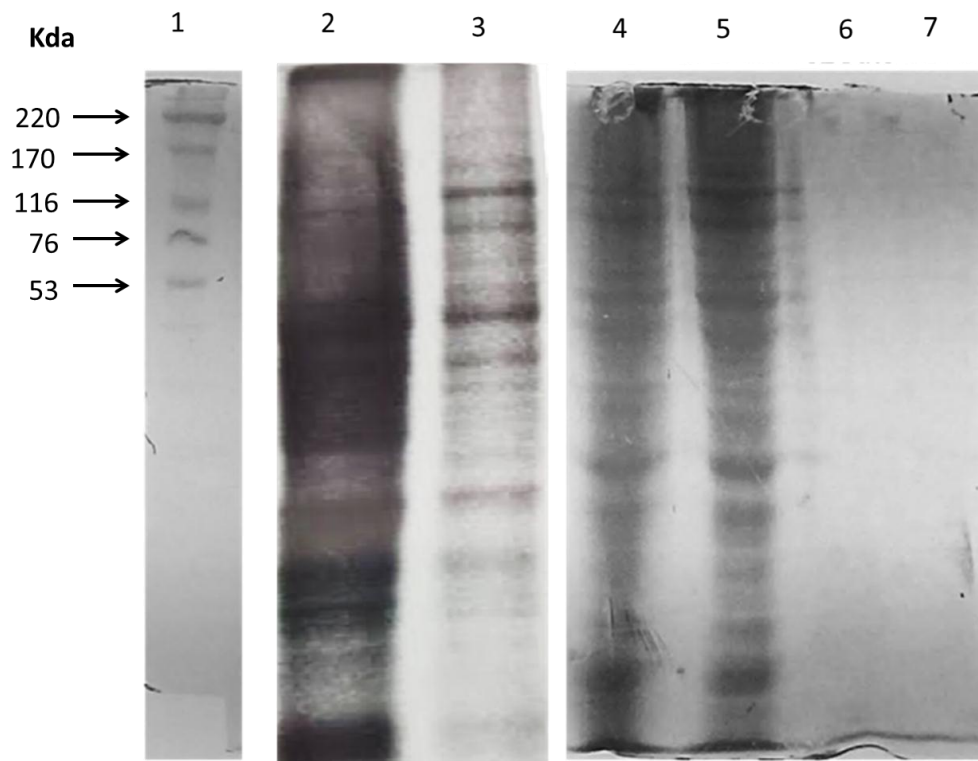
13. Garcia-Rubio R, De Oliveira HC, Rivera J, Trevijano-Contador N. The Fungal Cell Wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* Species. *Frontiers in Microbiology* 10(2993), (2020).
14. Souza ACO, Favali C, Soares NC et al. New Role of *P. brasiliensis* α -Glucan: Differentiation of Non-conventional Dendritic Cells. *Frontiers in Microbiology* 10(2445), (2019).
15. Herrera JR. Fungal cell wall structure, synthesis and assembly. 2, (2012).
16. Karkowska-Kuleta J, Kozik A. Cell wall proteome of pathogenic fungi. *Acta Biochim Pol* 62(3), 339-351 (2015).
17. Satala D, Karkowska-Kuleta J. Moonlighting Proteins at the *Candida* Cell Surface. 8(7), (2020).
18. Essen LO, Vogt MS, Mosch HU. Diversity of GPI-anchored fungal adhesins. *Biol Chem* 401(12), 1389-1405 (2020).
19. Reyna-Beltrán E, Iranzo M, Calderón-González KG et al. The *Candida albicans* ENO1 gene encodes a transglutaminase involved in growth, cell division, morphogenesis, and osmotic protection. *Journal of Biological Chemistry* 293(12), 4304-4323 (2018).
20. Zamith-Miranda D, Nimrichter L, Rodrigues ML, Nosanchuk JD. Fungal extracellular vesicles: modulating host-pathogen interactions by both the fungus and the host. *Microbes and Infection* 20(9), 501-504 (2018).
21. Miura N, Ueda M. Evaluation of Unconventional Protein Secretion by *Saccharomyces cerevisiae* and other Fungi. *Cells* 7(9), 128 (2018).
22. Baeza LC, Da Mata FR, Pigosso LL et al. Differential Metabolism of a Two-Carbon Substrate by Members of the *Paracoccidioides* Genus. *Frontiers in Microbiology* 8(2308), (2017).
23. De Souza AF, Tomazett MV, Freitas E Silva KS et al. Interacting with Hemoglobin: *Paracoccidioides spp.* Recruits hsp30 on Its Cell Surface for Enhanced Ability to Use This Iron Source. *Journal of Fungi* 7(1), 21 (2021).
24. Araújo FS, Coelho LM, Silva LDC et al. Effects of Argentilactone on the Transcriptional Profile, Cell Wall and Oxidative Stress of *Paracoccidioides spp.* *PLOS Neglected Tropical Diseases* 10(1), e0004309 (2016).
25. Tomazett PK, Castro NDS, Lenzi HL, De Almeida Soares CM, Pereira M. Response of *Paracoccidioides brasiliensis* Pb01 to stressor agents and cell wall osmoregulators. *Fungal Biology* 115(1), 62-69 (2011).

26. Almeida F, Antonieto AC, Pessoni AM et al. Influence of N-glycans on Expression of Cell Wall Remodeling Related Genes in *Paracoccidioides brasiliensis* Yeast Cells. *Curr Genomics* 17(2), 112-118 (2016).
27. Longo LVG, Da Cunha JPC, Sobreira TJP, Puccia R. Proteome of cell wall-extracts from pathogenic *Paracoccidioides brasiliensis*: Comparison among morphological phases, isolates, and reported fungal extracellular vesicle proteins. *EuPA Open Proteomics* 3 216-228 (2014).
28. Araújo DS, De Sousa Lima P, Baeza LC et al. Employing proteomic analysis to compare *Paracoccidioides lutzii* yeast and mycelium cell wall proteins. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom* 1865(11 Pt A), 1304-1314 (2017).
29. Pigosso LL, Parente AF, Coelho AS et al. Comparative proteomics in the genus *Paracoccidioides*. *Fungal Genet Biol* 60 87-100 (2013).
30. Rezende TCV, Borges CL, Magalhães AD et al. A quantitative view of the morphological phases of *Paracoccidioides brasiliensis* using proteomics. *Journal of Proteomics* 75(2), 572-587 (2011).
31. Araújo DS, Pereira M, Portis IG et al. Metabolic Peculiarities of *Paracoccidioides brasiliensis* Dimorphism as Demonstrated by iTRAQ Labeling Proteomics. *Frontiers in Microbiology* 10(555), (2019).
32. Siqueira IM, Fraga CL, Amaral AC et al. Distinct patterns of yeast cell morphology and host responses induced by representative strains of *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18) and *Paracoccidioides lutzii* (Pb01). *Med Mycol* 54(2), 177-188 (2016).
33. Carvalho KC, Ganiko L, Batista WL et al. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* and gp43 expression in isolates bearing known PbGP43 genotype. *Microbes Infect* 7(1), 55-65 (2005).
34. Do Amaral CC, Fernandes GF, Rodrigues AM, Burger E, De Camargo ZP. Proteomic analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* complex isolates: Correlation of the levels of differentially expressed proteins with in vivo virulence. 14(7), e0218013 (2019).
35. Yu Y, Smith M, Pieper R. A spinnable and automatable StageTip for high throughput peptide desalting and proteomics. (2014).
36. Pereira CA. Expressão heterológica e imunolocalização das proteínas HSP30 e catalase peroxissomal identificadas na parede de *Paracoccidioides spp.* interagindo com macrófagos. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular Dissertação de Mestrado (2018).

37. Donofrio FC, Calil ACA, Miranda ET et al. Enolase from *Paracoccidioides brasiliensis*: isolation and identification as a fibronectin-binding protein. *Journal of Medical Microbiology* 58(6), 706-713 (2009).
38. Chaves EG, Weber SS, Bao SN et al. Analysis of *Paracoccidioides* secreted proteins reveals fructose 1,6-bisphosphate aldolase as a plasminogen-binding protein. *BMC Microbiol* 15 53 (2015).
39. Assato PA, Da Silva Jde F, De Oliveira HC et al. Functional analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* 14-3-3 adhesin expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Microbiol* 15 256 (2015).
40. Vicentini AP, Gesztesi JL, Franco MF et al. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. *Infect Immun* 62(4), 1465-1469 (1994).
41. Pereira LA, Bão SN, Barbosa MS et al. Analysis of the *Paracoccidioides brasiliensis* triosephosphate isomerase suggests the potential for adhesin function. *FEMS Yeast Res* 7(8), 1381-1388 (2007).
42. Parente-Rocha JA, Parente AFA, Baeza LC et al. Macrophage Interaction with *Paracoccidioides brasiliensis* Yeast Cells Modulates Fungal Metabolism and Generates a Response to Oxidative Stress. *PLOS ONE* 10(9), e0137619 (2015).
43. Medrano-Díaz CL, Vega-González A, Ruiz-Baca E, Moreno A, Cuéllar-Cruz M. Moonlighting proteins induce protection in a mouse model against *Candida* species. *Microbial Pathogenesis* 124 21-29 (2018).
44. Gil-Bona A, Amador-García A, Gil C, Monteoliva L. The external face of *Candida albicans*: A proteomic view of the cell surface and the extracellular environment. *Journal of Proteomics* 180 70-79 (2018).
45. Klis FM, De Jong M, Brul S, De Groot PW. Extraction of cell surface-associated proteins from living yeast cells. *Yeast* 24(4), 253-258 (2007).
46. Klis F, Sosinska G, Groot P, Brul S. Covalently linked cell wall proteins of *Candida albicans* and their role in fitness and virulence. *FEMS yeast research* 9 1013-1028 (2009).
47. Silva JD, Oliveira HCD, Marcos CM et al. *Paracoccidioides brasiliensis* 30 kDa Adhesin: Identification as a 14-3-3 Protein, Cloning and Subcellular Localization in Infection Models. *PLOS ONE* 8(4), e62533 (2013).
48. De Oliveira HC, Da Silva Jde F, Scorzoni L et al. Importance of adhesins in virulence of *Paracoccidioides spp.* *Front Microbiol* 6 303 (2015).

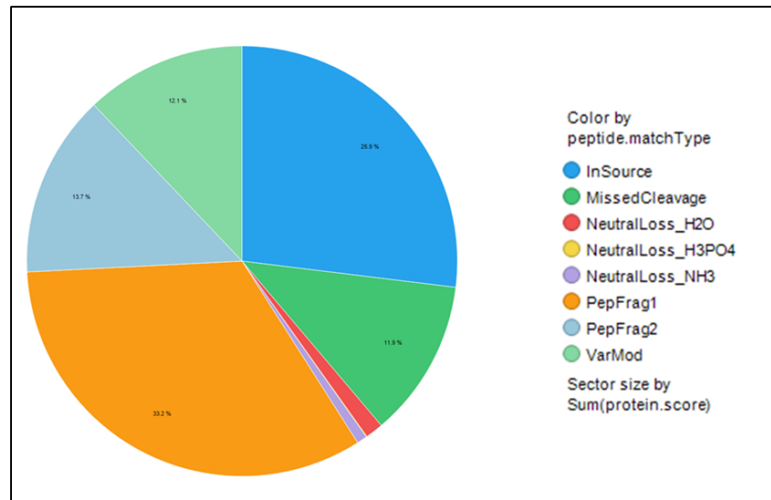
49. Scorzoni L, Alves De Paula E Silva AC, De Oliveira HC et al. In Vitro and In Vivo Effect of Peptides Derived from 14-3-3 *Paracoccidioides spp.* Protein. *Journal of Fungi* 7(1), (2021).
50. Marcos CM, De Oliveira HC, Assato PA, De Andrade CR, Fusco-Almeida AM, Mendes-Giannini MJS. *Paracoccidioides brasiliensis* 14-3-3 protein is important for virulence in a murine model. *Med Mycol* 57(7), 900-904 (2019).
51. Nogueira SV, Fonseca FL, Rodrigues ML et al. *Paracoccidioides brasiliensis* enolase is a surface protein that binds plasminogen and mediates interaction of yeast forms with host cells. *Infect Immun* 78(9), 4040-4050 (2010).
52. Boone TJ, Burnham CA, Tyrrell GJ. Binding of group B streptococcal phosphoglycerate kinase to plasminogen and actin. *Microb Pathog* 51(4), 255-261 (2011).
53. Fulde M, Bernardo-Garcia N, Rohde M et al. Pneumococcal phosphoglycerate kinase interacts with plasminogen and its tissue activator. *Thromb Haemost* 111(3), 401-416 (2014).
54. Crowe JD, Sievwright IK, Auld GC, Moore NR, Gow NA, Booth NA. *Candida albicans* binds human plasminogen: identification of eight plasminogen-binding proteins. *Mol Microbiol* 47(6), 1637-1651 (2003).
55. Rocha MC, Minari K. *Aspergillus fumigatus* Hsp90 interacts with the main components of the cell wall integrity pathway and cooperates in heat shock and cell wall stress adaptation. *23(2)*, e13273 (2021).
56. Lamoth F, Juvvadi PR, Fortwendel JR, Steinbach WJ. Heat shock protein 90 is required for conidiation and cell wall integrity in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell* 11(11), 1324-1332 (2012).
57. Moura Ánda, Oliveira DSLD, Paredes V et al. *Paracoccidioides* HSP90 Can Be Found in the Cell Surface and Is a Target for Antibodies with Therapeutic Potential. *Journal of Fungi* 6(4), 193 (2020).
58. De Macedo PM, Teixeira MDM, Barker BM, Zancopé-Oliveira RM, Almeida-Paes R, Francesconi Do Valle AC. Clinical features and genetic background of the sympatric species *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides americana*. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 13(4), e0007309 (2019).

6. Supplemental material

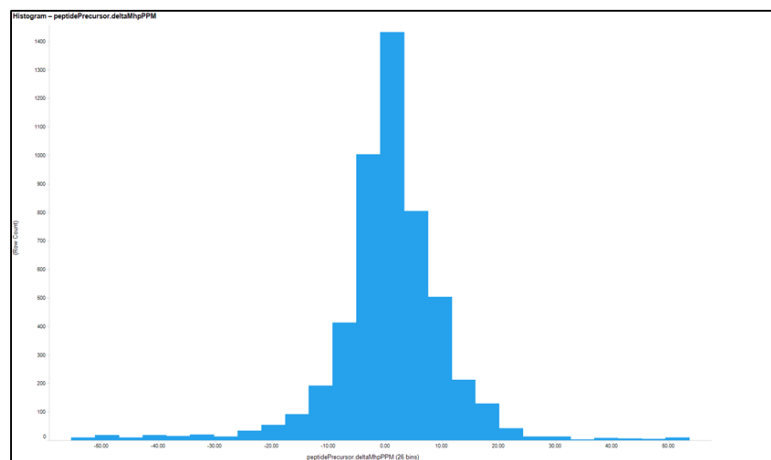


Supplemental Figure 1. Electrophoretic evaluation of proteins from *P. americana* and *P. brasiliensis* cell walls extracts. Lane 1, protein molecular weight marker. Lane 2, replica 1 *Pa03*. Lane 3, replica 1 *Pb18*. Lane 4, replica 2 *Pa03*. Lane 4, replica 2 *Pb18*. Lane 6 and 7, last wash before protein extraction in *Pa03* and *Pb18* respectively.

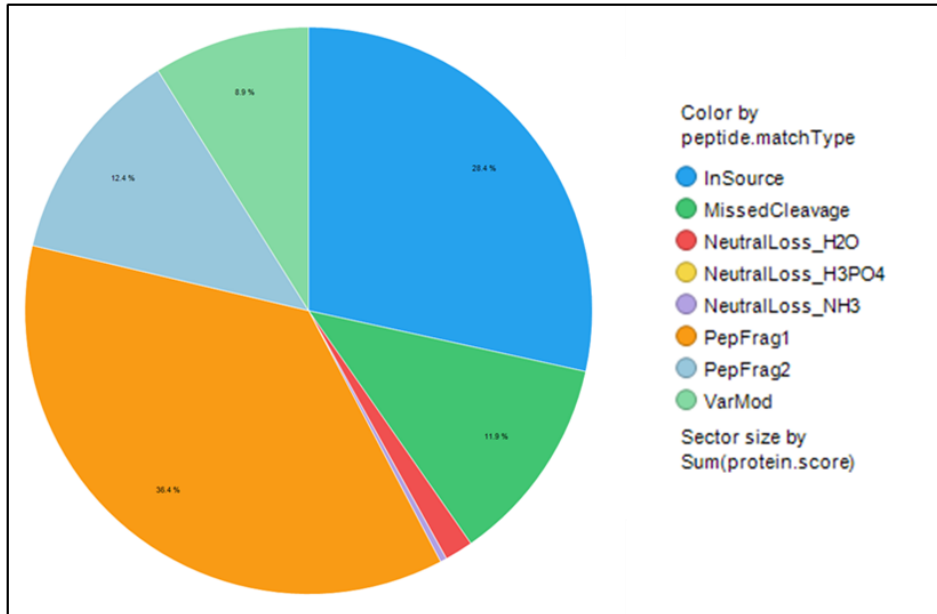
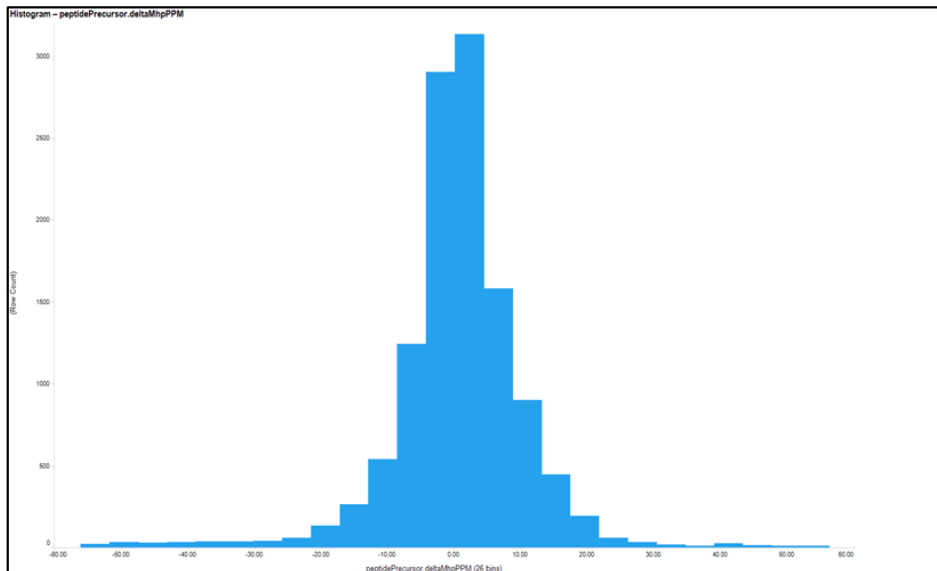
A.



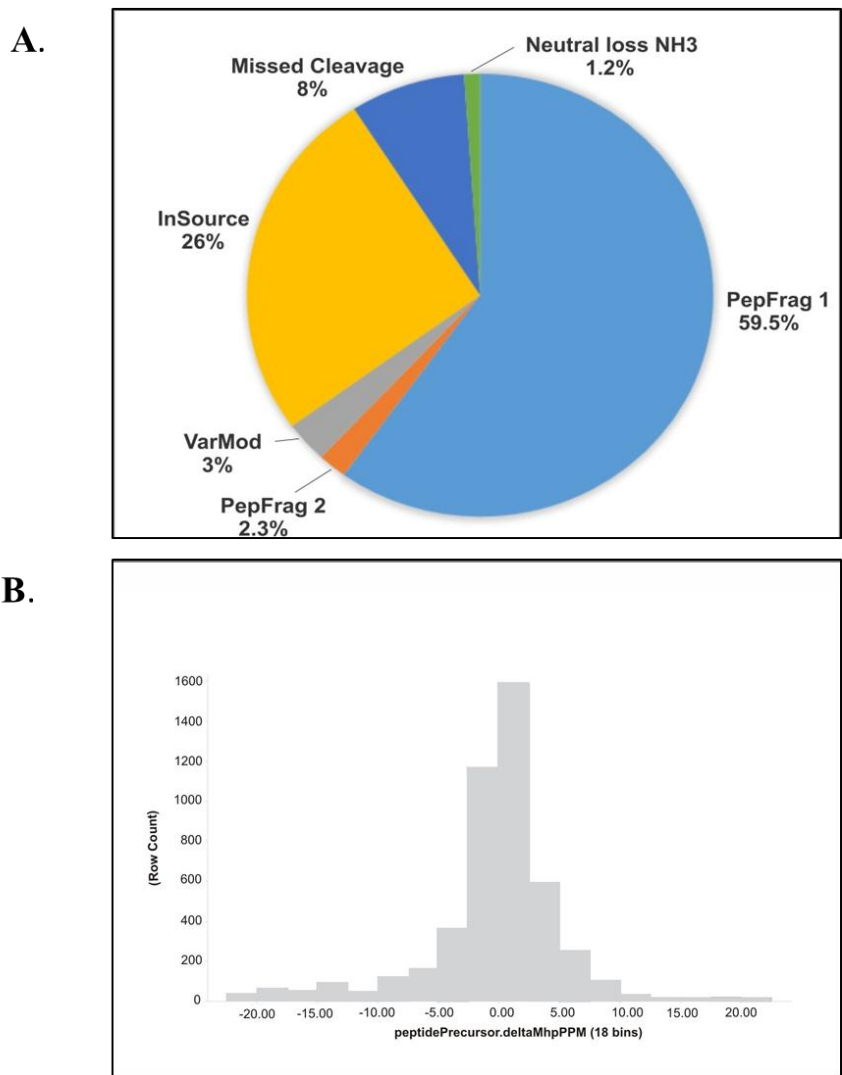
B.



Supplemental Figure 2. Quality graphs of proteomic analysis of the *P. americana*, replicate 1. A. Type of Peptide Detection. PepFrag1 and PepFrag2: method of identification of the bank in the Paracoccidioides database by PLGS. VarMod: Variable Modifications. InSource: fragmentation occurred in the ionization source. MissedCleavage: loss of trypsin cleavage. NeutralLoss: loss of precursors of water, ammonia and/or phosphoric acid. B. Mass Accuracy. The graph demonstrates accuracy in detection of peptide masses where 80% were detected in a range of 15 ppm of error.

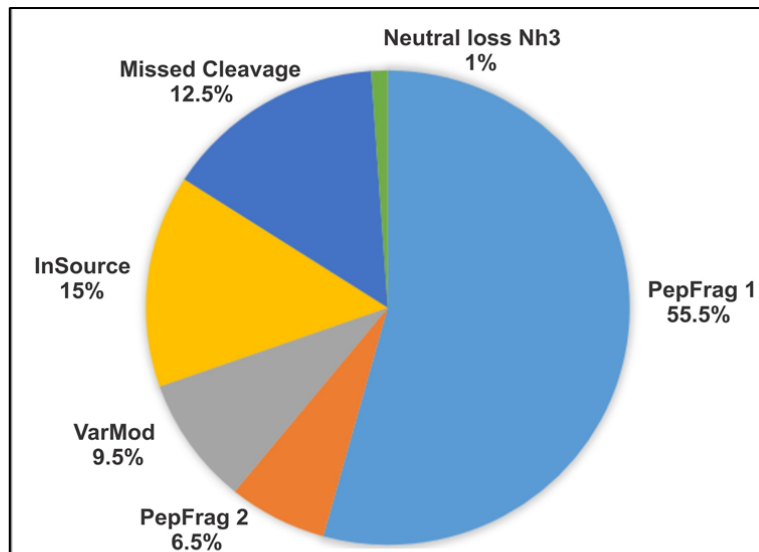
A.**B.**

Supplemental Figure 3. Quality graphs of proteomic analysis of the *P. brasiliensis*, replicate 1. A. Type of Peptide Detection. PepFrag1 and PepFrag2: method of identification of the bank in the Paracoccidioides database by PLGS. VarMod: Variable Modifications. InSource: fragmentation occurred in the ionization source. MissedCleavage: loss of trypsin cleavage. NeutralLoss: loss of precursors of water, ammonia and/or phosphoric acid. B. Mass Accuracy. The graph demonstrates accuracy in detection of peptide masses where 80% were detected in a range of 15 ppm of error.

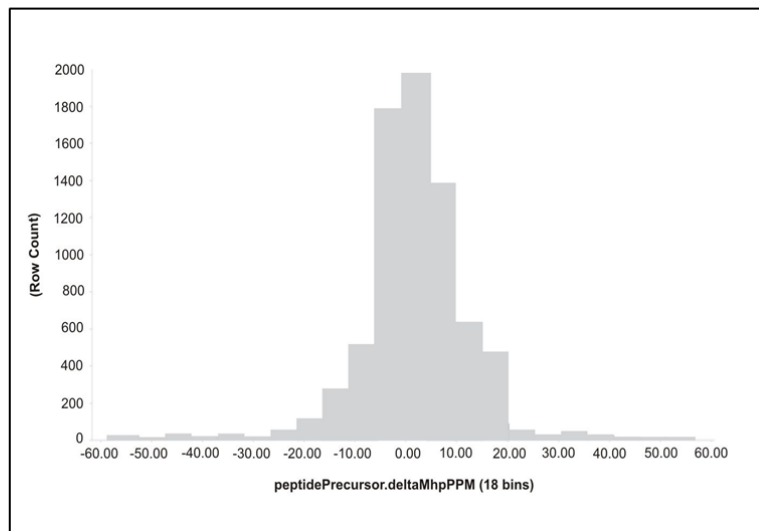


Supplemental Figure 4. Quality graphs of proteomic analysis of the *P. americana*, replicate 2. A. Type of Peptide Detection. PepFrag1 and PepFrag2: method of identification of the bank in the *Paracoccidioides* database by PLGS. VarMod: Variable Modifications. InSource: fragmentation occurred in the ionization source. MissedCleavage: loss of trypsin cleavage. NeutralLoss: loss of precursors of water, ammonia and/or phosphoric acid. B. Mass Accuracy. The graph demonstrates accuracy in detection of peptide masses where 80% were detected in a range of 15 ppm of error.

A.



B.



Supplemental Figure 5. Quality graphs of proteomic analysis of the *P. brasiliensis*, replicate 2. A. Type of Peptide Detection. PepFrag1 and PepFrag2: method of identification of the bank in the Paracoccidioides database by PLGS. VarMod: Variable Modifications. InSource: fragmentation occurred in the ionization source. MissedCleavage: loss of trypsin cleavage. NeutralLoss: loss of precursors of water, ammonia and/or phosphoric acid. B. Mass Accuracy. The graph demonstrates accuracy in detection of peptide masses where 80% were detected in a range of 15 ppm of error.

Supplemental table 1. Proteins found in *P. americana* and *P. brasiliensis* cell wall proteome

| METABOLISM | Accession | Annotation | Mean Score <i>Pb03</i> | Mean Score <i>Pb18</i> | Mean of protein concentration (fmol) <i>Pa03</i> | Mean of protein concentration (fmol) <i>Pb18</i> | p-value | SignalP/ SecretomeP | Function |
|-------------------|-----------|------------------------------------------------------------------------|------------------------|------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|---------|---------------------|-----------------------|
| | C1G0J6 | Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase | 949,10 | - | 9,90 | 0 | * | - | Amino acid metabolism |
| | C1GAA7 | Cystathionine beta-synthase | 1486,67 | - | 3,36 | 0 | * | - | Amino acid metabolism |
| | C1GDG5 | Cystathionine beta-synthase | 1198,51 | - | 4,33 | 0 | * | Secretome P | Amino acid metabolism |
| | C1GJ33 | Phenylacetate 2-hydroxylase | 1536,42 | - | 10,49 | 0 | * | - | Amino acid metabolism |
| | C1GLF6 | L-aminoadipate-semialdehyde dehydrogenase | 551,29 | - | 2,44 | 0 | * | - | Amino acid metabolism |
| | C1GLT7 | 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine S-methyltransferase | 337,48 | - | 2,76 | 0 | * | - | Amino acid metabolism |
| | C1GMI0 | Homogentisate 1_2-dioxygenase | 1319,87 | - | 6,86 | 0 | * | Secretome P | Amino acid metabolism |
| | C1FYJ9 | Pentafunctional AROM polypeptide | - | 698,06 | 0,00 | 8,86 | ** | - | Amino acid metabolism |
| | C1G248 | 4-aminobutyrate aminotransferase | - | 617,72 | 0,00 | 11,02 | ** | - | Amino acid metabolism |
| | C1G2X0 | Homoisocitrate dehydrogenase | - | 3155,41 | 0,00 | 59,43 | ** | - | Amino acid metabolism |
| | C1G312 | Ornithine aminotransferase | - | 1081,21 | 0,00 | 28,56 | ** | - | Amino acid metabolism |

| | | | | | | | | |
|--------|------------------------------------------------------------|---------|---------|------|--------|----------|-------------|-----------------------|
| C1G3U9 | Homocitrate synthase_mitochondrial | - | 779,15 | 0,00 | 55,33 | ** | - | Amino acid metabolism |
| C1G3V5 | Aspartate aminotransferase | - | 970,91 | 0,00 | 17,57 | ** | - | Amino acid metabolism |
| C1G4M0 | Adenosylhomocysteinase | - | 535,52 | 0,00 | 16,86 | ** | - | Amino acid metabolism |
| C1GC48 | Branched-chain-amino-acid aminotransferase | - | 4086,00 | 0,00 | 180,94 | ** | Secretome P | Amino acid metabolism |
| C1GCG7 | N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase | - | 1449,19 | 0,00 | 72,72 | ** | - | Amino acid metabolism |
| C1GE06 | Serine 3-dehydrogenase | - | 1776,88 | 0,00 | 27,56 | ** | - | Amino acid metabolism |
| C1GGZ6 | Homoaconitase_mitochondrial | - | 694,12 | 0,00 | 13,86 | ** | Secretome P | Amino acid metabolism |
| C1GLR3 | Acetolactate synthase_small subunit | - | 1842,71 | 0,00 | 23,73 | ** | Secretome P | Amino acid metabolism |
| C1GM15 | O-acetylhomoserine (Thiol)-lyase | - | 940,81 | 0,00 | 5,65 | ** | Secretome P | Amino acid metabolism |
| C1GMX2 | Histidinol-phosphatase (PHP family) | - | 555,59 | 0,00 | 0,17 | ** | - | Amino acid metabolism |
| C1GN18 | ATP phosphoribosyltransferase | - | 847,16 | 0,00 | 1,35 | ** | - | Amino acid metabolism |
| C1G5I8 | Carbamoyl-phosphate synthase arginine-specific large chain | 1013,92 | 1513,59 | 6,12 | 35,21 | p < 0,05 | - | Amino acid metabolism |
| C1GHZ0 | 3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase_mitochondrial | 1172,57 | 1539,50 | 6,23 | 46,14 | p < 0,05 | - | Amino acid metabolism |
| C1G025 | Aromatic-L-amino-acid decarboxylase | 688,67 | 2050,68 | 1,71 | 24,02 | p > 0,05 | - | Amino acid metabolism |

| | | | | | | | | |
|--------|-------------------------------------------------------|---------|---------|-------|-------|----------|-------------|----------------------------------------|
| C1G3P8 | Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase (Acylating) | 1457,36 | 857,47 | 9,53 | 17,34 | p > 0,05 | - | Amino acid metabolism |
| C1G4R2 | S-adenosylmethionine synthase | 1432,64 | 1777,13 | 23,14 | 22,00 | p > 0,05 | - | Amino acid metabolism |
| C1G596 | 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase | 1357,63 | 844,18 | 4,74 | 4,14 | p > 0,05 | Secretome P | Amino acid metabolism |
| C1G8P1 | 2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit beta | 750,68 | 490,24 | 2,44 | 7,34 | p > 0,05 | - | Amino acid metabolism |
| C1G989 | NAD-specific glutamate dehydrogenase | 557,74 | 746,12 | 29,12 | 50,78 | p > 0,05 | - | Amino acid metabolism |
| C1GCX5 | Serine hydroxymethyltransferase | 1281,50 | 872,93 | 12,75 | 5,59 | p > 0,05 | - | Amino acid metabolism |
| C1GGJ2 | Ketol-acid reductoisomerase_ mitochondrial | 802,95 | 710,79 | 22,10 | 24,42 | p > 0,05 | Secretome P | Amino acid metabolism |
| C1GJD0 | Methylcrotonoyl-CoA carboxylase subunit alpha | 1212,00 | 1208,17 | 6,37 | 43,57 | p > 0,05 | - | Amino acid metabolism |
| C1GJD3 | Isovaleryl-CoA dehydrogenase | 1353,29 | 1331,34 | 14,53 | 27,62 | p > 0,05 | - | Amino acid metabolism |
| C1GJD4 | Methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain | 566,08 | 1354,21 | 2,30 | 6,17 | p > 0,05 | - | Amino acid metabolism |
| C1G109 | Dolichol-phosphate mannosyltransferase | 388,56 | - | 1,90 | 0,00 | * | - | C-compound and carbohydrate metabolism |
| C1G356 | Mannitol-1-phosphate 5-dehydrogenase | 1187,33 | - | 1,88 | 0,00 | * | - | C-compound and carbohydrate metabolism |
| C1FYN6 | UDP-galactopyranose mutase | - | 635,46 | 0,00 | 5,23 | ** | Secretome P | C-compound and carbohydrate metabolism |
| C1G3H0 | Short chain dehydrogenase/reductase family | - | 735,78 | 0,00 | 19,12 | ** | - | C-compound and carbohydrate metabolism |

| | | | | | | | | |
|--------|----------------------------------------------------------------------------|---------|---------|------|--------|----------|-------------|---------------------------------------------|
| C1G5L7 | Dolichyl-phosphate-mannose-protein mannosyltransferase | - | 702,44 | 0,00 | 18,80 | ** | - | C-compound and carbohydrate metabolism |
| C1G6B4 | dTDP-4-dehydrorhamnose reductase | - | 1205,43 | 0,00 | 8,31 | ** | - | C-compound and carbohydrate metabolism |
| C1G9P8 | Glutamine-fructose-6-phosphate transaminase (Isomerizing) | - | 2831,29 | 0,00 | 181,41 | ** | - | C-compound and carbohydrate metabolism |
| C1GJD9 | Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase subunit WBP1 | - | 1053,05 | 0,00 | 15,57 | ** | Signal P | C-compound and carbohydrate metabolism |
| C1GLD7 | Dolichyl-phosphate-mannose-protein mannosyltransferase | - | 771,43 | 0,00 | 9,17 | ** | - | C-compound and carbohydrate metabolism |
| C1GMI8 | Mannose-1-phosphate guanyltransferase subunit beta-A | - | 1317,53 | 0,00 | 84,28 | ** | - | C-compound and carbohydrate metabolism |
| C1GJJ9 | Sorbitol utilization protein SOU2 | 2206,67 | 3232,00 | 4,88 | 61,60 | p < 0,05 | Secretome P | C-compound and carbohydrate metabolism |
| C1G014 | Sterol 24-C-methyltransferase | - | 2660,99 | 0,00 | 121,40 | ** | - | Lipid, fatty acid and isoprenoid metabolism |
| C1G064 | Fatty acid synthase subunit alpha | - | 661,42 | 0,00 | 53,56 | ** | Secretome P | Lipid, fatty acid and isoprenoid metabolism |
| C1G065 | Fatty acid synthase subunit beta dehydratase | - | 1540,14 | 0,00 | 119,60 | ** | - | Lipid, fatty acid and isoprenoid metabolism |
| C1G1E5 | 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase | - | 802,05 | 0,00 | 3,48 | ** | Secretome P | Lipid, fatty acid and isoprenoid metabolism |
| C1G6E6 | Acetyl-CoA acetyltransferase | - | 2411,62 | 0,00 | 35,24 | ** | Secretome P | Lipid, fatty acid and isoprenoid metabolism |
| C1GMW7 | cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase | - | 819,49 | 0,00 | 19,74 | ** | - | Lipid, fatty acid and isoprenoid metabolism |
| C1G3Y3 | Enoyl reductase | 1965,31 | 5276,92 | 7,92 | 62,05 | p < 0,05 | - | Lipid, fatty acid and isoprenoid metabolism |

| | | | | | | | | |
|--------|------------------------------------------------------------------------------|---------|---------|-------|--------|----------|-------------|---------------------------------------------|
| C1GAT1 | Fatty-acid amide hydrolase | 1470,33 | 1134,71 | 7,72 | 19,35 | p > 0,05 | Secretome P | Lipid, fatty acid and isoprenoid metabolism |
| C1GLQ8 | Ornithine carbamoyltransferase, mitochondrial | 754,80 | - | 0,11 | 0,00 | * | Secretome P | Nitrogen, sulfur and selenium metabolism |
| C1G280 | Adenosine kinase | 623,57 | - | 0,55 | 0,00 | * | - | Nucleotide/nucleoside/nucleobase metabolism |
| C1G532 | Nitroreductase family protein | - | 1237,79 | 0,00 | 27,66 | ** | - | Nitrogen, sulfur and selenium metabolism |
| C1GIC4 | Urease accessory protein UreG | - | 2092,33 | 0,00 | 39,60 | ** | - | Nitrogen, sulfur and selenium metabolism |
| C1G0Q6 | Oxidoreductase 2-nitropropane dioxygenase family | 2298,75 | 2794,79 | 22,69 | 118,75 | p < 0,05 | - | Nitrogen, sulfur and selenium metabolism |
| C1FYL2 | Argininosuccinate synthase | 1047,78 | 622,82 | 12,06 | 7,91 | p > 0,05 | - | Nitrogen, sulfur and selenium metabolism |
| C1GKJ6 | Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase | 1008,11 | - | 4,12 | 0,00 | * | Secretome P | Nucleotide/nucleoside/nucleobase metabolism |
| C1GF55 | Inosine triphosphate pyrophosphatase | 477,94 | - | 0,21 | 0,00 | * | - | Nucleotide/nucleoside/nucleobase metabolism |
| C1GEF7 | Ribonucleoside-diphosphate reductase small chain | - | 423,95 | 0,00 | 1,51 | ** | - | Nucleotide/nucleoside/nucleobase metabolism |
| C1GKJ4 | Phosphoribosylglycinamide formyltransferase | - | 1047,07 | 0,00 | 11,49 | ** | - | Nucleotide/nucleoside/nucleobase metabolism |
| C1GA13 | Phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase/IMP cyclohydrolase | 634,62 | 1186,91 | 6,75 | 42,63 | p < 0,05 | - | Nucleotide/nucleoside/nucleobase metabolism |
| C1GDI5 | Mitochondrial nuclease | 1433,49 | 4856,07 | 9,14 | 62,56 | p < 0,05 | Secretome P | Nucleotide/nucleoside/nucleobase metabolism |
| C1GB27 | Adenylosuccinate lyase | 694,05 | 733,01 | 3,13 | 4,11 | p > 0,05 | - | Nucleotide/nucleoside/nucleobase metabolism |

| | | | | | | | | |
|--------|---------------------------------------------------------|--------|--------|-------|------|----------|---|------------------------------------------------------------|
| C1GJT8 | Nucleoside diphosphate kinase | 899,24 | - | 11,84 | 0,00 | * | - | Nucleotide/nucleoside/nucleobase metabolism |
| C1GDE5 | Propionate-CoA ligase | 668,70 | 470,55 | 5,17 | 3,94 | p > 0,05 | - | Propanoate metabolism |
| C1GFB1 | Nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase [carboxylating] | - | 844,45 | 0,00 | 7,54 | ** | - | Biosynthesis of vitamins, cofactors, and prosthetic groups |

ENERGY

| | | | | | | | | |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------|---------|----------|--------|--------|----------|-------------|--------------------------------|
| C1G7G3 | Glucose-6-phosphate 1-epimerase | 336,51 | 2459,58 | 2,05 | 75,09 | p < 0,05 | Secretome P | Glycolysis and gluconeogenesis |
| C1G002 | ATP-dependent 6-phosphofructokinase | - | 1090,94 | 0,00 | 27,17 | ** | - | Glycolysis and gluconeogenesis |
| C1G2W2 | Pyruvate kinase | - | 4453,89 | 0,00 | 37,82 | ** | - | Glycolysis and gluconeogenesis |
| C1G1C8 | Fructose-bisphosphate aldolase 1 | 1219,60 | 1913,59 | 4,56 | 64,08 | p < 0,05 | Secretome P | Glycolysis and gluconeogenesis |
| C1G4N0 | Phosphoglycerate kinase | 1729,55 | 3591,87 | 7,72 | 182,41 | p < 0,05 | Secretome P | Glycolysis and gluconeogenesis |
| C1G5F6 | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | 2147,59 | 4713,36 | 122,29 | 405,11 | p < 0,05 | Secretome P | Glycolysis and gluconeogenesis |
| C1G9X3 | Enolase | 7639,80 | 12884,54 | 101,84 | 333,45 | p < 0,05 | Secretome P | Glycolysis and gluconeogenesis |
| C1GI20 | Triosephosphate isomerase | 1912,40 | 1792,28 | 22,92 | 32,27 | p > 0,05 | - | Glycolysis and gluconeogenesis |
| A0A0A0HTQ5 | Pyruvate dehydrogenase kinase | 447,08 | - | 1,91 | 0,00 | * | - | Tricarboxylic acid cycle |
| C1G4D1 | Dihydrolipoamide acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex | 748,91 | 1113,51 | 11,01 | 32,92 | p > 0,05 | Secretome P | Tricarboxylic acid cycle |

| | | | | | | | | |
|--------|-------------------------------------------------------------------------|---------|---------|-------|--------|----------|-------------|--------------------------|
| C1GF68 | Dihydrolipoamide succinyltransferase | 657,64 | - | 0,98 | 0,00 | * | Secretome P | Tricarboxylic acid cycle |
| C1GGQ7 | Dihydrolipoyl dehydrogenase | 879,67 | - | 1,95 | 0,00 | * | - | Tricarboxylic acid cycle |
| C1G294 | Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha_mitochondrial | - | 2265,68 | 0,00 | 88,85 | ** | - | Tricarboxylic acid cycle |
| C1GAG3 | Isocitrate dehydrogenase [NADP] | - | 679,06 | 0,00 | 7,87 | ** | Secretome P | Tricarboxylic acid cycle |
| C1GL06 | Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit_mitochondrial | - | 1276,82 | 0,00 | 8,54 | ** | Secretome P | Tricarboxylic acid cycle |
| C1GLZ6 | Citrate synthase | - | 1689,82 | 0,00 | 113,99 | ** | - | Tricarboxylic acid cycle |
| C1G056 | Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta | 3966,63 | 6230,72 | 8,83 | 93,51 | p < 0,05 | - | Tricarboxylic acid cycle |
| C1G0C7 | Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit beta_mitochondrial | 885,84 | 1632,96 | 7,25 | 152,99 | p < 0,05 | - | Tricarboxylic acid cycle |
| C1G6K0 | Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit_mitochondrial | 1494,75 | 5082,85 | 26,37 | 180,91 | p < 0,05 | - | Tricarboxylic acid cycle |
| C1G9P1 | Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit_mitochondrial | 1331,63 | 1641,30 | 5,53 | 150,59 | p < 0,05 | - | Tricarboxylic acid cycle |
| C1GIX4 | Malate dehydrogenase mitochondrial | 5351,09 | 3244,77 | 81,09 | 147,20 | p < 0,05 | Secretome P | Tricarboxylic acid cycle |
| C1GIX7 | Acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex | 1420,50 | 2587,64 | 48,01 | 68,56 | p < 0,05 | - | Tricarboxylic acid cycle |
| C1FZL2 | Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit_mitochondrial | 553,64 | 441,57 | 7,25 | 6,57 | p > 0,05 | - | Tricarboxylic acid cycle |
| C1G411 | Acetyl-coenzyme A synthetase | 1002,19 | 733,55 | 14,18 | 3,10 | p > 0,05 | - | Tricarboxylic acid cycle |

| | | | | | | | | |
|------------|--------------------------------------------------------------------------|---------|---------|-------|-------|----------|-------------|----------------------------------------------------------------|
| C1G547 | Pyruvate dehydrogenase (Acetyl-transferring) E1 component_ alpha subunit | 852,03 | 700,40 | 7,96 | 23,82 | p > 0,05 | - | Tricarboxylic acid cycle |
| C1G5Y7 | Fumarate reductase | 774,57 | 1013,57 | 15,43 | 21,85 | p > 0,05 | Secretome P | Tricarboxylic acid cycle |
| C1GCI8 | Citrate synthase | 734,75 | 704,31 | 5,45 | 2,67 | p > 0,05 | Secretome P | Tricarboxylic acid cycle |
| C1GLB8 | Malate dehydrogenase NAD dependent cytoplasmic | 518,45 | 1926,49 | 2,06 | 4,27 | p > 0,05 | Secretome P | Tricarboxylic acid cycle |
| A0A0A0HST0 | ATP synthase subunit g | 1391,88 | - | 51,20 | 0,00 | * | - | Electron transport and membrane-associated energy conservation |
| C1G256 | NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit | 583,33 | - | 0,88 | 0,00 | * | Secretome P | Electron transport and membrane-associated energy conservation |
| C1GBX9 | Cytochrome b-c1 complex subunit 7 | 916,24 | - | 1,93 | 0,00 | * | - | Electron transport and membrane-associated energy conservation |
| C1GIA9 | Cytochrome c oxidase subunit VIb | 2134,46 | - | 33,27 | 0,00 | * | Secretome P | Electron transport and membrane-associated energy conservation |
| C1GKK3 | ATP synthase subunit delta_ mitochondrial | 667,55 | - | 16,94 | 0,00 | * | - | Electron transport and membrane-associated energy conservation |
| C1GLQ1 | Cytochrome c oxidase subunit VIIc | 2028,77 | - | 6,18 | 0,00 | * | Secretome P | Electron transport and membrane-associated energy conservation |
| C1GLY2 | F-type H ⁺ -transporting ATPase subunit epsilon | 914,34 | - | 5,37 | 0,00 | * | Secretome P | Electron transport and membrane-associated energy conservation |
| A0A0A0HRM2 | V-type proton ATPase catalytic subunit A | - | 698,07 | 0,00 | 6,91 | ** | Secretome P | Electron transport and membrane-associated energy conservation |
| A0A0A0HTA9 | Cytochrome c1_ heme protein_ mitochondrial | - | 2287,21 | 0,00 | 94,09 | ** | - | Electron transport and membrane-associated energy conservation |
| A0A0A0HWQ9 | NADH-ubiquinone oxidoreductase 78 kDa subunit_ mitochondrial | - | 405,22 | 0,00 | 9,04 | ** | - | Electron transport and membrane-associated energy conservation |

| | | | | | | | | |
|--------|---------------------------------------------------------------|---------|----------|--------|--------|----------|-------------|----------------------------------------------------------------|
| C1G350 | NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex 5 | - | 608,63 | 0,00 | 6,93 | ** | - | Electron transport and membrane-associated energy conservation |
| C1G6V7 | V-type proton ATPase subunit C | - | 817,66 | 0,00 | 5,44 | ** | - | Electron transport and membrane-associated energy conservation |
| C1G8D0 | NADH-ubiquinone oxidoreductase 30.4 kDa subunit_mitochondrial | - | 2106,73 | 0,00 | 35,57 | ** | Secretome P | Electron transport and membrane-associated energy conservation |
| C1G9D6 | NADH-cytochrome b5 reductase | - | 2770,10 | 0,00 | 93,97 | ** | Secretome P | Electron transport and membrane-associated energy conservation |
| C1GDK7 | NADH-ubiquinone oxidoreductase 21.3 kDa subunit | - | 1095,31 | 0,00 | 14,44 | ** | Secretome P | Electron transport and membrane-associated energy conservation |
| C1GEA0 | V-type proton ATPase subunit D | - | 2533,67 | 0,00 | 11,83 | ** | - | Electron transport and membrane-associated energy conservation |
| C1GHV7 | V-type proton ATPase subunit | - | 549,32 | 0,00 | 4,08 | ** | - | Electron transport and membrane-associated energy conservation |
| C1GI70 | V-type proton ATPase subunit B | - | 667,29 | 0,00 | 34,46 | ** | - | Electron transport and membrane-associated energy conservation |
| C1GKV7 | Vacuolar ATP synthase subunit E | - | 2355,69 | 0,00 | 43,07 | ** | - | Electron transport and membrane-associated energy conservation |
| C1G0S6 | Mitochondrial genome maintenance protein mgm101 | 726,13 | 2135,93 | 7,66 | 55,77 | p < 0,05 | Secretome P | Electron transport and membrane-associated energy conservation |
| C1G5V6 | ATP synthase subunit alpha | 3309,56 | 6435,53 | 162,59 | 423,11 | p < 0,05 | - | Electron transport and membrane-associated energy conservation |
| C1G5X3 | ATP synthase subunit 4_mitochondrial | 5853,58 | 15026,00 | 95,36 | 293,18 | p < 0,05 | - | Electron transport and membrane-associated energy conservation |
| C1GCK7 | ATP synthase subunit d_mitochondrial | 2359,61 | 6049,36 | 77,46 | 244,71 | p < 0,05 | - | Electron transport and membrane-associated energy conservation |
| C1GER4 | Putative cytochrome c oxidase subunit VIa | 1797,27 | 5206,08 | 3,69 | 75,02 | p < 0,05 | - | Electron transport and membrane-associated energy conservation |

| | | | | | | | | |
|------------|-------------------------------------------------------|---------|----------|--------|--------|----------|-------------|----------------------------------------------------------------|
| C1GKG3 | NAD(P)H:quinone oxidoreductase_ type IV | 4366,42 | 20145,70 | 11,22 | 107,13 | p < 0,05 | Secretome P | Electron transport and membrane-associated energy conservation |
| C1GLV8 | ATP synthase subunit beta | 7888,71 | 3019,62 | 100,80 | 162,27 | p < 0,05 | - | Electron transport and membrane-associated energy conservation |
| C1GM00 | Plasma membrane ATPase | 2672,15 | 3666,62 | 66,40 | 198,06 | p < 0,05 | - | Electron transport and membrane-associated energy conservation |
| C1GM03 | Cytochrome b-c1 complex subunit 2 | 939,54 | 1415,62 | 36,48 | 153,60 | p < 0,05 | Secretome P | Electron transport and membrane-associated energy conservation |
| C1GAW1 | Cytochrome c oxidase subunit 4_ mitochondrial | 1240,69 | 624,60 | 17,36 | 27,81 | p > 0,05 | - | Electron transport and membrane-associated energy conservation |
| C1G1E8 | F-type H ⁺ -transporting ATPase subunit H | 1249,20 | 1155,38 | 3,39 | 2,15 | p > 0,05 | Secretome P | Electron transport and membrane-associated energy conservation |
| C1GDR6 | Mitochondrial F1F0 ATP synthase subunit | 3573,21 | 2611,29 | 20,03 | 129,56 | p > 0,05 | - | Electron transport and membrane-associated energy conservation |
| C1GDV0 | Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske_ mitochondrial | 1510,95 | 1951,77 | 24,30 | 66,53 | p > 0,05 | Secretome P | Electron transport and membrane-associated energy conservation |
| C1GGS8 | Suaprgal | 4588,68 | 2776,33 | 69,19 | 72,67 | p > 0,05 | - | Electron transport and membrane-associated energy conservation |
| C1GKM7 | ATP synthase subunit gamma | 1703,59 | 1045,46 | 4,79 | 34,08 | p > 0,05 | - | Electron transport and membrane-associated energy conservation |
| Q1XA91 | Cytochrome c oxidase subunit 2 | 925,63 | 1213,63 | 18,55 | 61,24 | p > 0,05 | - | Electron transport and membrane-associated energy conservation |
| C1GBT0 | Aldehyde dehydrogenase | 1706,60 | - | 75,01 | 0,00 | * | - | Alcohol metabolism |
| A0A0A0HTP6 | Alcohol dehydrogenase 1 | 7429,97 | 775,56 | 8,12 | 21,57 | p > 0,05 | Secretome P | Alcohol metabolism |
| C1G1H4 | Pyruvate decarboxylase | 934,87 | 2091,99 | 20,21 | 129,11 | p < 0,05 | - | Alcohol metabolism |

| | | | | | | | | |
|--------------------------------------|-----------------------------------------------|---------|---------|-------|-------|----------|-------------|-------------------------------|
| C1G8L6 | Acyl-CoA dehydrogenase family protein | 1052,48 | - | 6,27 | 0,00 | * | - | Fatty acid β -oxidation |
| C1GHR9 | Acyl-CoA dehydrogenase | - | 1136,49 | 0,00 | 34,02 | ** | - | Fatty acid β -oxidation |
| C1G421 | 3-ketoacyl-CoA thiolase | 2676,91 | 3554,01 | 60,78 | 98,57 | p < 0,05 | Secretome P | Fatty acid β -oxidation |
| C1GMZ1 | Peroxisomal hydratase-dehydrogenase-epimerase | 1629,70 | 2036,41 | 76,28 | 81,30 | p > 0,05 | Secretome P | Fatty acid β -oxidation |
| C1GCJ6 | 2-methylcitrate dehydratase | 3334,62 | 1392,13 | 53,48 | 36,05 | p > 0,05 | Secretome P | Methylcytrate cycle |
| A0A0A0HYM8 | Ribose-phosphate pyrophosphokinase 3 | - | 831,76 | 0,00 | 13,17 | ** | - | Pentose phosphate pathway |
| C1GC82 | Transketolase | - | 640,98 | 0,00 | 1,73 | ** | Secretome P | Pentose phosphate pathway |
| C1GCH7 | Transketolase | - | 1080,88 | 0,00 | 12,84 | ** | - | Pentose phosphate pathway |
| C1GJI4 | Transaldolase | 1184,98 | 1030,11 | 5,92 | 39,75 | p > 0,05 | - | Pentose phosphate pathway |
| CELL CYCLE AND DNA PROCESSING | | | | | | | | |
| C1G1B6 | Non-histone chromosomal protein 6 | 3227,23 | - | 3,93 | 0,00 | * | Secretome P | |
| C1G2J3 | Septin 4 | 1000,11 | - | 4,51 | 0,00 | * | - | |
| C1GD06 | DASH complex subunit SPC19 | 799,24 | - | 1,20 | 0,00 | * | - | |
| C1GII4 | Cell division control protein | 873,00 | - | 4,85 | 0,00 | * | - | Cell division control protein |

| | | | | | | | |
|------------|----------------------------------------------------|---------|---------|-------|--------|----------|-------------|
| C1GIS0 | Histone acetyltransferase type B catalytic subunit | 997,25 | - | 0,75 | 0,00 | * | - |
| C1GJ83 | Sporulation-regulated protein | 1285,59 | - | 20,35 | 0,00 | * | - |
| A0A0A0HUI8 | Histone H2A.Z | - | 1280,35 | 0,00 | 15,55 | ** | - |
| C1G162 | HNRNP arginine N-methyltransferase | - | 650,73 | 0,00 | 8,93 | ** | - |
| C1G9A4 | Uracil-DNA glycosylase | - | 534,70 | 0,00 | 1,03 | ** | Secretome P |
| C1GEM8 | Cell division control protein | - | 621,56 | 0,00 | 4,79 | ** | - |
| C1GET9 | DNA helicase | - | 769,00 | 0,00 | 3,99 | ** | - |
| C1GF57 | Nucleosome assembly protein | - | 893,36 | 0,00 | 27,98 | ** | Secretome P |
| C1GF70 | Histone H2A | - | 2640,99 | 0,00 | 93,59 | ** | Secretome P |
| C1GMJ7 | Heterochromatin protein HP1 | - | 608,94 | 0,00 | 4,04 | ** | Secretome P |
| C1GMR4 | DNA replication licensing factor MCM7 | - | 687,67 | 0,00 | 5,58 | ** | - |
| C1FYJ6 | Histone H4 | 2559,67 | 4576,37 | 38,26 | 89,05 | p < 0,05 | - |
| C1G9X0 | 14-3-3 family protein epsilon | 4077,93 | 7769,35 | 25,38 | 152,77 | p < 0,05 | Secretome P |
| C1GB04 | 14-3-3-like protein 2 | 3823,49 | 9327,60 | 44,42 | 156,02 | p < 0,05 | - |

| | | | | | | | | |
|--------|----------------------------------|---------|---------|-------|-------|----------|-------------|--|
| C1GEJ7 | Cell division control protein 48 | 2152,12 | 2957,55 | 17,90 | 77,64 | p < 0,05 | - | |
| C1FYJ7 | Histone H3 | 3276,76 | 2481,96 | 64,55 | 57,12 | p > 0,05 | Secretome P | |
| C1GIH8 | Histone chaperone | 735,34 | 1994,92 | 3,27 | 26,96 | p > 0,05 | Secretome P | |
| C1GF71 | Histone H2B | 636,71 | 1275,13 | 2,86 | 2,40 | p > 0,05 | Secretome P | |
| C1GIP8 | Histone H4 | 2259,65 | 3361,45 | 1,57 | 13,41 | p > 0,05 | - | |

TRANSCRIPTION

| | | | | | | | | |
|--------|-------------------------------------------|---------|---------|------|-------|----|-------------|-----------------------------------------|
| C1G0Q9 | U1 snRNP-associated protein Usp107 | 418,69 | - | 2,55 | 0,00 | * | - | regulation of alternative mRNA splicing |
| C1GDR9 | DNA-directed RNA polymerase subunit | 822,23 | - | 0,22 | 0,00 | * | - | |
| C1GGV6 | Pumilio-family RNA binding repeat protein | 874,69 | - | 1,47 | 0,00 | * | Secretome P | mRNA stability |
| C1GHN2 | rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillarin | 698,32 | - | 1,46 | 0,00 | * | - | RNA processing |
| C1GHX0 | Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2 | 1014,79 | - | 2,42 | 0,00 | * | - | RNA processing |
| C1GKF9 | mRNA 3'-end-processing protein yth1 | 1572,18 | - | 0,34 | 0,00 | * | - | RNA processing |
| C1FYF8 | ATP-dependent RNA helicase mss116 | - | 751,86 | 0,00 | 24,11 | ** | Secretome P | mRNA synthesis |
| C1G247 | Transcription elongation factor SPT4 | - | 1580,42 | 0,00 | 22,16 | ** | - | |

| | | | | | | | | |
|------------|----------------------------------------------------|---------|----------|-------|--------|----------|-------------|--------------------------|
| C1G561 | G4 quadruplex nucleic acid binding protein | - | 640,74 | 0,00 | 13,34 | ** | Secretome P | RNA processing |
| C1G7J2 | pre-mRNA-processing factor 39 | - | 1016,96 | 0,00 | 15,29 | ** | - | Spliceosome |
| C1G7X8 | ATP-dependent RNA helicase DBP5 | - | 760,44 | 0,00 | 36,91 | ** | - | RNA synthesis |
| C1GA10 | ATP-dependent RNA helicase DED1 | - | 1269,92 | 0,00 | 36,01 | ** | Secretome P | RNA synthesis |
| C1GAM1 | mRNA binding post-transcriptional regulator (Csx1) | - | 1398,89 | 0,00 | 81,51 | ** | Secretome P | RNA processing |
| C1GBH7 | tetratricopeptide repeat protein 1 | - | 1006,03 | 0,00 | 4,33 | ** | - | |
| C1GEV1 | ATP-dependent RNA helicase FAL1 | - | 1509,49 | 0,00 | 38,97 | ** | - | RNA synthesis |
| C1GF64 | Transcription elongation factor 1 homolog | - | 1489,44 | 0,00 | 2,30 | ** | Secretome P | RNA synthesis |
| C1GHJ8 | U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm7 | - | 790,77 | 0,00 | 2,66 | ** | Secretome P | RNA degradation |
| C1GHQ4 | C2H2 transcription factor | - | 620,30 | 0,00 | 0,24 | ** | Secretome P | |
| C1GM32 | RuvB-like helicase | - | 891,57 | 0,00 | 39,03 | ** | - | RNA synthesis |
| A0A0A0HTY8 | Nucleolar protein 58 | 1173,06 | 2502,57 | 6,31 | 28,04 | p < 0,05 | Secretome P | RNA synthesis |
| A0A0A0HV09 | ATP-dependent RNA helicase eIF4A | 5368,99 | 11699,00 | 50,11 | 233,30 | p < 0,05 | - | RNA synthesis |
| C1G3L4 | Guanine nucleotide-binding protein subunit beta | 1771,04 | 3122,61 | 65,49 | 117,15 | p < 0,05 | Secretome P | Messenger RNA biogenesis |

| | | | | | | | | |
|--------------------------|-------------------------------------------|---------|---------|-------|--------|----------|-------------|--------------------|
| C1GCF0 | ATP-dependent RNA helicase SUB2 | 352,01 | 2463,44 | 1,66 | 150,40 | p < 0,05 | - | RNA synthesis |
| C1G3Y0 | RuvB-like helicase | 503,49 | 1376,47 | 1,62 | 39,30 | p > 0,05 | - | RNA synthesis |
| C1GDK4 | pre-mrna splicing factor | 1213,46 | 1252,54 | 3,22 | 20,93 | p > 0,05 | Secretome P | RNA processing |
| C1GL98 | Polyadenylate-binding protein | 401,97 | 784,44 | 10,95 | 15,55 | p > 0,05 | Secretome P | RNA processing |
| PROTEIN SYNTHESIS | | | | | | | | |
| A0A0A0HUI5 | 60S ribosomal protein L3 | 567,76 | - | 8,89 | 0,00 | * | Secretome P | Ribosomal proteins |
| A0A0A0HWY2 | 60S ribosomal protein L9 | 935,73 | - | 13,83 | 0,00 | * | - | Ribosomal proteins |
| C1GAM9 | 40S ribosomal protein S24 | 700,65 | - | 2,07 | 0,00 | * | Secretome P | Ribosomal proteins |
| C1GAW6 | 60S ribosomal protein L34-A | 1094,35 | - | 3,05 | 0,00 | * | Secretome P | Ribosomal proteins |
| C1GCK9 | 60S ribosomal protein L14 | 450,06 | - | 1,10 | 0,00 | * | - | Ribosomal proteins |
| C1GFA3 | 60S ribosomal protein L27a | 1233,67 | - | 5,74 | 0,00 | * | Secretome P | Ribosomal proteins |
| C1G187 | Mitochondrial large ribosomal subunit L49 | - | 400,08 | 0,00 | 6,08 | ** | Secretome P | Ribosomal proteins |
| C1G540 | Ribosomal protein L7/L12 | - | 1110,55 | 0,00 | 2,07 | ** | Secretome P | Ribosomal proteins |
| C1GA20 | 60S ribosomal protein L11 | - | 3051,39 | 0,00 | 176,39 | ** | - | Ribosomal proteins |

| | | | | | | | | |
|--------|--------------------------------------|----------|----------|-------|--------|----------|-------------|--------------------|
| C1GB61 | 50S ribosomal protein Mrp49 | - | 2087,26 | 0,00 | 19,33 | ** | - | Ribosomal proteins |
| C1GFL2 | 40S ribosomal protein S27 | 1519,51 | 2063,19 | 35,51 | 135,36 | ** | Secretome P | Ribosomal proteins |
| C1GLA5 | Ubiquitin-60S ribosomal protein L40 | 1665,51 | 1538,53 | 0,00 | 21,09 | ** | Secretome P | Ribosomal proteins |
| C1GLK3 | 60S acidic ribosomal protein P1 | - | 1268,41 | 0,00 | 14,01 | ** | Secretome P | Ribosomal proteins |
| C1FYW9 | Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a | 1689,94 | 1691,32 | 13,91 | 106,64 | p < 0,05 | Secretome P | Ribosomal proteins |
| C1G172 | 60S ribosomal protein L27 | 2220,82 | 3421,48 | 13,13 | 102,65 | p < 0,05 | Secretome P | Ribosomal proteins |
| C1G1P4 | 40S ribosomal protein S0 | 5948,17 | 7153,80 | 63,35 | 174,04 | p < 0,05 | | Ribosomal proteins |
| C1G2V1 | 40S ribosomal protein S11 | 2541,94 | 2303,75 | 28,55 | 96,96 | p < 0,05 | Secretome P | Ribosomal proteins |
| C1G3B1 | 40S ribosomal protein S12 | 2949,59 | 4229,34 | 4,43 | 69,94 | p < 0,05 | - | Ribosomal proteins |
| C1G3Y8 | 40S ribosomal protein S6 | 1288,23 | 4943,58 | 17,07 | 105,86 | p < 0,05 | Secretome P | Ribosomal proteins |
| C1G5J0 | 40S ribosomal protein S15 | 18792,40 | 13947,32 | 49,00 | 194,58 | p < 0,05 | - | Ribosomal proteins |
| C1G810 | 40S ribosomal protein S4 | 1025,31 | 2795,15 | 15,00 | 129,67 | p < 0,05 | - | Ribosomal proteins |
| C1G820 | 60S ribosomal protein L21 | 1503,76 | 3838,25 | 9,13 | 71,31 | p < 0,05 | Secretome P | Ribosomal proteins |
| C1G821 | 40S ribosomal protein S9 | 2910,34 | 3012,70 | 48,49 | 151,66 | p < 0,05 | - | Ribosomal proteins |

| | | | | | | | | |
|------------|---------------------------------|----------|----------|-------|--------|----------|-------------|--------------------|
| C1G945 | 60S ribosomal protein L30 | 1475,32 | 3554,62 | 4,72 | 42,56 | p < 0,05 | Secretome P | Ribosomal proteins |
| C1G9C0 | Ribosomal protein L15 | 5536,33 | 4454,45 | 28,14 | 119,09 | p < 0,05 | Secretome P | Ribosomal proteins |
| C1G9D7 | 60S ribosomal protein L20 | 1472,35 | 3525,75 | 32,76 | 125,58 | p < 0,05 | - | Ribosomal proteins |
| C1G9U4 | 60S acidic ribosomal protein P0 | 1803,50 | 2216,81 | 47,19 | 116,70 | p < 0,05 | - | Ribosomal proteins |
| C1GDK2 | 60S ribosomal protein L18-B | 5146,14 | 9346,45 | 60,38 | 206,80 | p < 0,05 | Secretome P | Ribosomal proteins |
| C1GEN5 | 60S ribosomal protein L4 | 1126,39 | 2484,67 | 62,31 | 195,85 | p < 0,05 | Secretome P | Ribosomal proteins |
| C1GF47 | 60S ribosomal protein L25 | 3950,93 | 5845,63 | 20,64 | 92,58 | p < 0,05 | Secretome P | Ribosomal proteins |
| C1GHV2 | 40S ribosomal protein S5 | 11051,49 | 9065,94 | 49,47 | 115,50 | p < 0,05 | - | Ribosomal proteins |
| C1GKL7 | 60S ribosomal protein L12 | 2453,69 | 3791,27 | 52,07 | 133,99 | p < 0,05 | - | Ribosomal proteins |
| C1GLJ7 | 40S ribosomal protein S26 | 5727,09 | 7587,71 | 13,03 | 111,95 | p < 0,05 | Secretome P | Ribosomal proteins |
| C1GMV8 | 40S ribosomal protein S2 | 2667,21 | 4015,64 | 52,62 | 133,77 | p < 0,05 | Secretome P | Ribosomal proteins |
| C1GN19 | 40S ribosomal protein S28 | 12030,90 | 11708,84 | 18,30 | 93,79 | p < 0,05 | - | Ribosomal proteins |
| C1GN78 | Ribosomal protein L28e | 1857,34 | 3849,73 | 13,02 | 63,52 | p < 0,05 | Secretome P | Ribosomal proteins |
| A0A0A0HQN9 | 40S ribosomal protein S19 | 1057,91 | 1771,77 | 19,48 | 6,15 | p > 0,05 | - | Ribosomal proteins |

| | | | | | | | | |
|------------|---------------------------------|---------|---------|-------|--------|----------|-------------|--------------------|
| A0A0A0HT80 | 60S ribosomal protein L13 | 845,29 | 822,65 | 2,35 | 29,34 | p > 0,05 | Secretome P | Ribosomal proteins |
| A0A0A0HVH2 | 60S ribosomal protein L31 | 383,06 | 1489,60 | 2,63 | 35,39 | p > 0,05 | Secretome P | Ribosomal proteins |
| A0A0A0HYV6 | 60S ribosomal protein L5 | 6218,09 | 4935,65 | 76,11 | 95,47 | p > 0,05 | - | Ribosomal proteins |
| C1FYR6 | 40S ribosomal protein S7 | 1965,20 | 5609,41 | 5,04 | 29,89 | p > 0,05 | - | Ribosomal proteins |
| C1G0E3 | 40S ribosomal protein S16 | 2147,59 | 1472,02 | 10,26 | 2,20 | p > 0,05 | Secretome P | Ribosomal proteins |
| C1G0E5 | 40S ribosomal protein S14 | 1125,11 | 1918,38 | 85,96 | 46,50 | p > 0,05 | Secretome P | Ribosomal proteins |
| C1G0G4 | 40S ribosomal protein S17 | 2011,78 | 4363,36 | 16,77 | 73,75 | p > 0,05 | - | Ribosomal proteins |
| C1G283 | 60S ribosomal protein L2 | 1312,96 | 1113,82 | 15,99 | 54,54 | p > 0,05 | Secretome P | Ribosomal proteins |
| C1G371 | 60S ribosomal protein L7 | 722,21 | 2282,11 | 14,34 | 36,84 | p > 0,05 | - | Ribosomal proteins |
| C1G391 | 40S ribosomal protein | 4462,60 | 3302,72 | 78,69 | 132,10 | p > 0,05 | - | Ribosomal proteins |
| C1G4P8 | 60S ribosomal protein L35 | 1533,09 | 1810,45 | 5,89 | 29,06 | p > 0,05 | Secretome P | Ribosomal proteins |
| C1G5J1 | 60S acidic ribosomal protein P2 | 2125,85 | 2882,36 | 12,94 | 3,61 | p > 0,05 | Signal P | Ribosomal proteins |
| C1G6M3 | 60S ribosomal protein L10a | 2795,33 | 2735,76 | 13,21 | 90,23 | p > 0,05 | - | Ribosomal proteins |
| C1G6T3 | 60S ribosomal protein L6 | 3201,68 | 1198,29 | 12,06 | 30,30 | p > 0,05 | Secretome P | Ribosomal proteins |

| | | | | | | | | |
|--------|------------------------------------------------------|---------|---------|-------|--------|----------|-------------|----------------------------|
| C1G942 | 60S ribosomal protein L10-A | 1447,62 | 1342,68 | 3,63 | 27,63 | p > 0,05 | - | Ribosomal proteins |
| C1GC66 | 60S ribosomal protein L22 | 4607,43 | 4273,11 | 5,57 | 6,09 | p > 0,05 | - | Ribosomal proteins |
| C1GG76 | 40S ribosomal protein S18 | 2528,65 | 1599,55 | 22,50 | 46,63 | p > 0,05 | Secretome P | Ribosomal proteins |
| C1GGR5 | 40S ribosomal protein S20 | 1550,52 | 1776,14 | 37,17 | 119,46 | p > 0,05 | - | Ribosomal proteins |
| C1GGT8 | 40S ribosomal protein S1 | 991,64 | 1084,67 | 7,43 | 36,85 | p > 0,05 | - | Ribosomal proteins |
| C1GHE4 | 40S ribosomal protein S22 | 8195,51 | 5378,79 | 98,86 | 71,86 | p > 0,05 | - | Ribosomal proteins |
| C1GHJ0 | 60S ribosomal protein L17 | 657,09 | 2523,93 | 0,58 | 34,09 | p > 0,05 | Secretome P | Ribosomal proteins |
| C1GK99 | 40S ribosomal protein | 1830,49 | 2960,75 | 12,58 | 32,04 | p > 0,05 | - | Ribosomal proteins |
| C1GDQ2 | Asparagine-tRNA ligase | - | 883,79 | 0,00 | 9,86 | ** | - | Aminoacyl-tRNA-synthetases |
| C1FZG2 | Alanine-tRNA ligase | 839,19 | 414,45 | 10,18 | 6,17 | p > 0,05 | - | Aminoacyl-tRNA-synthetases |
| C1GBG1 | Aspartate-tRNA(Asn) ligase | 567,83 | 727,16 | 14,81 | 15,52 | p > 0,05 | - | Aminoacyl-tRNA-synthetases |
| C1GF61 | Serine-tRNA ligase | 1307,58 | 903,50 | 3,74 | 7,95 | p > 0,05 | - | Aminoacyl-tRNA-synthetases |
| C1FZP0 | Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D | 448,21 | - | 2,37 | 0,00 | * | Secretome P | Translation |
| C1GCK8 | Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha | 1367,40 | - | 18,84 | 0,00 | * | Secretome P | Translation |

| | | | | | | | | |
|--------|------------------------------------------------------------|---------|---------|--------|---------|----------|-------------|------------------------|
| C1FYQ6 | Eukaryotic translation initiation factor 3 135 kDa subunit | - | 527,95 | 0,00 | 20,37 | ** | - | translation initiation |
| C1FZD4 | Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M | - | 1187,77 | 0,00 | 39,94 | ** | - | Translation |
| C1G0F2 | Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L | - | 481,32 | 0,00 | 7,26 | ** | - | Translation |
| C1G2D0 | Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F | - | 1934,22 | 0,00 | 21,36 | ** | - | Translation |
| C1G373 | Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C | - | 870,79 | 0,00 | 45,48 | ** | - | Translation |
| C1G686 | Eukaryotic translation initiation factor 6 | - | 1418,06 | 0,00 | 10,90 | ** | - | Translation |
| C1G6F4 | Ribosome recycling factor domain-containing protein | - | 7841,76 | 0,00 | 21,06 | ** | Secretome P | Translation |
| C1G6U1 | Elongation factor 1-beta | - | 1663,11 | 0,00 | 160,23 | ** | Secretome P | Translation |
| C1GAG5 | Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I | - | 816,53 | 0,00 | 9,99 | ** | - | Translation |
| C1GF43 | Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1 | - | 558,69 | 0,00 | 2,10 | ** | - | Translation |
| C1GKX0 | Eukaryotic translation initiation factor 1A_Y-chromosomal | - | 460,64 | 0,00 | 2,82 | ** | - | Translation |
| C1G0R7 | Translation initiation factor 4G | - | 1100,02 | 0,00 | 60,22 | ** | Secretome P | Translation |
| C1G1F2 | Elongation factor 1-alpha | 5137,23 | 8723,89 | 438,41 | 1132,46 | p < 0,05 | Secretome P | Translation |
| C1G4T3 | Elongation factor Tu | 5266,51 | 8175,65 | 103,73 | 269,33 | p < 0,05 | - | Translation |

| | | | | | | | | |
|---------------------|------------------------------------------------------|---------|---------|--------|--------|----------|-------------|-----------------------------------|
| C1G9T0 | Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A | 1250,44 | 4317,85 | 10,06 | 76,07 | p < 0,05 | - | Translation |
| C1GG28 | Elongation factor 1 gamma domain-containing protein | 3486,86 | 3873,19 | 140,50 | 311,74 | p < 0,05 | Secretome P | Translation |
| C1GHZ8 | Translation initiation factor eif-2b delta subunit | 792,44 | 1595,50 | 1,77 | 28,84 | p < 0,05 | Secretome P | Translation |
| C1GLI9 | Elongation factor 2 | 2289,42 | 4695,76 | 170,12 | 371,22 | p < 0,05 | - | Translation |
| C1G0P8 | Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G | 1033,63 | 1297,55 | 10,79 | 30,27 | p > 0,05 | - | Translation |
| C1G791 | Elongation factor G_ mitochondrial | 1153,71 | 1402,02 | 9,52 | 51,49 | p > 0,05 | - | Translation |
| C1GAC4 | Translation initiation factor 2 subunit beta | 3769,42 | 6291,47 | 48,65 | 65,07 | p > 0,05 | Secretome P | Translation |
| C1GCD5 | Nascent polypeptide-associated complex subunit beta | 646,26 | 1480,85 | 4,25 | 2,26 | p > 0,05 | Secretome P | Translation |
| C1GFS4 | Translation initiation factor SUI1 | 2694,18 | 5234,13 | 10,03 | 62,36 | p > 0,05 | Secretome P | Translation |
| C1GIZ3 | Elongation factor 3 | 1486,96 | 1185,37 | 80,75 | 45,26 | p > 0,05 | - | Translation |
| C1GLA2 | Eukaryotic translation initiation factor 5A | 1013,40 | 805,46 | 0,62 | 1,32 | p > 0,05 | Secretome P | Translation |
| PROTEIN FATE | | | | | | | | |
| C1FZG1 | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase | 1294,84 | - | 1,26 | 0,00 | * | Secretome P | Protein folding and stabilization |
| C1FZN1 | 26S proteasome regulatory subunit RPN10 | 856,89 | - | 0,54 | 0,00 | * | - | Protein/peptide degradation |

| | | | | | | | | |
|------------|-------------------------------------------------|--------|---------|------|-------|----|-------------|----------------------------------------------|
| C1GCV8 | T-complex protein 1 subunit zeta | 760,49 | - | 3,90 | 0,00 | * | - | Protein folding and stabilization |
| C1GD57 | Probable Xaa-Pro aminopeptidase PEPP | 542,48 | - | 1,38 | 0,00 | * | - | Protein folding and stabilization |
| A0A0A0HV65 | Ubiquitin-conjugating enzyme variant MMS2 | - | 998,55 | 0,00 | 14,27 | ** | Secretome P | Protein/peptide degradation |
| A0A0A0HVT2 | 26S protease regulatory subunit 6B | - | 1102,19 | 0,00 | 57,20 | ** | - | Protein targeting, sorting and translocation |
| A0A0A0HWS3 | Vacuolar protein sorting-associated protein | - | 1837,40 | 0,00 | 49,48 | ** | - | Protein targeting, sorting and translocation |
| C1FYQ2 | T-complex protein 1 subunit gamma | - | 1403,63 | 0,00 | 48,05 | ** | - | Protein folding and stabilization |
| C1G226 | Autophagy-related protein 3 | - | 775,05 | 0,00 | 9,44 | ** | Secretome P | Protein/peptide degradation |
| C1G4R9 | 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 10 | - | 2179,46 | 0,00 | 27,39 | ** | - | Protein/peptide degradation |
| C1G6V3 | Ubiquitin-like modifier SUMO | - | 536,40 | 0,00 | 4,55 | ** | Secretome P | Ubiquitin system |
| C1G7T4 | Lon protease homolog_ mitochondrial | - | 705,45 | 0,00 | 39,36 | ** | - | Protein/peptide degradation |
| C1G8X9 | Peptidylprolyl isomerase | - | 1343,65 | 0,00 | 29,69 | ** | Secretome P | Protein folding and stabilization |
| C1G8Z1 | Proteasome component PUP1 | - | 3641,04 | 0,00 | 4,87 | ** | - | Protein folding and stabilization |
| C1G9N1 | Proteasome component C5 | - | 1274,07 | 0,00 | 9,40 | ** | Secretome P | Protein folding and stabilization |
| C1GBF1 | AAA ATPase | - | 779,21 | 0,00 | 17,30 | ** | - | Protein/peptide degradation |

| | | | | | | | | |
|--------|-----------------------------------------------------|---------|---------|-------|--------|----------|-------------|-----------------------------------|
| C1GJQ4 | O-methyltransferase | - | 847,69 | 0,00 | 13,48 | ** | - | |
| C1GJX2 | Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase | - | 1109,91 | 0,00 | 15,29 | ** | - | Protein/peptide degradation |
| C1GKS2 | Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase | - | 587,04 | 0,00 | 7,83 | ** | - | Protein/peptide degradation |
| C1GKU6 | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase | - | 4271,22 | 0,00 | 29,25 | ** | Secretome P | Protein folding and stabilization |
| C1GLJ3 | T-complex protein 1_ eta subunit | - | 1426,13 | 0,00 | 12,63 | ** | - | Protein folding and stabilization |
| C1FZL0 | T-complex protein 1 subunit delta | 897,81 | 2236,16 | 5,04 | 70,25 | p < 0,05 | - | Protein folding and stabilization |
| C1G159 | 26S protease regulatory subunit 6A | 680,60 | 1016,57 | 3,05 | 35,33 | p < 0,05 | - | Protein/peptide degradation |
| C1G6U0 | ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpB | 907,90 | 1515,69 | 6,57 | 97,37 | p < 0,05 | - | Protein/peptide degradation |
| C1G953 | Prohibitin-2 | 639,85 | 2688,09 | 4,47 | 134,10 | p < 0,05 | - | Protein folding and stabilization |
| C1GC92 | Prohibitin-1 | 1319,18 | 2085,66 | 9,55 | 160,45 | p < 0,05 | - | Protein folding and stabilization |
| C1GF01 | E3 ubiquitin ligase complex SCF subunit sconC | 694,15 | 3708,97 | 3,73 | 81,41 | p < 0,05 | - | Protein/peptide degradation |
| C1GGQ1 | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D | 1279,17 | 2082,29 | 24,94 | 106,64 | p < 0,05 | Secretome P | Protein folding and stabilization |
| C1GHN0 | Mitochondrial-processing peptidase subunit beta | 727,59 | 1336,40 | 13,23 | 100,34 | p < 0,05 | - | Protein/peptide degradation |
| C1GIA6 | GrpE protein homolog | 3582,23 | 4085,46 | 3,60 | 62,73 | p < 0,05 | - | Chaperones and folding catalysts |

| | | | | | | | | |
|-------------------------------------------|-------------------------------------------------|---------|---------|-------|-------|----------|-------------|-----------------------------------|
| C1GL41 | T-complex protein 1 subunit beta | 841,12 | 1193,60 | 4,18 | 49,20 | p < 0,05 | - | Protein folding and stabilization |
| A0A0A0HT06 | 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 6 | 585,06 | 881,32 | 6,78 | 49,09 | p > 0,05 | - | Protein/peptide degradation |
| C1G0I9 | Endoplasmic reticulum protein | 1096,18 | 555,83 | 18,85 | 6,55 | p > 0,05 | Signal P | Folding, sorting and degradation |
| C1G554 | Ubiquitin-activating enzyme E1 | 527,85 | 412,55 | 20,12 | 6,72 | p > 0,05 | - | Folding, sorting and degradation |
| C1G9A5 | Protein disulfide-isomerase | 1491,86 | 1460,47 | 45,60 | 93,59 | p > 0,05 | Signal P | Protein folding and stabilization |
| C1GEE2 | Protein disulfide-isomerase domain | 1221,57 | 832,51 | 4,13 | 1,30 | p > 0,05 | Signal P | Protein folding and stabilization |
| C1GFL5 | 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12 | 701,51 | 1290,00 | 3,12 | 10,95 | p > 0,05 | - | Protein/peptide degradation |
| C1GHW5 | 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11 | 621,09 | 1130,84 | 8,54 | 13,61 | p > 0,05 | - | Protein/peptide degradation |
| C1GMJ8 | T-complex protein 1 subunit epsilon | 903,03 | 959,94 | 4,67 | 5,06 | p > 0,05 | - | Protein folding and stabilization |
| CELL RESCUE, DEFENSE AND VIRULENCE | | | | | | | | |
| C1G0D4 | Peroxisomal catalase | 1093,47 | - | 15,83 | 0,00 | * | Secretome P | Detoxification |
| C1G7E0 | Mitochondrial peroxiredoxin PRX1 | 2241,76 | - | 15,64 | 0,00 | * | - | Detoxification |
| C1GKT9 | Peroxisomal matrix protein | - | 1454,66 | 0,00 | 11,49 | ** | Secretome P | Detoxification |
| C1G489 | Superoxide dismutase SOD2 | - | 1299,76 | 0,00 | 8,08 | ** | Secretome P | Detoxification |

| | | | | | | | | |
|--------|----------------------------------------|---------|---------|--------|--------|----------|-------------|-----------------|
| C1G5D0 | Glutamate-cysteine ligase | - | 601,08 | 0,00 | 0,09 | ** | - | Detoxification |
| C1G7K8 | Cytochrome c peroxidase, mitochondrial | 2674,55 | 7013,92 | 79,94 | 401,97 | p < 0,05 | Secretome P | Detoxification |
| C1GE18 | Thioredoxin | 1566,61 | 8555,59 | 3,43 | 11,93 | p > 0,05 | Secretome P | Detoxification |
| C1G0W1 | DnaJ domain-containing protein | - | 459,69 | 0,00 | 4,27 | ** | Secretome P | Stress response |
| C1G240 | DnaJ domain protein Psi | - | 830,39 | 0,00 | 2,76 | ** | Secretome P | Stress response |
| C1G7T3 | Chaperone DnaJ | - | 924,57 | 0,00 | 15,24 | ** | Secretome P | Stress response |
| C1GAU3 | Heat shock protein STI1 | - | 1368,15 | 0,00 | 107,60 | ** | - | Stress response |
| C1GMV5 | DnaJ domain protein | - | 736,30 | 0,00 | 15,67 | ** | - | stress response |
| C1G0P0 | Hsp7-like protein | 3379,89 | 6280,77 | 178,35 | 448,84 | p < 0,05 | - | Stress response |
| C1G1M5 | Hsp98-like protein | 768,69 | 1063,71 | 26,61 | 79,75 | p < 0,05 | - | Stress response |
| C1G445 | Hsp90 co-chaperone AHA1 | 465,82 | 3969,61 | 2,97 | 164,53 | p < 0,05 | Secretome P | Stress response |
| C1G6F6 | Hsp75-like protein | 2441,50 | 4241,98 | 60,41 | 215,17 | p < 0,05 | - | Stress response |
| C1G6I0 | Heat shock protein Hsp88 | 1324,01 | 2426,34 | 37,67 | 153,86 | p < 0,05 | - | Stress response |
| C1G9U8 | Chaperone DnaJ | 1364,74 | 2949,14 | 22,91 | 181,11 | p < 0,05 | - | Stress response |

| | | | | | | | | |
|----------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|---------|----------|--------|--------|----------|-------------|--------------------------------|
| C1GKC9 | Hsp90-like protein | 4975,66 | 8595,27 | 367,35 | 921,44 | p < 0,05 | - | stress response |
| C1GLX8 | Hsp60-like protein | 4451,81 | 11533,78 | 158,00 | 582,59 | p < 0,05 | - | stress response |
| C1G514 | Hsp90 co-chaperone Cdc37 | 700,30 | 1344,57 | 1,64 | 26,94 | p < 0,05 | Secretome P | Stress response |
| C1G8H6 | Chaperone DnaK | 3063,89 | 3544,96 | 197,55 | 283,87 | p < 0,05 | Signal P | stress response |
| C1G9M7 | 30 kDa heat shock protein | 1648,02 | 1529,04 | 23,01 | 80,39 | p < 0,05 | Secretome P | Stress response |
| C1GLI2 | Hsp72-like protein | 7391,04 | 12984,74 | 327,45 | 771,64 | p < 0,05 | - | Stress response |
| C1GK29 | Immunodominant antigen Gp43 | 706,13 | - | 6,96 | 0,00 | * | Signal P | Disease, virulence and defense |
| C1G560 | Vanadate resistance protein | - | 1088,55 | 0,00 | 8,24 | ** | - | Disease, virulence and defense |
| C1G258 | Low-temperature viability protein Itv1 | - | 730,71 | 0,00 | 3,55 | ** | Secretome P | |
| CELLULAR TRANSPORT, TRANSPORT FACILITIES AND TRANSPORT ROUTES | | | | | | | | |
| C1GLJ9 | karyopherin Sal3 | 556,36 | - | 11,55 | 0,00 | * | Signal P | Nuclear transport |
| C1G645 | Translocation protein SEC72 | 672,56 | - | 12,82 | 0,00 | * | Secretome P | Protein transport |
| C1GGW7 | Mitochondrial import receptor subunit tom-40 | 748,80 | - | 1,55 | 0,00 | * | Secretome P | Mitochondrial transport |

| | | | | | | | | |
|------------|-----------------------------------------|--------|---------|------|--------|----|----------------|-----------------------|
| C1GID7 | Carnitine O-acetyltransferase | 483,92 | - | 2,16 | 0,00 | * | Secretome P | Transported compounds |
| C1GJ29 | Membrane transporter | 891,40 | - | 2,12 | 0,00 | * | - | Membrane transport |
| C1G8G0 | Karyopherin Kap123 | - | 722,32 | 0,00 | 47,21 | ** | - | Nuclear transport |
| A0A0A0HXD2 | Charged multivesicular body protein 3 | - | 905,49 | 0,00 | 3,68 | ** | - | Endocytosis |
| C1FYR1 | Rab Family | - | 792,64 | 0,00 | 22,88 | ** | Secretome P | Vesicle transport |
| C1G0N4 | Importin-7 | - | 2191,88 | 0,00 | 56,20 | ** | - | Nuclear transport |
| C1G132 | Peroxin 14 | - | 919,71 | 0,00 | 18,60 | ** | Secretome P | Peroxisome transport |
| C1G182 | ATPase GET3 | - | 2077,63 | 0,00 | 54,64 | ** | - | Transported compounds |
| C1G3X8 | Vesicle transport v-SNARE protein vti1 | - | 481,99 | 0,00 | 2,00 | ** | - | Vesicle Transport |
| C1G6M8 | ADP-ribosylation factor | - | 1939,80 | 0,00 | 33,07 | ** | - | Vesicle Transport |
| C1G9F9 | Dynein light chain | - | 4402,12 | 0,00 | 17,12 | ** | - | Transport facilities |
| C1GA14 | Clathrin heavy chain | - | 2252,44 | 0,00 | 112,90 | ** | - | Transport facilities |
| C1GEZ2 | Protein transporter SEC61 subunit alpha | - | 897,59 | 0,00 | 3,77 | ** | - | Protein transport |
| C1GFX9 | Glycolipid transferprotein HET-C2 | - | 4310,70 | 0,00 | 47,11 | ** | - | Transported compounds |

| | | | | | | | | |
|--------|--------------------------------------------|---------|---------|--------|--------|----------|-------------|-------------------------|
| C1GGE8 | Kinesin-like protein | - | 522,35 | 0,00 | 8,48 | ** | - | Transport facilities |
| C1GGI3 | Golgi transport protein Sly1 | - | 1485,32 | 0,00 | 10,77 | ** | - | Protein transport |
| C1GH29 | ADP-ribosylation factor 1 | - | 1042,36 | 0,00 | 0,32 | ** | - | Vesicle Transport |
| C1GIC8 | Vesicular-fusion protein SEC17 | - | 874,07 | 0,00 | 1,98 | ** | - | Protein transport |
| C1GJS2 | Phosphatidylinositol transfer protein SFH5 | - | 1818,11 | 0,00 | 66,54 | ** | Secretome P | Transported compounds |
| C1GJX3 | Endosomal cargo receptor (Erp3) | - | 1184,70 | 0,00 | 47,42 | ** | Signal P | Endocytosis |
| C1GMM4 | Peroxin-11 | - | 945,78 | 0,00 | 19,92 | ** | - | Peroxisome transport |
| C1GN89 | Translin associated factor X | - | 416,34 | 0,00 | 0,31 | ** | - | Nuclear transport |
| C1G3C4 | ADP_ATP carrier protein | 1780,72 | 5576,12 | 200,11 | 722,91 | p < 0,05 | - | Transported compounds |
| C1G635 | ABC transporter ATP-binding protein ARB1 | 1007,61 | 960,83 | 3,62 | 60,04 | p < 0,05 | - | Nuclear transport |
| C1GBG4 | Coatomer subunit gamma | 663,54 | 1916,70 | 3,53 | 54,54 | p < 0,05 | - | Transport facilities |
| C1G203 | Mitochondrial outer membrane protein | 1351,30 | - | 2,88 | 0,00 | * | Secretome P | |
| C1GHF6 | Mitochondrial phosphate carrier protein | 837,88 | 3659,85 | 46,46 | 223,21 | p < 0,05 | - | Mitochondrial transport |
| C1GLM2 | Mitochondrial outer membrane protein porin | 2676,89 | 5522,16 | 60,28 | 296,53 | p < 0,05 | Secretome P | Mitochondrial transport |

| | | | | | | | | |
|----------------------------|--------------------------------------------------|---------|---------|------|-------|----------|-------------|-------------------------|
| A0A0A0HWM5 | Mitochondrial precursor proteins import receptor | 802,12 | 2832,87 | 5,51 | 56,18 | p > 0,05 | Secretome P | Mitochondrial transport |
| C1G4X8 | Mitochondrial import receptor subunit tom22 | 1046,62 | 1509,49 | 9,13 | 11,80 | p > 0,05 | Secretome P | Mitochondrial transport |
| C1G5H6 | Translocation protein SEC66 | 711,04 | 899,52 | 2,63 | 3,90 | p > 0,05 | Secretome P | Protein transport |
| C1GBT3 | Ctr copper transporter family protein | - | 725,08 | 0,00 | 59,46 | ** | - | Transported compounds |
| CELLULAR SIGNALLING | | | | | | | | |
| A0A0A0HRY5 | GTP-binding protein | 369,48 | - | 5,94 | 0,00 | * | - | |
| C1G114 | GTP-binding protein rho2 | 348,45 | - | 1,45 | 0,00 | * | - | |
| C1G6J5 | Adenylyl cyclase-associated protein | 364,37 | - | 0,50 | 0,00 | * | Secretome P | |
| C1GBH9 | Guanine nucleotide-binding protein beta 5 | 353,52 | - | 0,35 | 0,00 | * | Secretome P | |
| C1G092 | GTP-binding protein ypt2 | | | 0,00 | 20,89 | ** | - | |
| C1G2S7 | Rab GDP dissociation inhibitor | - | 615,03 | 0,00 | 38,22 | ** | - | |
| C1G501 | Calmodulin | - | 1652,70 | 0,00 | 10,12 | ** | - | |
| C1G785 | GTP-binding protein ypt5 | - | 1285,03 | 0,00 | 19,91 | ** | Secretome P | |
| C1G887 | GTP-binding protein YPT52 | - | 540,46 | 0,00 | 0,66 | ** | - | |

| | | | | | | | | |
|------------------------------------------|------------------------------------------------------|----------|---------|-------|--------|----------|-------------|----------------------------------|
| C1GEC2 | GTP-binding protein ypt7 | - | 4565,56 | 0,00 | 66,75 | ** | - | |
| C1GGB6 | Transmembrane 9 superfamily member | - | 659,49 | 0,00 | 7,06 | ** | Signal P | |
| C1G4I1 | Stomatin family protein | 936,46 | 2181,95 | 18,24 | 143,71 | p < 0,05 | - | |
| C1G9W2 | Small COPII coat GTPase sar1 | 1421,79 | 8702,69 | 19,56 | 194,41 | p < 0,05 | - | |
| C1GCT8 | GTP-binding nuclear protein | 1693,90 | 7319,45 | 35,32 | 129,36 | p < 0,05 | - | |
| C1GF62 | GTP-binding protein rhb1 | 683,18 | 2963,34 | 2,47 | 15,47 | p < 0,05 | - | |
| C1GLU6 | GTP-binding protein rhoA | 3150,96 | 6432,67 | 31,34 | 100,85 | p < 0,05 | - | |
| C1GLV1 | GTP-binding protein ypt1 (Fragment) | 11981,16 | 7528,31 | 33,90 | 172,43 | p < 0,05 | - | |
| C1G3P9 | Calnexin | 1101,74 | 1804,55 | 57,21 | 92,79 | p > 0,05 | Signal P | |
| C1GM08 | Ras-like protein Rab-11A | 2762,46 | 3093,14 | 20,19 | 57,20 | p > 0,05 | - | |
| BIOGENESIS OF CELLULAR COMPONENTS | | | | | | | | |
| C1FYS5 | Microtubule-associated protein RP/EB family member 3 | - | 737,98 | 0,00 | 13,78 | ** | Secretome P | Cytoskeleton/structural proteins |
| C1GE52 | Actin | - | 420,30 | 0,00 | 1,80 | ** | - | Cytoskeleton/structural proteins |
| C1G6U5 | Tubulin beta chain | - | 7196,89 | 0,00 | 253,39 | ** | - | Cytoskeleton/structural proteins |

| | | | | | | | | |
|------------------------------|--------------------------------------|---------|----------|--------|--------|----------|-------------|----------------------------------|
| C1GM22 | Tubulin alpha chain | - | 2282,60 | 0,00 | 3,90 | ** | - | Cytoskeleton/structural proteins |
| A0A0A0HVC6 | Tubulin gamma chain | 672,09 | - | 9,19 | 0,00 | * | - | Cytoskeleton/structural proteins |
| A0A0A0HWK8 | Actin | 4768,58 | 11332,07 | 143,99 | 618,05 | p < 0,05 | - | Cytoskeleton/structural proteins |
| C1GDK5 | Fimbrin | 557,38 | 2164,00 | 1,61 | 70,63 | p < 0,05 | - | Cytoskeleton/structural proteins |
| A0A0A0HRG7 | Actin | 3674,65 | 5363,32 | 38,41 | 50,50 | p > 0,05 | - | Cytoskeleton/structural proteins |
| C1FZT8 | Tubulin alpha chain | 4511,14 | 13646,37 | 103,89 | 278,49 | p > 0,05 | - | Cytoskeleton/structural proteins |
| C1G0N2 | Actin cytoskeleton protein (VIP1) | 334,90 | 1238,03 | 1,94 | 34,25 | p > 0,05 | Secretome P | Cytoskeleton/structural proteins |
| C1GI55 | Mitochondrial fission 1 protein | - | 1265,86 | 0,00 | 5,05 | ** | - | Mitochondrial biogenesis |
| C1FZ98 | Mitochondrial metallochaperone Sco1 | 532,76 | 567,61 | 12,65 | 10,11 | p > 0,05 | - | Mitochondrial biogenesis |
| C1GBS5 | 1_3-beta-glucanosyltransferase Gel 2 | 358,21 | - | 0,54 | 0,00 | * | Signal P | Cell wall |
| C1GFA1 | Chitin synthase activator | - | 702,00 | 0,00 | 11,27 | ** | Secretome P | Cell wall |
| C1GG99 | Cell lysis protein cw11 | 657,46 | 2055,28 | 12,45 | 83,31 | p > 0,05 | - | Cell wall |
| UNCLASSIFIED PROTEINS | | | | | | | | |
| C1G9H8 | prp 4 CRoW domain-containing protein | 730,24 | - | 0,24 | 0,00 | * | Signal P | |

| | | | | | | | |
|------------|--------------------------------------|---------|---|-------|------|---|-------------|
| C1GJJ1 | Serine/threonine-protein phosphatase | 347,03 | - | 0,67 | 0,00 | * | - |
| A0A0A0HTH5 | Hypothetical protein | 591,58 | - | 0,43 | 0,00 | * | Secretome P |
| A0A0A0HTM6 | Hypothetical protein | 853,34 | - | 0,05 | 0,00 | * | Secretome P |
| A0A0A0HU62 | Hypothetical protein | 732,43 | - | 0,14 | 0,00 | * | - |
| A0A0A0HU75 | Hypothetical protein | 1832,29 | - | 35,94 | 0,00 | * | Secretome P |
| A0A0A0HUH5 | Hypothetical protein | 681,24 | - | 0,24 | 0,00 | * | - |
| A0A0A0HVG7 | Hypothetical protein | 512,06 | - | 0,12 | 0,00 | * | Secretome P |
| A0A0A0HWP5 | Hypothetical protein | 670,90 | - | 1,33 | 0,00 | * | - |
| C1G0K1 | Hypothetical protein | 887,48 | - | 2,07 | 0,00 | * | - |
| C1G2R4 | Hypothetical protein | 1561,85 | - | 3,15 | 0,00 | * | - |
| C1G4V1 | Hypothetical protein | 678,00 | - | 1,78 | 0,00 | * | Secretome P |
| C1G577 | Hypothetical protein | 1035,12 | - | 0,79 | 0,00 | * | Secretome P |
| C1G5B8 | Hypothetical protein | 996,55 | - | 2,55 | 0,00 | * | Secretome P |
| C1G5L3 | Hypothetical protein | 1815,06 | - | 5,71 | 0,00 | * | Secretome P |

| | | | | | | | |
|------------|--------------------------|---------|---------|------|-------|----|-------------|
| C1G7K4 | Hypothetical protein | 1370,41 | - | 0,19 | 0,00 | * | - |
| C1G8G1 | Hypothetical protein | 700,19 | - | 0,34 | 0,00 | * | Secretome P |
| C1GDH6 | Hypothetical protein | 1189,79 | - | 0,26 | 0,00 | * | - |
| C1GDP5 | Hypothetical protein | 405,82 | - | 5,86 | 0,00 | * | Secretome P |
| C1GEL7 | Hypothetical protein | 815,88 | - | 3,81 | 0,00 | * | Secretome P |
| C1GGK6 | Hypothetical protein | 454,16 | - | 0,16 | 0,00 | * | - |
| C1GID5 | Hypothetical protein | 883,88 | - | 0,87 | 0,00 | * | Secretome P |
| C1GIP7 | Hypothetical protein | 778,79 | - | 0,21 | 0,00 | * | Secretome P |
| A0A0A0HUS2 | Hypothetical protein | 523,38 | - | 0,25 | 0,00 | * | Secretome P |
| A0A0A0HXL5 | Hypothetical protein | 547,62 | - | 0,46 | 0,00 | * | - |
| C1FZZ7 | SNARE Ykt6 | - | 2760,19 | 0,00 | 24,19 | ** | - |
| C1G070 | DNA-binding protein HGH1 | - | 768,32 | 0,00 | 5,10 | ** | - |
| C1FZH1 | Actin binding protein | - | 926,19 | 0,00 | 35,42 | ** | Secretome P |
| C1G1F4 | Ankyrin repeat protein | - | 1112,84 | 0,00 | 9,31 | ** | - |

| | | | | | | | |
|------------|--------------------------------------------|---|---------|------|-------|----|-------------|
| C1G3T1 | YagE family protein | - | 1033,37 | 0,00 | 4,57 | ** | - |
| C1G521 | DUF1682 domain-containing protein | - | 1413,82 | 0,00 | 0,82 | ** | - |
| C1G0S3 | DUF833 domain-containing protein | - | 711,68 | 0,00 | 3,80 | ** | - |
| C1G776 | CobW domain-containing protein | - | 985,46 | 0,00 | 21,02 | ** | Secretome P |
| C1GB68 | HIT domain-containing protein | - | 2527,44 | 0,00 | 13,83 | ** | - |
| C1GEQ3 | NAP family protein | - | 526,57 | 0,00 | 1,34 | ** | - |
| C1GFJ7 | NIPSNAP family protein | - | 639,64 | 0,00 | 4,56 | ** | Secretome P |
| C1G8F8 | Ser/Thr protein phosphatase family protein | - | 530,08 | 0,00 | 14,54 | ** | Secretome P |
| C1GLK9 | Phosphatase | - | 429,69 | 0,00 | 2,70 | ** | Secretome P |
| C1FZP5 | Hypothetical protein | - | 877,43 | 0,00 | 6,66 | ** | Secretome P |
| A0A0A0HRU5 | Hypothetical protein | - | 530,14 | 0,00 | 0,73 | ** | - |
| A0A0A0HSL2 | Hypothetical protein | - | 734,22 | 0,00 | 0,23 | ** | - |
| A0A0A0HSX3 | Hypothetical protein | - | 389,33 | 0,00 | 0,13 | ** | Secretome P |
| A0A0A0HTC7 | Hypothetical protein | - | 884,35 | 0,00 | 0,33 | ** | Secretome P |

| | | | | | | | |
|------------|----------------------|---|---------|------|-------|----|-------------|
| A0A0A0HU39 | Hypothetical protein | - | 698,08 | 0,00 | 0,23 | ** | Secretome P |
| A0A0A0HUA5 | Hypothetical protein | - | 388,51 | 0,00 | 0,24 | ** | Secretome P |
| A0A0A0HUD7 | Hypothetical protein | - | 1385,29 | 0,00 | 22,28 | ** | Secretome P |
| A0A0A0HVQ7 | Hypothetical protein | - | 1279,23 | 0,00 | 1,40 | ** | Secretome P |
| A0A0A0HVR2 | Hypothetical protein | - | 796,54 | 0,00 | 0,16 | ** | Secretome P |
| A0A0A0HVX8 | Hypothetical protein | - | 603,29 | 0,00 | 3,20 | ** | Secretome P |
| C1FYY4 | Hypothetical protein | - | 678,53 | 0,00 | 32,16 | ** | Secretome P |
| C1G0Z0 | Hypothetical protein | - | 590,33 | 0,00 | 5,53 | ** | Secretome P |
| C1G1D4 | Hypothetical protein | - | 768,61 | 0,00 | 0,51 | ** | Secretome P |
| C1G3V2 | Hypothetical protein | - | 6487,26 | 0,00 | 83,38 | ** | Signal P |
| C1G4E3 | Hypothetical protein | - | 936,71 | 0,00 | 13,36 | ** | Secretome P |
| C1G4K3 | Hypothetical protein | - | 509,34 | 0,00 | 0,36 | ** | Secretome P |
| C1G534 | Hypothetical protein | - | 1570,92 | 0,00 | 15,67 | ** | - |
| C1G5D3 | Hypothetical protein | - | 1083,92 | 0,00 | 4,31 | ** | Secretome P |

| | | | | | | | |
|--------|----------------------|---|---------|------|-------|----|----------------|
| C1G6P6 | Hypothetical protein | - | 423,14 | 0,00 | 4,86 | ** | Secretome P |
| C1G712 | Hypothetical protein | - | 850,80 | 0,00 | 10,24 | ** | Secretome P |
| C1G8R2 | Hypothetical protein | - | 664,25 | 0,00 | 0,17 | ** | Secretome P |
| C1G8Z3 | Hypothetical protein | - | 859,02 | 0,00 | 0,65 | ** | Secretome P |
| C1G909 | Hypothetical protein | - | 851,70 | 0,00 | 0,91 | ** | Secretome P |
| C1GAH0 | Hypothetical protein | - | 1011,90 | 0,00 | 1,72 | ** | Secretome P |
| C1GCQ4 | Hypothetical protein | - | 625,56 | 0,00 | 0,10 | ** | Secretome P |
| C1GE21 | Hypothetical protein | - | 527,68 | 0,00 | 10,00 | ** | Secretome P |
| C1GEB4 | Hypothetical protein | - | 791,07 | 0,00 | 0,13 | ** | Secretome P |
| C1GG52 | Hypothetical protein | - | 949,22 | 0,00 | 11,51 | ** | - |
| C1GHS6 | Hypothetical protein | - | 1035,33 | 0,00 | 0,35 | ** | - |
| C1GJR6 | Hypothetical protein | - | 542,79 | 0,00 | 6,23 | ** | Secretome P |
| C1GK31 | Hypothetical protein | - | 713,81 | 0,00 | 1,35 | ** | - |
| C1GLX7 | Hypothetical protein | - | 900,45 | 0,00 | 27,81 | ** | - |

| | | | | | | | |
|--------|----------------------------------------|---------|---------|-------|-------|-------------|----------------|
| C1GMJ4 | Hypothetical protein | - | 930,04 | 0,00 | 2,39 | ** | Secretome P |
| C1G784 | MICOS complex subunit MIC60 | 572,71 | 3631,84 | 3,74 | 77,00 | p < 0,05 | Secretome P |
| C1G4C0 | NMDA receptor-regulated protein | 991,13 | 981,50 | 1,74 | 34,63 | p < 0,05 | - |
| C1FYZ5 | Hypothetical protein | 974,10 | 1615,15 | 2,50 | 23,74 | p < 0,05 | - |
| C1FZ06 | DNA-binding protein_ 42 kDa | 1702,94 | 860,90 | 4,03 | 7,58 | p > 0,05 | Secretome P |
| C1G647 | Grp1p | 679,83 | 664,91 | 4,25 | 0,92 | p > 0,05 | Secretome P |
| C1G050 | SNF7 family protein Fti1/Did2 | 1073,78 | 1791,50 | 1,59 | 6,11 | p > 0,05 | - |
| C1G3D9 | KH domain RNA-binding protein | 1794,00 | 727,78 | 2,36 | 25,90 | p > 0,05 | Secretome P |
| C1GIE4 | DUF1674 domain-containing protein | 1211,67 | 415,11 | 1,42 | 2,29 | p > 0,05 | Secretome P |
| C1GKC8 | NTE2 and RRM domain-containing protein | 2988,52 | 2504,84 | 69,56 | 69,59 | p > 0,05 | Secretome P |
| C1GE05 | GMF family protein | 638,50 | 485,42 | 2,12 | 4,79 | p > 0,05 | - |
| C1GBG5 | Phosducin family protein | 1134,01 | 2464,03 | 7,24 | 9,83 | p > 0,05 | - |
| C1GH32 | TCTP family protein | 2344,91 | 4355,08 | 8,02 | 80,38 | p > 0,05 | - |
| C1FZA2 | Hypothetical protein | 2153,07 | 2857,76 | 12,23 | 10,35 | p > 0,05 | Secretome P |

| | | | | | | | |
|--------|----------------------|---------|---------|-------|--------|----------|-------------|
| C1G7Q5 | Hypothetical protein | 3290,96 | 9284,51 | 6,83 | 53,11 | p > 0,05 | - |
| C1G8P5 | Hypothetical protein | 820,23 | 2001,87 | 2,45 | 12,22 | p > 0,05 | Secretome P |
| C1GBD3 | Hypothetical protein | 556,09 | 684,36 | 2,70 | 5,24 | p > 0,05 | Secretome P |
| C1GFP4 | Hypothetical protein | 3664,85 | 8038,69 | 39,63 | 107,88 | p > 0,05 | Secretome P |

Accession: number accession of Uniprot database.

Description: description of protein names identified by mass spectrometry.

Mean Score: mean score of proteins identified in mass spectrometry.

Mean of protein concentration (fmol): mean of protein concentration (fmol) identified by mass spectrometry

p-value: Protein found exclusively in the *P. americana* cell wall: *; protein found exclusively in the *P. brasiliensis* cell wall: **; differentially expressed protein: p < 0,05.

SignalP/SecretomeP: Secretion pathway prediction.

CAPÍTULO III

5. DISCUSSÃO

Estudos genéticos (Mavengere et al., 2020; Turissini et al., 2017) mostraram divergência entre espécies de *Paracoccidioides*; Turissini e colaboradores (2017), após analisarem sequências genéticas de loci nucleares e mitocondriais, sugeriram o reconhecimento de cinco espécies taxonômicas, *P. lutzii*, que já havia sido apontada como divergente de todas as outras espécies (Teixeira et al., 2009), *P. brasiliensis*, *P. americana*, *P. restrepiensis* e *P. venezuelensis*, que anteriormente formavam os grupos filogenéticos S1, PS2, PS3 e PS4, respectivamente. Recentemente Vilela et al. (2021) apontaram duas novas espécies de *Paracoccidioides*, *P. lobo* e *P. cetii* que se associam com casos de micoses cutâneas, em humanos e golfinhos, respectivamente.

A diferenças genéticas entre às espécies de *Paracoccidioides* podem ser associadas a divergências metabólicas e de virulência encontradas entre espécies. Um estudo proteômico mostrou preferências metabólicas entre quatro espécies de *Paracoccidioides*, Pigozzo et al. (2013) observaram que leveduras de *P. lutzii* usam preferencialmente vias anaeróbias para a produção energia, enquanto, leveduras de *P. brasiliensis* têm preferência pelo metabolismo de ácidos graxos, ao ter maior expressão de proteínas relacionadas com β -oxidação. Leveduras de *P. americana* tiveram maior expressão de proteínas associadas ao ciclo das pentoses. De outro modo, também foram encontradas diferenças na virulência entre espécies; Singer-Vermes et al. (1989) mostraram que a cepa *Pb18* desencadeia maior resposta humoral em ratos, que outras cepas analisadas, e, Hanna et al. (2000) encontraram que essa mesma estirpe apresenta maior aderência á células VERO, quando comparado com outros isolados. Mais recentemente, Siqueira et al. (2016) observaram que macrófagos desafiados com leveduras de *P. lutzii*, desenvolveram maior capacidade fungicida que aqueles desafiados com *P. brasiliensis*; e Carvalho et al., 2005, verificaram que camundongos infectados com leveduras de *Pa03* desenvolveram um tipo de PCM mais branda que camundongos infectados com leveduras de *Pb18*. Souza et al. (2019), mostraram que a cepa *Pb18* teve menor quantidade de β -glicana exposta em parede que o isolado *Pb265*, considerada pouco virulenta, o que se associa com um menor reconhecimento por parte de células imunes e portanto com menor resposta imunológica por parte do hospedeiro.

As diferenças observadas *in vivo* e *in vitro* entre espécies de *Paracoccidioides* spp., não foram observadas em estudos clínicos comparativos entre pacientes com PCM (de Macedo et al., 2019; Pereira et al., 2020). De Macedo e colaboradores (2019) após realizarem análises clínicas comparativas entre 14 pacientes infectados com *P. brasiliensis*, e seis infectados com *P. americana* não encontraram diferenças significativas, associadas com a gravidade de manifestações entre pacientes acometidos com *P. americana* e *P. brasiliensis*. Pereira e colaboradores (2020) ao compararem clinicamente 51 pacientes infectados com estirpes do complexo *P. brasiliensis*, 16 infectadas com *P. lutzii*, e 14 com perfil sorológico indeterminado, também não encontraram diferenças significativas; entretanto o número de estudos clínicos é relativamente pequeno e, o número de pacientes estudados acometidos por cada espécie fúngica é heterogêneo, de forma que novas pesquisas com o intuito de estabelecer reais diferenças clínicas, devem ser conduzidas.

As divergências metabólicas e de virulência encontradas entre as espécies de *Paracoccidioides*, alentam pesquisas, para identificar fatores que expliquem essas diferenças, o que auxilia no maior entendimento da relação parasito-hospedeiro. Sendo assim, nosso trabalho consistiu na análise proteômica da parede celular, de duas espécies de *Paracoccidioides* prevalentes no Brasil, *P. americana* e *P. brasiliensis*.

Um dos primeiros achados de nosso trabalho foi a considerável quantidade de proteínas (290 proteínas, 57%) que não foram preditas como secretadas por via convencional, nem por vias não convencionais (tabela 1 suplementar e figura 1 do artigo). A presença de proteínas citoplasmáticas sem sinal de secreção em extratos de parede celular é controversa; algumas hipóteses sugerem que essas proteínas são contaminantes que se fixam em parede após o processo de extração proteica. Sugere-se que o tratamento de células com agentes redutores como o β -mercaptoetanol e DTT, induz o extravasamento do conteúdo celular, com consequente liberação de proteínas citoplasmáticas a parede (Klis et al., 2007), que a seguir podem ser fixadas, por ligações fosfodiéster dos polissacarídeos e dos grupos carboxílicos das proteínas (Sosinska et al., 2009). Além disso, essas proteínas, sem sinal de secreção podem chegar à parede por absorção de proteínas liberadas por células em apoptoses (Satala et al., 2020a). Proteínas sem predição de sinal de secreção também têm sido encontradas em outros estudos de proteoma de parede de

Paracoccidioides spp., (Araujo et al., 2017; Longo et al., 2014). Em nossos resultados proteínas como a Triose fosfate isomerase (C1GI20) e a 14-3-3- proteína 2 (C1GB04), não foram preditas como secretadas por via clássica ou não clássica na análise *in silico*, entretanto, sua localização na parede já foi comprovada por análises microscópicas (da Silva Jde et al., 2013; Pereira et al., 2007); por isso, pesquisas aprofundadas devem ser feitas para estabelecer que proteínas podem ser consideradas realmente como contaminantes em parede.

Outro resultado da nossa análise mostrou a presença no proteoma de ambas às espécies, uma considerável quantidade de proteínas preditas como secretadas por vias não convencionais. Do total das 508 proteínas encontradas, 204 (40%) foram preditas como secretadas por via não convencional, e 14 (2,8%) por via convencional (tabela suplementar 1); resultados semelhantes já foram obtidos em análises prévias de proteoma de parede de *Paracoccidioides* spp., (Araujo et al., 2017; Longo et al. (2014)). Entre as proteínas encontradas, preditas como secretadas por via não clássica estão proteínas ribossomais, fatores de transcrição, proteínas mitocondriais e de resposta ao estresse térmico. Proteínas secretadas transitam através da parede para o exterior celular, e durante esse processo podem ficar aderidas na parede, o que explica sua presença em extratos enriquecidos de proteínas de parede.

Para estabelecer diferenças e similaridades no proteoma de parede de *P. brasiliensis* e *P. americana*, as proteínas foram classificadas (figura 2 do artigo), sendo que 23% e 20% do total das proteínas encontradas no proteoma de *P. americana* e *P. brasiliensis*, respectivamente não puderam ser anotadas. Esse dado é importante, porque indica que muitas proteínas da parede ainda apresentam função desconhecida; entre essas proteínas podemos destacar a C1G9H8 e a C1G3V2 (tabela suplementar 1, do artigo), preditas como secretadas por via convencional. Por outro lado, e embora a análise funcional não tenha evidenciado o enriquecimento de uma categoria funcional específica, proteínas associadas com produção energética e metabolismo foram as mais representativas (Figura. 2, do artigo); proteínas destas categorias também foram consideravelmente mais expressas em outros estudos proteômicos de parede de *Paracoccidioides* spp., (Araujo et al., 2017; Longo et al., 2014).

Foi realizada uma análise quantitativa de expressão, com o intuito de identificar proteínas que foram diferencialmente expressas na parede de ambas as espécies. Essa análise revelou a maior expressão em parede de *P. brasiliensis* de proteínas relacionadas com aderência, principalmente a ENO, GAPDH e duas proteínas da família 14-3-3 (tabela 1 e figura 4 do artigo). Concordante com nossos resultados, a enolase e a GAPDH, também foram induzidas no proteoma celular de *P. brasiliensis* no estudo de Pigosso et al. (2013), onde foram comparados os proteomas de quatro espécies de *Paracoccidioides*, *P. lutzii*, *P. brasiliensis*, *P. americana* e *P. restrepiensis*. Esses resultados podem sugerir que a maior regulação intracelular destas proteínas em *P. brasiliensis* possibilita um maior fluxo das mesmas ao meio extracelular. Quando localizadas em parede estas proteínas teriam função associada à aderência, o que pode ser corroborado por dados que indicam maior capacidade de adesão de *P. brasiliensis* (de Oliveira et al., 2015), os autores descreveram que leveduras de *P. brasiliensis* apresentam maior taxa de adesão a pneumócitos do que *P. lutzii*. Outra proteína associada com adesão encontrada em maior quantidade na parede de *P. brasiliensis* foi a FBP; em *P. lutzii* já foi demonstrada a capacidade da FBP para ligar e ativar o plasminogênio (Chaves et al., 2015). O plasminogênio é uma enzima com propriedades fibrinolíticas, que em sua forma ativa, a plasmina, degrada a fibrina, o que consequentemente contribui com a dispersão e virulência do fungo, sendo uma das estratégias usadas por microrganismos para a invasão de tecidos. (Bhattacharya et al., 2012). Outra proteína associada com a ativação de plasminogênio em bactérias e em *C. albicans* é a PGK (Boone et al., 2011; Crowe et al., 2003; Fulde et al., 2014), e embora ainda seu papel na ativação de plasminogênio em *Paracoccidioides* spp., não tenha sido demonstrado, já foi comprovado que se liga à plasminogênio *P. lutzii* (Chaves et al., 2015); essa proteína foi consideravelmente mais expressa em *P. brasiliensis*, e já foi recuperada previamente em outros estudos de proteoma de parede e secretoma de *Paracoccidioides* spp., (Araujo et al., 2017; Longo et al., 2014; Vallejo et al., 2012). Outras duas proteínas associadas com aderência, mas que não pertencem a enzimas da via glicolítica que foram induzidas em *P. brasiliensis*, são as proteínas 14-3-3-proteína 2 e a 14-3-3-épsilon (tabela 1 e figura 3 do artigo). Proteínas desta classe já se mostraram fundamentais no processo de infecção; Scorzoni et al. (2021) mostraram que peptídeos da proteína 14-3-3-épsilon foram eficazes na indução da imunidade em *Galleria mellonella*, sendo capazes de retardar a

morte de larvas infectadas com *P. brasiliensis* e *P. lutzii*; e, Marcos et al. (2019) mostraram diminuição significativa da virulência fúngica de uma estirpe mutante para a proteína 14-3-3 num ensaio de infecção *in vivo*.

Também na análise quantitativa de expressão observou-se a maior expressão de proteínas associadas á resposta ao choque térmico em *P. brasiliensis*; especificamente a Hsp90 co-chaperone AHA1 (activator of Hsp90 ATPase) que foi 55 vezes mais expressa em *P. brasiliensis* e a Hsp STI1, encontrada unicamente no proteoma de parede de *P. brasiliensis* em alta concentração (tabela suplementar 1 e tabela 2 do artigo). Esse dado é relevante visto que já foi descrito maior resistência de *P. brasiliensis* a temperaturas superiores de 37 °C, quando comparado á espécie *P. americana* (Pigosso et al., 2013).

Em nosso trabalho, proteínas de resposta ao estresse oxidativo também foram diferencialmente expressas; catalase P, enzima que converte o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, e principal enzima antioxidante do peroxissoma, foi mais expressa em *P. americana* em comparação á *P. brasiliensis*, esses dados são consistentes com os resultados mostrados por Pigosso et al. (2013) e com o trabalho do Portis (2019) (dados ainda não publicados), que mostraram que a catalase peroxisomal foi mais abundante no proteoma celular de *P. americana* que em *P. brasiliensis*; adicionalmente, esta proteína já foi recuperada em estudos de proteoma de parede e de secretoma de *Paracoccidioides* spp., (Longo et al., 2014; Weber et al., 2012), e em *C. albicans* foi identificada como proteína ligante de plasminogênio (Crowe et al., 2003). Citocromo c peroxidase, mitocondrial (C1G7K8), foi a proteína de destoxificação mais abundante em *P. brasiliensis*, essa proteína foi regulada positivamente em *P. brasiliensis* durante a interação com macrófagos, e seu silenciamento atenuou a virulência fúngica (Parente-Rocha et al., 2015).

Como mostrado, nossos dados suportam a hipótese de que *P. brasiliensis* é mais virulenta que *P. americana*, em vista que possui maior presença na parede de proteínas associadas com a adesão as componentes da matriz extracelular, proteínas associadas á ativação de plasminogênio e de resposta ao choque térmico.

6. CONCLUSÕES/RECOMENDAÇÕES FINAIS

O estudo do proteoma de parede é de grande importância, devido à ausência dessa estrutura em células humanas além de ser a organela celular que se encontra na interface entre o fungo e hospedeiro. Componentes de parede como quitina e glicanas são inexistentes no hospedeiro, e a identificação e caracterização de proteínas que façam parte da síntese, degradação e remodelação desses componentes, assim como proteínas necessárias para a virulência e patogêneses é relevante, uma vez que essas proteínas se convertem em alvo farmacológico para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas. Assim mesmo, desvendar a composição proteica da parede, ajuda a elucidar aspectos da relação parasito-hospedeiro.

No presente trabalho foi descrito o proteoma de parede de duas das espécies de *Paracoccidioides* mais encontradas no Brasil, *P. americana* e *P. brasiliensis*. As principais conclusões deste trabalho são:

- **Ao redor de 40% das proteínas da parede de ambas às espécies foram preditas como secretadas por rotas não convencionais de secreção e, cerca de 3% das proteínas em ambas às espécies foram preditas como secretadas por rota clássica de secreção.**
- **Ao redor de 25% das proteínas encontradas na parede, de ambas às espécies, não conseguiram ser anotadas, pelo que sua função é ainda desconhecida.**
- ***P. brasiliensis* apresentou número maior de proteínas induzidas em parede, associadas com adesão á componentes da matriz extracelular e plasminogênio.**
- ***P. brasiliensis* apresentou número maior de proteínas induzidas em parede, associadas com resposta ao choque térmico.**
- **A citocromo C oxidase mitocondrial e a catalase P foram as principais proteínas associadas à resposta ao estresse oxidativo encontradas como reguladas positivamente em *P. brasiliensis* e *P americana*, respectivamente.**

7. PERSPECTIVAS

- Avaliar e comparar a atividade fibrinolítica entre essas duas espécies de *Paracoccidioides*, visto a detecção de proteínas associadas à ligação e ativação de plasminogênio diferencialmente reguladas entre as duas espécies.
- Avaliar o papel da Catalase P em parede, bem como a sua possível ação de adesão á componentes da matriz extracelular.

7. BIBLIOGRAFIA

- Almagro Armenteros, J.J., K.D. Tsirigos, C.K. Sønderby, T.N. Petersen, O. Winther, S. Brunak, G. von Heijne, and H. Nielsen. 2019. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nature Biotechnology*. 37:420-423.
- Amarante-Mendes, G.P., S. Adjemian, L.M. Branco, L.C. Zanetti, R. Weinlich, and K.R. Bortoluci. 2018. Pattern Recognition Receptors and the Host Cell Death Molecular Machinery. *Frontiers in Immunology*. 9.
- Andreotti, P.F., J.L. Monteiro da Silva, A.M. Bailão, C.M.d.A. Soares, G. Benard, C.P. Soares, and M.J.S. Mendes-Giannini. 2005. Isolation and partial characterization of a 30 kDa adhesin from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes and infection*. 7:875-881.
- Araujo, D.S., P. de Sousa Lima, L.C. Baeza, A.F.A. Parente, A. Melo Bailao, C.L. Borges, and C.M. de Almeida Soares. 2017. Employing proteomic analysis to compare *Paracoccidioides lutzii* yeast and mycelium cell wall proteins. *Biochimica et biophysica acta*. 1865:1304-1314.
- Augusto, P.L., B.S. Nair, B.M. Santiago, D.S.J.L. M., F.M.S. S., D.S.J. Martins, M.G.M.J. S., and D.A.S.C. Maria. 2007. Analysis of the *Paracoccidioides brasiliensis* triosephosphate isomerase suggests the potential for adhesin function. *FEMS yeast research*. 7:1381-1388.
- Bagagli, E., S.M. Bosco, R.C. Theodoro, and M. Franco. 2006. Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 6:344-351.
- Barbosa, M.S., S.N. Bao, P.F. Andreotti, F.P. de Faria, M.S. Felipe, L. dos Santos Feitosa, M.J. Mendes-Giannini, and C.M. Soares. 2006. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. *Infection and immunity*. 74:382-389.
- Bendtsen, J.D., L.J. Jensen, N. Blom, G. Von Heijne, and S. Brunak. 2004. Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. *Protein engineering, design & selection : PEDS*. 17:349-356.
- Bhattacharya, S., V.A. Ploplis, and F.J. Castellino. 2012. Bacterial Plasminogen Receptors Utilize Host Plasminogen System for Effective Invasion and Dissemination. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2012:482096.
- Bocca, A.L., A.C. Amaral, M.M. Teixeira, P.K. Sato, M.A. Shikanai-Yasuda, and M.S. Soares Felipe. 2013. Paracoccidioidomycosis: eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. *Future microbiology*. 8:1177-1191.
- Bonfim, S.M.R.C., A.H.S. Cruz, R.S.A. Jesuino, C.J. Ulhoa, E.E.W.I. Molinari-Madlum, C.M.A. Soares, and M. Pereira. 2006. Chitinase from *Paracoccidioides brasiliensis*: molecular cloning, structural, phylogenetic, expression and activity analysis. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 46:269-283.

- Boone, T.J., C.A. Burnham, and G.J. Tyrrell. 2011. Binding of group B streptococcal phosphoglycerate kinase to plasminogen and actin. *Microbial pathogenesis*. 51:255-261.
- Borges, C.L., J.A. Parente, M.S. Barbosa, J.M. Santana, S.N. Bao, M.V.D. Sousa, and C.M.D.A. Soares. 2010. Detection of a homotetrameric structure and protein–protein interactions of *Paracoccidioides brasiliensis* formamidase lead to new functional insights. *FEMS yeast research*. 10:104-113.
- Bowman, S.M., and S.J. Free. 2006. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 28:799-808.
- Cabib, E. 2009. Two novel techniques for determination of polysaccharide cross-links show that Crh1p and Crh2p attach chitin to both beta(1-6)- and beta(1-3)glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Eukaryotic cell*. 8:1626-1636.
- Camacho, E., V.E. Sepulveda, W.E. Goldman, G. San-Blas, and G.A. Nino-Vega. 2012. Expression of *Paracoccidioides brasiliensis* AMY1 in a *Histoplasma capsulatum* amy1 mutant, relates an alpha-(1,4)-amylase to cell wall alpha-(1,3)-glucan synthesis. *PloS one*. 7:e50201.
- Caminero, A., E. Calvo, E. Valentın, J. Ruiz-Herrera, J.A. López, and R. Sentandreu. 2014. Identification of *Candida albicans* wall mannoproteins covalently linked by disulphide and/or alkali-sensitive bridges. *Yeast*. 31:137-144.
- Carbonell, L.M. 1967. Cell wall changes during the budding process of *Paracoccidioides brasiliensis* and *Blastomyces dermatitidis*. *Journal of Bacteriology*. 94:213-223.
- Carbonell, L.M., F. Kanetsuna, and F. Gil. 1970. Chemical morphology of glucan and chitin in the cell wall of the yeast phase of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal of Bacteriology*. 101:636-642.
- Carbonell, L.M., and J. Rodriguez. 1968. Mycelial phase of *Paracoccidioides brasiliensis* and *Blastomyces dermatitidis*: an electron microscope study. *Journal of bacteriology*. 96:533-543.
- Castillo, L., E. Calvo, A.I. Martínez, J. Ruiz-Herrera, E. Valentın, J.A. Lopez, and R. Sentandreu. 2008. A study of the *Candida albicans* cell wall proteome. *Proteomics*. 8:3871-3881.
- Castro, N.d.S., M.S. Barbosa, Z.A. Maia, S.N. Bao, M.S.S. Felipe, J.M. Santana, M.J.S. Mendes-Giannini, M. Pereira, and C.M.d.A. Soares. 2008. Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* PbDfg5p, a cell-wall protein implicated in filamentous growth. *Yeast*. 25:141-154.
- Castro, N.d.S., K.P.D. Castro, I. Orlandi, L.d.S. Feitosa, L.K.R.e. Silva, M.H. Vainstein, S.N. Bao, M. Vai, and C.M.D.A. Soares. 2009. Characterization and functional analysis of the beta-1,3-glucanosyltransferase 3 of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *FEMS yeast research*. 9:103-114.
- Castro, N.d.S., Z.A. Maia, M. Pereira, and C.M.d.A. Soares. 2005. Screening for glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome. *Genetics and molecular research : GMR*. 4:326-345.
- Champer, J., J.I. Ito, K.V. Clemons, D.A. Stevens, and M. Kalkum. 2016. Proteomic Analysis of Pathogenic Fungi Reveals Highly Expressed Conserved Cell Wall Proteins. *Journal of fungi*. 2.

- Chatterjee, S., and U. Tatu. 2017. Heat shock protein 90 localizes to the surface and augments virulence factors of *Cryptococcus neoformans*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 11:e0005836.
- Chaves, E.G., S.S. Weber, S.N. Bao, L.A. Pereira, A.M. Bailao, C.L. Borges, and C.M. Soares. 2015. Analysis of *Paracoccidioides* secreted proteins reveals fructose 1,6-bisphosphate aldolase as a plasminogen-binding protein. *BMC microbiology*. 15:53.
- Crowe, J.D., I.K. Sievwright, G.C. Auld, N.R. Moore, N.A.R. Gow, and N.A. Booth. 2003. *Candida albicans* binds human plasminogen: identification of eight plasminogen-binding proteins. *Molecular microbiology*. 47:1637-1651.
- da Silva Jde, F., H.C. de Oliveira, C.M. Marcos, R.A. da Silva, T.A. da Costa, V.L. Calich, A.M. Almeida, and M.J. Mendes-Giannini. 2013. *Paracoccidioides brasiliensis* 30 kDa adhesin: identification as a 14-3-3 protein, cloning and subcellular localization in infection models. *PloS one*. 8:e62533.
- da Silva Neto, B.R., J. de Fatima da Silva, M.J. Mendes-Giannini, H.L. Lenzi, C.M. de Almeida Soares, and M. Pereira. 2009. The malate synthase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a linked surface protein that behaves as an anchorless adhesin. *BMC microbiology*. 9:272.
- de Assis Tacco, B.A.C., J.A. Parente, M. Santiago Barbosa, S.N. Bao, T. de Souza Goes, M. Pereira, and C.M. de Almeida Soares. 2009. Characterization of a secreted aspartyl protease of the fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*. *Medical mycology*. 47:845-854.
- De Bernardis, F., F.A. Muhlschlegel, A. Cassone, and W.A. Fonzi. 1998. The pH of the host niche controls gene expression in and virulence of *Candida albicans*. *Infection and immunity*. 66:3317-3325.
- de Farias, M.R., L.A. Condas, M.G. Ribeiro, M. Bosco Sde, M.D. Muro, J. Werner, R.C. Theodoro, E. Bagagli, S.A. Marques, and M. Franco. 2011. Paracoccidioidomycosis in a dog: case report of generalized lymphadenomegaly. *Mycopathologia*. 172:147-152.
- de Groot, P.W.J., A.D. de Boer, J. Cunningham, H.L. Dekker, L. de Jong, K.J. Hellingwerf, C. de Koster, and F.M. Klis. 2004. Proteomic analysis of *Candida albicans* cell walls reveals covalently bound carbohydrate-active enzymes and adhesins. *Eukaryotic cell*. 3:955-965.
- de Macedo, P.M., M.d.M. Teixeira, B.M. Barker, R.M. Zancope-Oliveira, R. Almeida-Paes, and A.C. Francesconi do Valle. 2019. Clinical features and genetic background of the sympatric species *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides americana*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 13:e0007309.
- de Oliveira, H.C., F. da Silva Jde, L. Scorzoni, C.M. Marcos, S.A. Rossi, E.S.A.C. de Paula, P.A. Assato, R.A. da Silva, A.M. Fusco-Almeida, and M.J. Mendes-Giannini. 2015. Importance of adhesins in virulence of *Paracoccidioides* spp. *Frontiers in microbiology*. 6:303.
- Desjardins, C.A., M.D. Champion, J.W. Holder, A. Muszewska, J. Goldberg, A.M. Bailao, M.M. Brigido, M.E. Ferreira, A.M. Garcia, M. Grynberg, S. Gujja, D.I. Heiman, M.R. Henn, C.D. Kodira, H. Leon-Narvaez, L.V. Longo, L.J. Ma, I. Malavazi, A.L. Matsuo, F.V. Morais, M. Pereira, S. Rodriguez-Brito, S. Sakthikumar, S.M. Salem-Izacc, S.M. Sykes, M.M. Teixeira, M.C. Vallejo, M.E. Walter, C. Yandava, S. Young, Q. Zeng, J. Zucker, M.S. Felipe, G.H. Goldman, B.J. Haas, J.G. McEwen, G. Nino-Vega, R. Puccia, G. San-Blas, C.M. Soares, B.W. Birren, and C.A. Cuomo.

2011. Comparative genomic analysis of human fungal pathogens causing paracoccidioidomycosis. *PLoS genetics*. 7:e1002345.
- Donofrio, F.C., A.C.A. Calil, E.T. Miranda, A.M.F. Almeida, G. Benard, C.P. Soares, S.N. Veloso, C.M.d.A. Soares, and M.J.S. Mendes Giannini. 2009. Enolase from *Paracoccidioides brasiliensis*: isolation and identification as a fibronectin-binding protein. *Journal of Medical Microbiology*. 58:706-713.
- Ecker, M., R. Deutzmann, L. Lehle, V. Mersa, and W. Tanner. 2006. Pir proteins of *Saccharomyces cerevisiae* are attached to beta-1,3-glucan by a new protein-carbohydrate linkage. *The Journal of biological chemistry*. 281:11523-11529.
- Edge, A.S.B. 2003. Deglycosylation of glycoproteins with trifluoromethanesulphonic acid: elucidation of molecular structure and function. *The Biochemical journal*. 376:339-350.
- Fanos, V., and L. Cataldi. 2000. Amphotericin B-induced nephrotoxicity: a review. *Journal of chemotherapy*. 12:463-470.
- Feiz, L., M. Irshad, R.F. Pont-Lezica, H. Canut, and E. Jamet. 2006. Evaluation of cell wall preparations for proteomics: a new procedure for purifying cell walls from *Arabidopsis hypocotyls*. *Plant methods*. 2:10-10.
- Fortes, M.R., H.A. Miot, C.S. Kurokawa, M.E. Marques, and S.A. Marques. 2011. Immunology of paracoccidioidomycosis. *Anais brasileiros de dermatologia*. 86:516-524.
- Franco, M., E. Bagagli, S. Scapolio, and C. da Silva Lacaz. 2000. A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. *Medical mycology*. 38:185-191.
- Fulde, M., N. Bernardo-Garcia, M. Rohde, N. Nachtigall, R. Frank, K.T. Preissner, J. Klett, A. Morreale, G.S. Chhatwal, J.A. Hermoso, and S. Bergmann. 2014. Pneumococcal phosphoglycerate kinase interacts with plasminogen and its tissue activator. *Thromb Haemost*. 111:401-416.
- Gil-Bona, A., A. Amador-García, C. Gil, and L. Monteoliva. 2018. The external face of *Candida albicans*: A proteomic view of the cell surface and the extracellular environment. *Journal of Proteomics*. 180:70-79.
- Gil-Bona, A., C.M. Parra-Giraldo, M.L. Hernández, J.A. Reales-Calderon, N.V. Solis, S.G. Filler, L. Monteoliva, and C. Gil. 2015. *Candida albicans* cell shaving uncovers new proteins involved in cell wall integrity, yeast to hypha transition, stress response and host-pathogen interaction. *Journal of Proteomics*. 127:340-351.
- Giusiano, G. 2021. The Trojan Horse Model in *Paracoccidioides*: A Fantastic Pathway to Survive Infecting Human Cells. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 10.
- Gonçalves, R.A., A.L. Salamanca, L.R. Júnior, K.S.e. Silva, E.J.d. Vasconcelos, T.F.d. Reis, R.C. Castro, P.d.C. Ruy, B. Romagnoli, J. Ruiz, M. Pereira, C.M.d.A. Soares, and P.S. Coelho. 2021. In silico identification of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Paracoccidioides* spp. *Future microbiology*. 16:589-606.
- Gow, N.A.R., J.-P. Latge, and C.A. Munro. 2017. The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. *Microbiology Spectrum*. 5.
- Gupta, R., and S. Brunak. 2002. Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. *Pacific Symposium on Biocomputing. Pacific Symposium on Biocomputing*:310-322.

- Hanna, S.A., J.L. Monteiro da Silva, and M.J. Giannini. 2000. Adherence and intracellular parasitism of *Paracoccidioides brasiliensis* in Vero cells. *Microbes and infection*. 2:877-884.
- Hernández, M.L., P. Ximénez-Embún, M. Martínez-Gomariz, M.D. Gutiérrez-Blázquez, C. Nombela, and C. Gil. 2010. Identification of *Candida albicans* exposed surface proteins in vivo by a rapid proteomic approach. *J Proteomics*. 73:1404-1409.
- Herrera, J.R. 2012. Fungal Cell Wall, structure, synthesis and assembly, Irapuato, Mexico. 175 pp.
- Hopke, A., A.J.P. Brown, R.A. Hall, and R.T. Wheeler. 2018. Dynamic Fungal Cell Wall Architecture in Stress Adaptation and Immune Evasion. *Trends in microbiology*. 26:284-295.
- Jong, A.Y., S.H.M. Chen, M.F. Stins, K.S. Kim, T.L. Tuan, and S.H. Huang. 2003. Binding of *Candida albicans* enolase to plasmin(ogen) results in enhanced invasion of human brain microvascular endothelial cells. *J Med Microbiol*. 52:615-622.
- Kanetsuna, F., L.M. Carbonell, I. Azuma, and Y. Yamamura. 1972. Biochemical studies on the thermal dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol*. 110:208-218.
- Kanetsuna, F., L.M. Carbonell, R.E. Moreno, and J. Rodriguez. 1969. Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol*. 97:1036-1041.
- Karkowska-Kuleta, J., and A. Kozik. 2015. Cell wall proteome of pathogenic fungi. *Acta biochimica Polonica*. 62:339-351.
- Karkowska-Kuleta, J., D. Satala, O. Bochenska, M. Rapala-Kozik, and A. Kozik. 2019. Moonlighting proteins are variably exposed at the cell surfaces of *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* under certain growth conditions. *BMC microbiology*. 19:149.
- Klis, F.M., M. de Jong, S. Brul, and P.W.J. de Groot. 2007. Extraction of cell surface-associated proteins from living yeast cells. *Yeast*. 24:253-258.
- Klis, F.M., C.G. de Koster, and S. Brul. 2011. A mass spectrometric view of the fungal wall proteome. *Future microbiology*. 6:941-951.
- Komath, S.S., S.L. Singh, V.A. Pratyusha, and S.K. Sah. 2018. Generating anchors only to lose them: The unusual story of glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis and remodeling in yeast and fungi. *IUBMB Life*. 70:355-383.
- Kozik, A., J. Karkowska-Kuleta, D. Zajac, O. Bochenska, S. Kedracka-Krok, U. Jankowska, and M. Rapala-Kozik. 2015. Fibronectin-, vitronectin- and laminin-binding proteins at the cell walls of *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* pathogenic yeasts. *BMC microbiology*. 15:197.
- Lamoth, F., P.R. Juvvadi, J.R. Fortwendel, and W.J. Steinbach. 2012. Heat shock protein 90 is required for conidiation and cell wall integrity in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic cell*. 11:1324-1332.
- Lima, P.d.S., E.F.L.C. Bailão, M.G. Silva, N.d.s. Castro, S.N. Bão, I. Orlandi, M. Vai, and C.M.d.A. Soares. 2012. Characterization of the *Paracoccidioides* beta-1,3-glucanosyltransferase family. *FEMS yeast research*. 12:685-702.
- Longo, L.V.G., J.P.C.d. Cunha, T.J.P. Sobreira, and R. Puccia. 2014. Proteome of cell wall-extracts from pathogenic *Paracoccidioides brasiliensis*: Comparison among morphological phases, isolates, and reported fungal extracellular vesicle proteins. *EuPA Open Proteomics*. 3:216-228.

- Loose, D.S., E.P. Stover, A. Restrepo, D.A. Stevens, and D. Feldman. 1983. Estradiol binds to a receptor-like cytosol binding protein and initiates a biological response in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 80:7659-7663.
- Maddi, A., S.M. Bowman, and S.J. Free. 2009. Trifluoromethanesulfonic acid-based proteomic analysis of cell wall and secreted proteins of the ascomycetous fungi *Neurospora crassa* and *Candida albicans*. *Fungal Genetics and Biology*. 46:768-781.
- Marcos, C.M., H.C. de Oliveira, P.A. Assato, C.R. de Andrade, A.M. Fusco-Almeida, and M.J.S. Mendes-Giannini. 2019. *Paracoccidioides brasiliensis* 14-3-3 protein is important for virulence in a murine model. *Medical mycology*. 57:900-904.
- Marion, C.L., C.A. Rappleye, J.T. Engle, and W.E. Goldman. 2006. An alpha-(1,4)-amylase is essential for alpha-(1,3)-glucan production and virulence in *Histoplasma capsulatum*. *Molecular microbiology*. 62:970-983.
- Matute, D.R., J.G. McEwen, R. Puccia, B.A. Montes, G. San-Blas, E. Bagagli, J.T. Rauscher, A. Restrepo, F. Morais, G. Nino-Vega, and J.W. Taylor. 2006. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Molecular biology and evolution*. 23:65-73.
- Mavengere, H., K. Mattox, M.M. Teixeira, V.E. Sepúlveda, O.M. Gomez, O. Hernandez, J. McEwen, and D.R. Matute. 2020. *Paracoccidioides* Genomes Reflect High Levels of Species Divergence and Little Interspecific Gene Flow. *mBio*. 11:e01999-01920.
- Mendes-Giannini, M.J.S., P.F. Andreotti, L.R. Vincenzi, J.L. Monteiro da Silva, H.L. Lenzi, G. Benard, R. Zancopé-Oliveira, H.L. de Matos Guedes, and C.P. Soares. 2006. Binding of extracellular matrix proteins to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes and infection*. 8:1550-1559.
- Mendes, J.F., G.B. Klafke, A.P.N. Albano, L. Cabana Â, A.J. Teles, Z.P. de Camargo, M.O. Xavier, and M.C.A. Meireles. 2017. Paracoccidioidomycosis infection in domestic and wild mammals by *Paracoccidioides lutzii*. *Mycoses*. 60:402-406.
- Miyazawa, K., and K. Abe. 2016. Cell wall structure and biogenesis in *Aspergillus species* AU - Yoshimi, Akira. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 80:1700-1711.
- Mouyna, I., W. Morelle, M. Vai, M. Monod, B. Lechenne, T. Fontaine, A. Beauvais, J. Sarfati, M.C. Prevost, C. Henry, and J.P. Latge. 2005. Deletion of GEL2 encoding for a beta(1-3)glucanosyltransferase affects morphogenesis and virulence in *Aspergillus fumigatus*. *Molecular microbiology*. 56:1675-1688.
- Muszevska, A., S. Piłsyk, U. Perlińska-Lenart, and J.S. Kruszevska. 2018. Diversity of Cell Wall Related Proteins in Human Pathogenic Fungi. *Journal of fungi*. 4:6.
- Nickel, W., and C. Rabouille. 2009. Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 10:148-155.
- Nimrichter, L., M.M. de Souza, M. Del Poeta, J.D. Nosanchuk, L. Joffe, M. Tavares Pde, and M.L. Rodrigues. 2016. Extracellular Vesicle-Associated Transitory Cell Wall Components and Their Impact on the Interaction of Fungi with Host Cells. *Frontiers in microbiology*. 7:1034.
- Nogueira, S.V., F.L. Fonseca, M.L. Rodrigues, V. Mundodi, E.A. Abi-Chacra, M.S. Winters, J.F. Alderete, and C.M. de Almeida Soares. 2010. *Paracoccidioides brasiliensis* enolase is a surface protein that binds plasminogen and mediates interaction of yeast forms with host cells. *Infection and immunity*. 78:4040-4050.

- Pardini, G., P.W. De Groot, A.T. Coste, M. Karababa, F.M. Klis, C.G. de Koster, and D. Sanglard. 2006. The CRH family coding for cell wall glycosylphosphatidylinositol proteins with a predicted transglycosidase domain affects cell wall organization and virulence of *Candida albicans*. *The Journal of biological chemistry*. 281:40399-40411.
- Parente-Rocha, J.A., A.F. Parente, L.C. Baeza, S.M. Bonfim, O. Hernandez, J.G. McEwen, A.M. Bailao, C.P. Taborda, C.L. Borges, and C.M. Soares. 2015. Macrophage Interaction with *Paracoccidioides brasiliensis* Yeast Cells Modulates Fungal Metabolism and Generates a Response to Oxidative Stress. *PloS one*. 10:e0137619.
- Paulick, M.G., and C.R. Bertozzi. 2008. The glycosylphosphatidylinositol anchor: a complex membrane-anchoring structure for proteins. *Biochemistry*. 47:6991-7000.
- Pereira, E.F., G. Gegembauer, M.R. Chang, Z.P.d. Camargo, T.F. Nunes, S.M. Ribeiro, L.R.d. Carvalho, B.M. Maldonado, R.P. Mendes, and A.M.M. Paniago. 2020. Comparison of clinico-epidemiological and radiological features in paracoccidioidomycosis patients regarding serological classification using antigens from *Paracoccidioides brasiliensis* complex and *Paracoccidioides lutzii*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 14:e0008485.
- Pereira, L.A., S.N. Bão, M.S. Barbosa, J.L. da Silva, M.S. Felipe, J.M. de Santana, M.J. Mendes-Giannini, and C.M. de Almeida Soares. 2007. Analysis of the *Paracoccidioides brasiliensis* triosephosphate isomerase suggests the potential for adhesin function. *FEMS yeast research*. 7:1381-1388.
- Pereira, M., M.S. Felipe, M.M. Brigido, C.M. Soares, and M.O. Azevedo. 2000. Molecular cloning and characterization of a glucan synthase gene from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Yeast*. 16:451-462.
- Pigosso, L.L., L.C. Baeza, M.V. Tomazett, M.B.R. Faleiro, V.M.B.D.d. Moura, A.M. Bailão, C.L. Borges, J.A.P. Rocha, G.R. Fernandes, G.M. Gauthier, and C.M.d.A. Soares. 2017. *Paracoccidioides brasiliensis* presents metabolic reprogramming and secretes a serine proteinase during murine infection. *Virulence*. 8:1417-1434.
- Pigosso, L.L., A.F. Parente, A.S. Coelho, L.P. Silva, C.L. Borges, A.M. Bailao, and C.M. Soares. 2013. Comparative proteomics in the genus *Paracoccidioides*. *Fungal genetics and biology : FG & B*. 60:87-100.
- Pinzan, C.F., L.P. Ruas, A.S. Casabona-Fortunato, F.C. Carvalho, and M.-C. Roque-Barreira. 2010. Immunological Basis for the Gender Differences in Murine *Paracoccidioides brasiliensis* Infection. *PloS one*. 5:e10757.
- Pitarch, A., C. Nombela, and C. Gil. 2008. Cell wall fractionation for yeast and fungal proteomics. *Methods in molecular biology*. 425:217-239.
- Popolo, L., G. Degani, C. Camilloni, and W.A. Fonzi. 2017. The PHR Family: The Role of Extracellular Transglycosylases in Shaping *Candida albicans* Cells. *Journal of fungi*. 3.
- Portis, I.G. 2019. Análise proteômica de espécies de *Paracoccidioides*. In Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Goiás.
- Ramírez-Quijas, M.D., E. López-Romero, and M. Cuéllar-Cruz. 2015. Proteomic analysis of cell wall in four pathogenic species of *Candida* exposed to oxidative stress. *Microbial pathogenesis*. 87:1-12.
- Reyna-Beltran, E., M. Iranzo, K.G. Calderon-Gonzalez, R. Mondragon-Flores, M.L. Labra-Barrios, S. Mormeneo, and J.P. Luna-Arias. 2018. The *Candida albicans* ENO1

- gene encodes a transglutaminase involved in growth, cell division, morphogenesis, and osmotic protection. *The Journal of biological chemistry*. 293:4304-4323.
- Rocha, M.C., K. Minari, J. Fabri, J.D. Kerkaert, L.M. Gava, A.F. da Cunha, R.A. Cramer, J.C. Borges, and I. Malavazi. 2021. *Aspergillus fumigatus* Hsp90 interacts with the main components of the cell wall integrity pathway and cooperates in heat shock and cell wall stress adaptation. *Cellular microbiology*. 23:e13273.
- Rodrigues, M.L., J.D. Nosanchuk, A. Schrank, M.H. Vainstein, A. Casadevall, and L. Nimrichter. 2011. Vesicular transport systems in fungi. *Future microbiology*. 6:1371-1381.
- Ruiz-Herrera, J., and L. Ortiz-Castellanos. 2019. Cell wall glucans of fungi. A review. *The Cell Surface*. 5:100022.
- Salgado-Salazar, C., L.R. Jones, Á. Restrepo, and J.G. McEwen. 2010. The human fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* (Onygenales: Ajellomycetaceae) is a complex of two species: phylogenetic evidence from five mitochondrial markers. *Cladistics*. 26:613-624.
- Santana, L.A.d.P., M.H. Vainstein, P.K. Tomazett, L.K. Santos-Silva, A.M. Góes, A. Schrank, C.M.d.A. Soares, and M. Pereira. 2012. Distinct chitinases are expressed during various growth phases of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 107:310-316.
- Satala, D., and J. Karkowska-Kuleta. 2020a. Moonlighting Proteins at the *Candida* Cell Surface. 8.
- Satala, D., G. Satala, J. Karkowska-Kuleta, M. Bukowski, A. Kluza, M. Rapala-Kozik, and A. Kozik. 2020b. Structural Insights into the Interactions of *Candida* Enolase with Human Vitronectin, Fibronectin and Plasminogen. *International journal of molecular sciences*. 21.
- Scorzoni, L., and E.S.A.C. Alves de Paula. 2021. In Vitro and In Vivo Effect of Peptides Derived from 14-3-3 *Paracoccidioides* spp. Protein. 7.
- Shankar, J., A. Restrepo, K.V. Clemons, and D.A. Stevens. 2011. Hormones and the resistance of women to paracoccidioidomycosis. *Clinical microbiology reviews*. 24:296-313.
- Shikanai-Yasuda, M.A., R.P. Mendes, A.L. Colombo, F.Q. Telles, A. Kono, A.M.M. Paniago, A. Nathan, A. Valle, E. Bagagli, G. Benard, M.S. Ferreira, M.M. Teixeira, M.L.S. Vergara, R.M. Pereira, R.S. Cavalcante, R. Hahn, R.R. Durlacher, Z. Khoury, Z.P. Camargo, M.L. Moretti, and R. Martinez. 2018. [Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis]. *Epidemiologia e serviços de saúde : revista do Sistema Unico de Saúde do Brasil*. 27:e0500001.
- Singer-Vermes, L.M., E. Burger, M.F. Franco, M.M. Di-Bacchi, M.J. Mendes-Giannini, and V.L. Calich. 1989. Evaluation of the pathogenicity and immunogenicity of seven *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in susceptible inbred mice. *Journal of medical and veterinary mycology : bi-monthly publication of the International Society for Human and Animal Mycology*. 27:71-82.
- Siqueira, I.M., C.L. Fraga, A.C. Amaral, A.C. Souza, M.S. Jeronimo, J.R. Correa, K.G. Magalhaes, C.A. Inacio, A.M. Ribeiro, P.H. Burguel, M.S. Felipe, A.H. Tavares, and A.L. Bocca. 2016. Distinct patterns of yeast cell morphology and host responses induced by representative strains of *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18) and *Paracoccidioides lutzii* (Pb01). *Medical mycology*. 54:177-188.

- Sorais, F., L. Barreto, J.A. Leal, M. Bernabe, G. San-Blas, and G.A. Nino-Vega. 2010. Cell wall glucan synthases and GTPases in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Medical mycology*. 48:35-47.
- Sosinska, G.J., P.W.J. de Groot, S. Brul, and F.M. Klis. 2009. Covalently linked cell wall proteins of *Candida albicans* and their role in fitness and virulence. *FEMS yeast research*. 9:1013-1028.
- Souza, A.C.O., C. Favali, N.C. Soares, N.M. Tavares, M.S. Jerônimo, P.H. Veloso Junior, C.L. Marina, C. Santos, C. Brodskyn, and A.L. Bocca. 2019. New Role of *P. brasiliensis* α -Glucan: Differentiation of Non-conventional Dendritic Cells. *Frontiers in microbiology*. 10.
- Steentoft, C., S.Y. Vakhrushev, H.J. Joshi, Y. Kong, M.B. Vester-Christensen, K.T. Schjoldager, K. Lavrsen, S. Dabelsteen, N.B. Pedersen, L. Marcos-Silva, R. Gupta, E.P. Bennett, U. Mandel, S. Brunak, H.H. Wandall, S.B. Levery, and H. Clausen. 2013. Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through Simple Cell technology. *The EMBO journal*. 32:1478-1488.
- Teixeira, M.M., R.C. Theodoro, M.J. de Carvalho, L. Fernandes, H.C. Paes, R.C. Hahn, L. Mendoza, E. Bagagli, G. San-Blas, and M.S. Felipe. 2009. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Molecular phylogenetics and evolution*. 52:273-283.
- Thomas, D.P., S.P. Bachmann, and J.L. Lopez-Ribot. 2006. Proteomics for the analysis of the *Candida albicans* biofilm lifestyle. *Proteomics*. 6:5795-5804.
- Tomazett, P.K., A.H. Cruz, S.M. Bonfim, C.M. Soares, and M. Pereira. 2005. The cell wall of *Paracoccidioides brasiliensis*: insights from its transcriptome. *Genetics and molecular research : GMR*. 4:309-325.
- Tomazett, P.K., C.R. Felix, H.L. Lenzi, F. de Paula Faria, C.M. de Almeida Soares, and M. Pereira. 2010. 1,3-beta-d-Glucan synthase of *Paracoccidioides brasiliensis*: recombinant protein, expression and cytolocalization in the yeast and mycelium phases. *Fungal biology*. 114:809-816.
- Trejo-Chavez, A., R. Ramirez-Romero, J. Ancer-Rodriguez, A.M. Nevarez-Garza, and L.E. Rodriguez-Tovar. 2011. Disseminated paracoccidioidomycosis in a Southern two-toed sloth (*Choloepus didactylus*). *Journal of comparative pathology*. 144:231-234.
- Turissini, D.A., O.M. Gomez, M.M. Teixeira, J.G. McEwen, and D.R. Matute. 2017. Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*. *Fungal Genetics and Biology*. 106:9-25.
- Vallejo, M.C., E.S. Nakayasu, A.L. Matsuo, T.J. Sobreira, L.V. Longo, L. Ganiko, I.C. Almeida, and R. Puccia. 2012. Vesicle and vesicle-free extracellular proteome of *Paracoccidioides brasiliensis*: comparative analysis with other pathogenic fungi. *Journal of proteome research*. 11:1676-1685.
- Vicentini, A.P., J.L. Gesztesi, M.F. Franco, W. de Souza, J.Z. de Moraes, L.R. Travassos, and J.D. Lopes. 1994. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. *Infection and immunity*. 62:1465-1469.
- Vilela, R., M. Huebner, C. Vilela, G. Vilela, B. Pettersen, C. Oliveira, and L. Mendoza. 2021. The taxonomy of two uncultivated fungal mammalian pathogens is revealed through phylogeny and population genetic analyses. *Scientific Reports*. 11:18119.
- Villalobos-Duno, H., G. San-Blas, M. Paulinkevicius, Y. Sánchez-Martín, and G. Nino-Vega. 2013. Biochemical Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* α -1,3-








- Glucanase Agn1p, and Its Functionality by Heterologous Expression in *Schizosaccharomyces pombe*. *PloS one*. 8:e66853.
- Wanke, B., and M.A. Aidê. 2009. Capítulo 6 - Paracoccidioidomicose, CURSO DE ATUALIZAÇÃO - MICOSES. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 35 1245-1249.
- Weber, S.S., A.F.A. Parente, C.L. Borges, J.A. Parente, A.M. Bailão, and C.M. de Almeida Soares. 2012. Analysis of the Secretomes of *Paracoccidioides* Mycelia and Yeast Cells. *PloS one*. 7:e52470.
- Yang, N., Z. Yu, D. Jia, Z. Xie, K. Zhang, Z. Xia, L. Lei, and M. Qiao. 2014. The contribution of Pir protein family to yeast cell surface display. *Applied microbiology and biotechnology*. 98:2897-2905.
- Yoshimi, A., K. Miyazawa, and K. Abe. 2017. Function and Biosynthesis of Cell Wall α -1,3-Glucan in Fungi. *Journal of fungi*. 3.

8. PRODUÇÃO CIENTÍFICA E COLABORAÇÕES

FUTURE MICROBIOLOGY, VOL. 16, NO. 8 | RESEARCH ARTICLE

 normal

In silico identification of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Paracoccidioides* spp.

Relber A Gonçalves , Ayda LM Salamanca , Luiz RB Júnior , Kleber SF e Silva, Elton JR de Vasconcelos, Thaila F dos Reis, Ricardo C Castro , Patrícia de C Ruy, Bárbara Romagnoli, Jerônimo Ruiz, Maristela Pereira , Célia M de A Soares  & Paulo SR Coelho 

Published Online: 17 May 2021 | <https://doi.org/10.2217/fmb-2020-0282>

 Tools  Share

Aim: To predict glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins in the genome of *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii*. **Materials & methods:** Five different bioinformatics tools were used for predicting GPI-anchored proteins; we considered as GPI-anchored proteins those detected by at least two *in silico* analysis methods. We also performed the proteomic analysis of *P. brasiliensis* cell wall by mass spectrometry. **Results:** Hundred GPI-anchored proteins were predicted in *P. brasiliensis* and *P. lutzii* genomes. A series of 57 proteins were classified in functional categories and 43 conserved proteins were reported with unknown functions. Four proteins identified by *in silico* analyses were also identified in the cell wall proteome. **Conclusion:** The data obtained in this study are important resources for future research of GPI-anchored proteins in *Paracoccidioides* spp. to identify targets for new diagnostic tools, drugs and immunological tests.

Keywords: cell wall • glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins • *Paracoccidioides brasiliensis* • *Paracoccidioides lutzii* • paracoccidioidomycosis