



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS (UFG)
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ICB)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR (PPGBM)

GABRIELA DANELLI ROSA

Análise proteômica do fungo patogênico humano *Fonsecaea pedrosoi* submetido à temperatura do hospedeiro

GOIÂNIA
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

GABRIELA DANELLI ROSA

3. Título do trabalho

“Análise proteômica do fungo patogênico humano *Fonsecaea pedrosoi* submetido à temperatura do hospedeiro”

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(a) autor(a) e ao(a) 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 **Alexandre Melo Bailao, Professor do Magistério Superior**, em 05/04/2022, às 15:26, 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 **GABRIELA DANELLI ROSA, Discente**, em 18/04/2022, às 14:45, 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 **2809928** e o código CRC **D9BA0451**.

Referência: Processo nº 23070.048920/2021-13

SEI nº 2809928

GABRIELA DANELLI ROSA

Análise proteômica do fungo patogênico humano *Fonsecaea pedrosoi* submetido à temperatura do hospedeiro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), da Universidade Federal de Goiás (UFG), como requisito para obtenção do título de mestre em Genética e Biologia Molecular.

Área de concentração: Genética e Biologia Molecular.

Linha de pesquisa: Genômica funcional, estrutural e proteômica.

Orientador: Professor Dr. Alexandre Melo Bailão

GOIÂNIA
2022

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

Rosa, Gabriela Danelli

Análise proteômica do fungo patogênico humano *Fonsecaea pedrosoi* submetido à temperatura do hospedeiro [manuscrito] / Gabriela Danelli Rosa. - 2022.

79 f.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Melo Bailão.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Goiânia, 2022.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, lista de tabelas.

1. Proteômica; . 2. Cromoblastomicose; . 3. CBM; . 4. *Fonsecaea pedrosoi*; . 5. temperatura do hospedeiro. I. Bailão, Alexandre Melo, orient. II. Título.

CDU 57



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº **98** da sessão de Defesa de Dissertação de **Gabriela Danelli Rosa**, que confere o título de Mestre(a) em **Genética e Biologia Molecular**, na área de concentração em **Genética e Biologia Molecular**.

Ao/s **vinte e nove dias do mês de setembro 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 Dissertação intitulada “**Análise proteômica do fungo patogênico humano Fonsecaea pedrosoi submetido à temperatura do hospedeiro**”. Os trabalhos foram instalados pelo(a) Orientador(a), Professor(a) Doutor(a) **Alexandre Melo Bailão (ICB/UFG)** com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professor(a) Doutor(a) **Patrícia de Sousa Lima (UEG)**, membro titular externo; Professor(a) Doutor(a) **Thiago Lopes Rocha (IPTSP/UFG)**, membro titular interno. Durante a arguição os membros da banca **não fizeram** sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido(a) o(a) candidata **aprovada** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo(a) Professor(a) Doutor(a) **Alexandre Melo Bailão**, 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 nove dias do mês de setembro de dois mil e vinte e um**.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Alexandre Melo Bailao, Professor do Magistério Superior**, em 29/09/2021, às 16:23, 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 **PATRICIA DE SOUSA LIMA, Usuário Externo**, em 29/09/2021, às 16:35, 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 **Thiago Lopes Rocha, Professor do Magistério Superior**, em 29/09/2021, às 16:39, 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 **2381850** e o código CRC **23E49413**.

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

ANÁLISE PROTEÔMICA DO FUNGO PATOGÊNICO HUMANO
***Fonsecaea pedrosoi* SUBMETIDO À TEMPERATURA DO HOSPEDEIRO**

Gabriela Danelli Rosa

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Melo Bailão

Goiânia- GO

2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que jamais me deixou só e tem me sustentado até então. Ele, em sua infinita bondade, colocou pessoas maravilhosas ao meu lado, as quais me deram forças pra prosseguir e concluir essa jornada.

Agradeço aos meus pais, Divino Carlos Rosa e Dilema Danelli Rosa por todo suporte e apoio. Obrigada pelo colo, por cada conselho, por segurarem meu choro, por me confortarem com seus abraços e acima de tudo, por acreditarem que eu conseguiria chegar até aqui. A fé que vocês depositaram em mim me impulsionou chegar onde eu nem imaginaria. Obrigada por sonharem comigo essa conquista. Muito obrigada!!

Agradeço aos meus irmãos, Iago Renan Danelli Rosa e Ingredi Danelli Rosa. Vocês são os melhores irmãos que eu poderia desejar!!! Obrigada por cada palavra de ânimo e por terem apostado em mim. Vocês me dão forças. Sempre.

Agradeço também aos meus cunhados, Lucas e Érica e meu sobrinho Kauã. Obrigada por todo apoio! Vocês somaram muitas alegrias durante a jornada.

Agradeço de forma muito especial ao meu namorado, Emanuel Melo Isaac Moreira. Meu bem, sem você essa jornada seria incalculavelmente mais árdua. Obrigada por ser meu suporte, por dedicar tanta paciência, por ser apoio incondicional, por seus conselhos, por suas palavras de ânimo e encorajamento, pelo cuidado em todo momento e por toda vez que me disse "vai dar tudo certo". Essa conquista também é sua! Te amo!

Agradeço à minha vó Maria Rosa, mulher de muita fé e que sempre me colocou em suas orações. Ao meu avô José Rosa (vô careca), homem batalhador e que graças a seu exemplo, tenho garra pra enfrentar a jornada. Ao meu tio Samuel, que sempre me apoiou e me dedicou palavras ânimo.

Aos meus tios, Octacílio e Ivanildes. O favor de Deus que eu não mereço alcança minha vida através da vida de vocês. Só eu sei como vocês foram pessoas fundamentais durante minha formação. Agradeço todo suporte financeiro, estrutural e emocional. Tia Iva, obrigada por ser um exemplo de garra e persistência pra mim!! Reconheço que cheguei até aqui graças a muitíssimo apoio seu!!

Obrigada aos meus grandes amigos do 'lanterna paraguaia', Marcos e Olívia. Eu nem tenho palavras pra expressar o quão eu tirei a sorte grande em ter vocês!!! Cada cia pra um café, almoço, experimento, por nossas risadas, desabafos e fofocas. Por tudo que a gente viveu durante esses dois anos e meio. A amizade e companheirismo de vocês me permitiram concluir essa fase da minha vida de forma mais leve. Agradeço ainda por todo apoio nessa etapa de finalização. Vocês me encorajaram e me trouxeram calma. Não tenho dúvidas de que a amizade de vocês foi uma das maiores conquistas que o mestrado me deu. Levo-os no coração.

Agradeço à Jackeliny e Katheryne por ótimos almoços no shopping nas quintas. Tio 'beck' lucrou bem conosco. Jack, obrigada por cada carona, cia e conversa jogada fora. Torço sempre muito por vocês.

Agradeço ao meu orientador Alexandre Melo Bailão, que tem acompanhado minha trajetória desde a iniciação científica. Obrigada pela paciência, atenção e suporte, por nunca ter me negado ajuda, por ter abrigado minhas angústias e por ter vibrado comigo à cada 'gel bonitão', rs. Agradeço muito por ter agregado imensamente na minha formação. Agradeço também a professora Mirelle Garcia Silva Bailão por todo apoio e por ser sempre muito disposta a ajudar. Juntos, vocês somaram muito durante minha jornada nesse universo de fungos negros. Obrigada!

Agradeço ao demais Professores do Laboratório de Genética e Biologia Molecular. Professora Célia Maria, Clayton Borges, Juliana Parente e Maristela Pereira. Esse trabalho não seria possível sem a conquista de cada professor e a estrutura construída por vocês.

Agradeço aos demais colegas do LBM que sempre compartilham experiências e fazem nosso trabalho seguir de forma mais descontraída. Sei o quanto a jornada não é fácil e admiro a dedicação de cada um de vocês.

Agradeço aos meus amigos de graduação, em especial Raquel Alves, sua amizade foi fundamental em todas as etapas, Alba Valéria, Dhiogenes Balsanufu, Orion Ribeiro e aos demais que sempre deram forças e me proporcionaram muitos momentos de descontração. Obrigada por cada café acompanhado de boas conversas e risadas. Agradeço também ao meu grande irmão de laboratório Santiago Espellet. Querido San, obrigada por passar comigo pelos percalços da IC e por ter me proporcionado uma amizade tão duradoura. Levo todos vocês pra vida.

Agradeço as irmãs que a vida me deu, Juliana Galvão, Vanessa Maia, Letícia Maia e Paula Lavínia. Amizades pra vida! Tenho muito orgulho de cada conquista nossa e sou grata a Deus por estarmos unidas até aqui, sempre apoiando, torcendo e vibrando umas com as outras.

Agradeço de forma muito especial a todos que de alguma forma torceram por mim e que de algum modo fizeram parte dessa etapa na minha vida. São muitos os nomes que não cabem nestas páginas, mas que sem dúvidas vou carregar no coração e na memória! Sem vocês eu não conseguiria e com vocês 'tá' muito mais leve.

Obrigada!

SUMÁRIO

Lista de Figuras	06
Lista de Tabelas	07
Resumo	08
1. Introdução	10
1.1 Doenças tropicais negligenciadas e a Cromoblastomicose	10
1.2 Um breve histórico (prioridade de publicação e confusão de nomes)	12
1.3 Distribuição geográfica, como e quem é acometido	13
1.4 Formas clínicas da doença e tratamentos	14
2. Agentes etiológicos da CBM	18
2.1 <i>Fonsecaea pedrosoi</i>	20
3. Fatores de virulência de <i>F. pedrosoi</i>	23
3.1 Aderência e hidrofobicidade	23
3.2 Melanina	24
3.3 Termotolerância	26
4. Proteômica no estudo da termotolerância de fungos	29
5. Justificativa	33
6. Objetivos	33
6.1 Objetivo geral	33
6.2 Objetivo específico	33
7. Materiais e métodos	34
7.1 Cultivo do fungo	34
7.2 Obtenção dos extratos proteicos	34
7.3 Eletroforese unidimensional (SDS-PAGE)	35
7.4 Digestão trípica do extrato proteico	35
7.5 Análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (Nano UPLC-MS ^E), análise <i>in silico</i> e identificação das proteínas	36

7.6 Dosagem de glicose	36
7.7 Dosagem de quitina	37
8. Resultados e discussão	37
8.1 Crescimento de <i>F. pedrosoi</i>	37
8.2 Obtenção do extrato proteico	38
8.3 Análise proteômica de <i>F. pedrosoi</i>	39
8.4 O cultivo a 37°C não afeta o consumo de glicose	62
8.5 O conteúdo de quitina é diminuído quando <i>F. pedrosoi</i> é cultivado a temperatura do hospedeiro	64
9. Conclusões	67
Referências Bibliográficas	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição global de casos de cromoblastomicose _____	13
Figura 2: Tipos de lesões observadas na cromoblastomicose _____	16
Figura 3: Disposição dos conídios de agentes causadores da cromoblastomicose ____	19
Figura 4: Morfologia de <i>F. pedrosoi</i> _____	21
Figura 5: Crescimento de <i>F. pedrosoi</i> em diferentes condições de temperatura (28 e 37°C) _____	38
Figura 6: Eletroforese das proteínas intracelulares de <i>F.pedrosoi</i> cultivado à 28 e 37°C _____	39
Figura 7: Distribuição categórica das proteínas reguladas de <i>F. pedrosoi</i> após cultivo à 37°C _____	56
Figura 8: Adaptações metabólicas identificadas em <i>F. pedrosoi</i> induzidas pela mudança de temperatura _____	58
Figura 9: Quantificação de glicose _____	63
Figura 10: Efeito da mudança de temperatura na parede celular de culturas de <i>F. pedrosoi</i> _____	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Proteínas induzidas em *F. pedrosoi* cultivado à 37°C _____40

Tabela 2: Proteínas reprimidas em *F. pedrosoi* após cultivo à 37°C _____44

RESUMO

A Cromoblastomicose (CBM) é uma micose subcutânea crônica, muito comum em regiões tropicais e subtropicais e acomete em maioria homens relacionados a atividades rurais. As lesões dessa doença podem aparecer em cinco formas clínicas e os tratamentos são dificultados devido à natureza recalcitrante da doença. O principal agente causador da CBM é o fungo *Fonsecaea pedrosoi*, o qual é um fungo polimórfico, melanizado e que apresenta certa plasticidade fenotípica frente a variações de temperatura. A termotolerância é um dos fatores de virulência descritos para este patógeno, uma vez que este sobrevive ao aumento de temperatura, como a do hospedeiro. Porém, nenhum trabalho até o momento buscou caracterizar os processos celulares envolvidos nessa adaptação. As proteínas fazem parte das estratégias utilizadas em resposta a uma variedade de estressores, tais como a temperatura do hospedeiro. Neste trabalho nós mapeamos o perfil proteômico intracelular de *F.pedrosoi* cultivado em diferentes condições de temperatura (28 e 37°C) por 24 horas. Foi possível identificar por meio de Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massa (Nano UPLC-MS^E) um total de 486 proteínas diferencialmente expressas, sendo que, 101 foram reguladas positivamente e 385 reguladas negativamente. Foi possível observar que *F. pedrosoi* parece responder ao estresse de temperatura reprimindo vias do metabolismo central de carbono, como a glicólise, ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e ciclo do glioxilato, biossíntese de parede celular e melanina e induziu enzimas de degradação de aminoácidos e proteínas antioxidantes.

Palavras-chave: Proteômica; Cromoblastomicose; CBM; *Fonsecaea pedrosoi*; temperatura do hospedeiro.

ABSTRACT

Chromoblastomycosis (CBM) is a chronic subcutaneous mycosis, very common in tropical and subtropical regions and affects many men related to rural activities. Lesions of this disease can appear in five clinical forms and treatments are difficult due to the recalcitrant nature of the disease. The main causative agent of CBM is the fungus *Fonsecaea pedrosoi*, which is a polymorphic, melanized fungus that presents a certain phenotypic plasticity in face of temperature variations. Thermotolerance is one of the virulence factors of virulence for this pathogen, since it survives the temperature increase, like that of the host. However, no work so far has searched to characterize the adapted cellular processes. Proteins are part of the strategies used in response to a variety of stressors, such as host temperature. In this work we mapped the intracellular proteomic profile of *F. pedrosoi* cultivated under different temperature conditions (28 and 37 °C) for 24 hours. It was possible to identify by means of Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry (Nano UPLC-MS^E) a total of 486 differentially expressed proteins, 101 of which were up-regulated and 385 down-regulated. It was possible to observe that *F. pedrosoi* seems to respond to temperature stress by repressing central carbon metabolism pathways, such as glycolysis, tricarboxylic acid cycle (TCA) and glyoxylate cycle, cell wall biosynthesis and melanin and induced amino acid degradation enzymes and antioxidant proteins.

Keywords: Proteomics; Chromoblastomycosis; CBM; *Fonsecaea pedrosoi*; host temperature

1. INTRODUÇÃO

1. 1 Doenças tropicais negligenciadas e a Cromoblastomicose

Populações de regiões tropicais e subtropicais do mundo são acometidas por doenças que afetam indivíduos que vivenciam um cenário de extrema pobreza em áreas rurais e em zonas urbanas desfavorecidas. Estas doenças estão inclusas em um grupo conhecido como Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN's) que podem levar o indivíduo acometido ao mal desenvolvimento infantil, à incapacidade produtiva e adversidade na gravidez. Porém, devido à falta de visibilidade política, tais populações não são consideradas prioridade e não recebem devida atenção (QUEIROZ-TELLES et al., 2017a, 2017b; HOTEZ, KAMATH, 2009; HOTEZ, et al., 2007). As DTNs incluem doenças como infecções helmínticas, protozoárias, bacterianas, virais e algumas infecções fúngicas (QUEIROZ-TELLES et al., 2017a, 2017b). Apesar dos efeitos das infecções fúngicas na saúde humana não serem devidamente reconhecidos, milhões de pessoas estão susceptíveis a contrair infecções invasivas ocasionadas por fungos em algum momento de suas vidas, as quais costumam ser tratadas tardiamente devido ao difícil diagnóstico, acarretando assim, sério risco de morte. Ainda que a incidência das infecções fúngicas superficiais seja menor que a incidência de infecções fúngicas invasivas, esta última se torna amplamente preocupante, pois está associada a taxas de mortalidade inaceitavelmente altas, chegando a matar cerca de um milhão e meio de pessoas todos os anos (BROWN et al., 2012).

Muitas das infecções causadas por fungos utilizam a via respiratória como porta de entrada para se instalar no hospedeiro. Porém, os fungos também podem infectar por meio da implantação transcutânea, a qual é proveniente de uma inoculação acidental que ocorre mediante alguma ferida ou lesão no tecido subcutâneo, favorecendo assim, a penetração de propágulos fúngicos no momento do trauma, tornando esta forma, outra importante fonte de infecção (QUEIROZ-TELLES et al., 2017a, 2017b; RASAMOELINA et al., 2017). Doenças como feo-hifomicose, entomofotoromicose, esporotricose, eumicetoma, lacaziose e cromoblastomicose estão inclusas no grupo de doenças fúngicas conhecidas como micoses de implantação, também chamadas de micoses subcutâneas. Este grupo heterogêneo é caracterizado por doenças que se manifestam depois de meses ou anos após a infecção inicial e que afetam

principalmente os tecidos cutâneos e subcutâneos apresentando uma série de manifestações clínicas (QUEIROZ-TELLES et al., 2017a).

A feohifomicose é caracterizada pela presença de nódulo único que evolui para formar um abscesso indolor e têm os pés, pernas, mãos, braços e a cabeça como as regiões mais comuns da infecção. Na entomofotoromicose pode haver lesões caracterizadas por nódulos duros que se espalham pelas coxas e nádegas ou ainda edemas nasais podendo ocasionar desconfiguração facial. A esporotricose é a mais prevalente micose de implantação no mundo e ocasiona lesões cutâneas como nódulos e placas, linfocutânea que são presentes nos linfonodos da região próxima a lesão e ainda lesões extracutâneas que envolvem lesões pulmonares e oftalmológicas. No caso da eumicetoma, há o comprometimento dos tecidos cutâneos e subcutâneos e eventualmente do tecido muscular e ósseo, sendo caracterizada pela aparição de lesões locais que podem progredir ocorrendo tumoração e formação de grãos. A lacaziose, por sua vez, é considerada indolor devido à falta de sensibilidade na região afetada a qual pode ser marcada por lesões semelhantes àqueloides que podem se estender e comprometer o sistema linfático (QUEIROZ-TELLES et al., 2011; QUEIROZ-TELLES et al., 2017a).

A cromoblastomicose (CBM) é caracterizada por ser uma doença crônica que afeta a pele e tecidos subcutâneos (SANTOS et al., 2007) e tem sido descrita como a segunda micose de implantação mais prevalente do mundo (QUEIROZ-TELLES et al., 2017a) e a mais comum ocasionada por fungos dematiáceos. Esses fungos também são conhecidos como fungos negros, devido à alta taxa de deposição de melanina observada na parede celular destes fungos (QUEIROZ-TELLES et al., 2017b). Apesar de infecções como algumas feo-hifomicoses, entomofotoromicoses, lacaziose, eumicetoma e esporotricose também serem classificadas como micoses de implantação (QUEIROZ-TELLES et al., 2017b) a CBM é a única micose de implantação inclusa no portfólio de DTN's da Organização Mundial da Saúde (OMS). Além disso, a CBM junto à eumicetoma são as únicas infecções fúngicas superficiais inclusas no portfólio de DTN's da OMS até então (WHO 2017a; WHO, 2017b).

1.2 Um breve histórico da CBM

Há muito se manteve certa controvérsia a respeito de qual autor havia relatado os primeiros casos de CBM (QUEIROZ-TELLES et al., 2017b) e ainda sobre qual nome definiria melhor a doença. Na literatura, a primeira publicação a respeito de casos da doença ocorreu em 1914, por um médico alemão chamado Maximilliano Willibaldo Rudolph, que viveu e trabalhou no estado brasileiro de Minas Gerais como clínico e observou seis pacientes que apresentavam lesões verrucosas nos membros inferiores, as quais eram conhecidas como “figueira”. Porém, as pesquisas envolvendo dermatites verrucosas já haviam sido iniciadas previamente, em 1911, por Alexandre Pedroso e Jose Maria Gomes, no estado de São Paulo. Eles acreditavam que a doença estava intimamente relacionada à blastomicose, e por isso, nomearam de “blastomicose negra”. Entretanto, suas observações só foram finalmente publicadas no ano de 1920 e por esse motivo o prestígio é atribuído a Rudolph (KRZYŚCIAK, PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA, PIASZCZYŃSKI, 2014; BRITO, BITTENCOURT, 2018; QUEIROZ-TELLES et al., 2017b; QUEIROZ-TELLES, 2015).

O termo “cromoblastomicose” foi atribuído no ano de 1992 por Terra e colaboradores para diferenciá-la de uma síndrome clínica conhecida como “dermatite verrucosa”. O termo “cromoblastomicose” sugeria que os patógenos mostravam formas de brotamento como leveduras nos tecidos (QUEIROZ-TELLES et al., 2017b). Neste sentido, Moore e Almeida propuseram mudar “cromoblastomicose” por apenas “cromomicose” em 1935. Porém, o termo cromomicose passou a ser usado para abranger um número diversificado de doenças ocasionadas por fungos melanizados. Finalmente, em 1974, Ajello e colaboradores, criaram o termo “feohifomicose” para definir as doenças que eram clínicas e patologicamente distintas de CBM. Apesar da doença ainda ser referida por nomes populares e científicos como cromomicose, dermatite verrucosa, figueira, formigueiro, blastomicose negra dentre outros, o termo atual, cromoblastomicose, foi finalmente validado pela Sociedade Internacional de Micologia Humana e Animal (ISHAM), em 1992, como nome oficial da doença (BRITO, BITTENCOURT, 2018; QUEIROZ-TELLES et al., 2017b).

1.3 Distribuição geográfica, como e quem é acometido.

Considerada uma doença de distribuição mundial, a CBM prevalece em regiões tropicais e subtropicais úmidas da América, Ásia e África. Os países da América que mais relatam casos são México, República Dominicana, Cuba, Colômbia, Venezuela e Brasil, sendo este último, o país com maior número de relatos. Na Ásia há relatos no Japão, Índia, Sri Lanka e China. Na África os casos são relatados em Madagascar e África do Sul. (MARTÍNEZ, TOVAR, 2007; KRZYŚCIAK, PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA, PIASZCZYŃSKI, 2014). No Brasil, a CBM é considerada endêmica em grande parte de seu território e as pesquisas mostram que há uma média anual de 2,6 casos (73 casos/ 28 anos) de CBM notificados no Rio Grande do Sul, 4,3 (13 casos/ 3 anos) relatados no Maranhão, 5,9 casos (325 casos/ 55 anos) no Pará e 6,4 casos (71 casos/ 11 anos) no Paraná (QUEIROZ-TELLES et al., 2011; QUEIROZ-TELLES et al., 2017b).

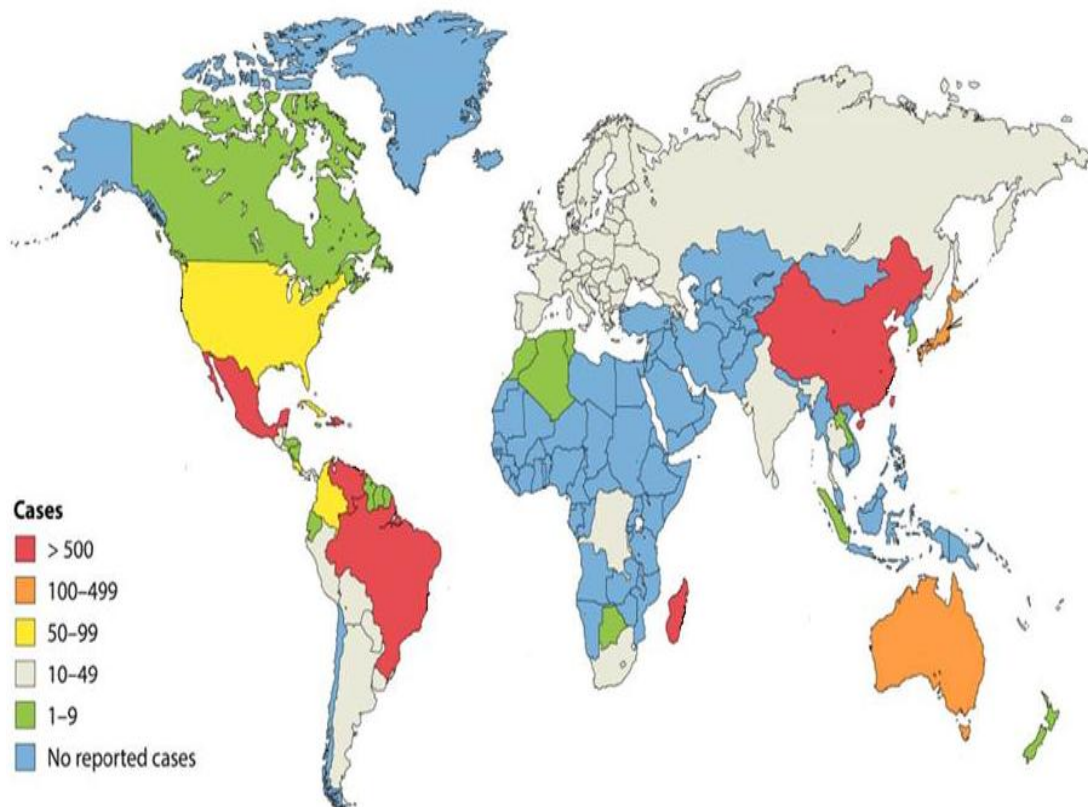


Figura 1: Distribuição global de casos de cromoblastomicose (CBM). Fonte: QUEIROZ-TELLES et al., (2017b) com modificações.

A CBM se desenvolve a partir da implantação traumática transcutânea dos agentes etiológicos nos tecidos subcutâneos, podendo ganhar acesso por meio de feridas na pele ou ainda pela implantação de lascas e espinhos de plantas contaminadas por fungos dematiáceos (MARTINEZ, TOVAR, 2007; AMEEN, 2009; ESTERRE, QUEIROZ-TELLES, 2006). No Maranhão, as margens da floresta Amazônica, o babaçu, uma palmeira silvestre, foi relatado como uma importante fonte de infecção, pois, foram isolados fungos causadores de CBM desta planta. Como grande parte da população que vive ali desempenha atividades relacionadas à colheita de nozes de babaçu, muitas delas estão susceptíveis a contrair a doença, visto que, a forma de trabalho dessas pessoas está intimamente relacionada ao modo de infecção, pois os mesmos raramente usam equipamentos de proteção ao manusear o babaçu (QUEIROZ-TELLES, 2015).

Devido à relação que há entre a forma de trabalho e ao mecanismo de como a doença se instala, a mesma é considerada uma doença ocupacional (QUEIROZ-TELLES, 2015). Esta moléstia acomete em sua maioria indivíduos do sexo masculino entre 30-50 anos de idade que desempenham funções relacionadas à agricultura e raramente é observada em indivíduos adolescentes (KRZYŚCIAK, PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA, PIASZCZYŃSKI, 2014; RASAMOELINA et al., 2017; MARTINEZ, TOVAR, 2007). Em um estudo envolvendo 100 casos de CBM, foi observado que a taxa de infecção de homens para mulheres é de 4: 1 (MINOTTO et al., 2001). Acredita-se que a predominância de CBM em homens seja atribuída pelo fato de estes estarem mais envolvidos em atividades rurais que mulheres e tais atividades assumem por natureza o manejo de detritos no solo, matéria em decomposição, como a madeira e plantas, que são substratos nos quais estes organismos são encontrados (KRZYŚCIAK, PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA, PIASZCZYŃSKI, 2014; RASAMOELINA et al., 2017; MARTINEZ, TOVAR, 2007).

1.4 Formas clínicas da doença e tratamentos

Quando os indivíduos são acometidos por CBM, as lesões aparecem no local da inoculação traumática após um período incerto de incubação (QUEIROZ-TELLES, 2015) podendo progredir lentamente ao longo de muitos anos e, às vezes, décadas (MARTINEZ, TOVAR, 2007). Na maioria dos casos, os principais membros afetados

são os inferiores como as pernas, tornozelos e a parte superior dos pés, devido a estas regiões estarem mais expostas e sujeitas a contaminação (RASAMOELINA et al., 2017). Porém, apesar de menos comum, são relatados casos de infecção no pescoço, face, cotovelo e mão (MARTINEZ, TOVAR, 2007). A CBM não atinge os músculos e ossos, pois, é delimitada ao tecido subcutâneo, de forma que cresce em extensão e não em profundidade (MARTINEZ, TOVAR, 2007; AMEEN, 2009). Nos estágios iniciais, esta doença se demonstra assintomática e indolor (MARTINEZ, TOVAR, 2007) e devido à falta de auxílio e diagnóstico médico prévio, as lesões iniciais podem progredir para diferentes formas clínicas (QUEIROZ-TELLES et al., 2017b).

Segundo Carrion (1950) a doença pode ser classificada em cinco formas clínicas, sendo elas do tipo nodular, tumoral, verrucosa, cicatricial ou placa. Primeiramente, é observado uma lesão inicial no local da infecção (Figura 2A-B) que pode progredir para as outras formas clínicas. O primeiro tipo de lesão, a forma nodular, (Figura 2C-D) apresenta superfície escamosa, verrucosa ou lisa, com coloração rosada e muitos nódulos. A forma tumoral (Figura 2E-F) apresenta proeminência papilomatosa, semelhante a tumores, podendo ser cobertas por epiderme assumindo uma aparência característica de couve-flor. Uma característica marcante da forma verrucosa (Figura 2G-H) é a hiperqueratose assumindo aparência de verruga. A lesão cicatricial (Figura 2I e J) apresenta extensão periférica com cicatrização no centro cobrindo áreas mais alongadas assumindo formas anulares. A última lesão, do tipo placa (Figura 2K-L), é a menos comum, mas quando ocorre, é caracterizada por infiltrações de cor avermelhada que podem ser elevadas e assumir formas variadas (CARRION, 1950).



Figura 2: Tipos de lesões observadas na necroblastomycose (CBM). (A e B) lesões iniciais; (C e D) lesões do tipo nodular; (E e F) lesões do tipo tumoral; (G e H) lesões do tipo verrucosa; (I e J) lesões do tipo cicatricial e (K e L) lesões do tipo placa. Retirado e modificado de BRITO, BITTENCOURT (2018) (Figuras B, D, E, H, I e L) ; QUEIROZ-TELLES et al. (2017b) (Figuras: A, C, F, G, J e K) com modificações.

Além de serem classificadas em diferentes tipos, as lesões da CBM podem apresentar diferentes níveis de severidade, podendo ser classificadas em: nível 1) forma branda, caracterizada por nódulos únicos e de aproximadamente 5cm de diâmetro; nível 2) forma moderada, caracterizada por lesões tumorais, verrucosa ou em placa cobrindo uma ou mais áreas corporais com aproximadamente 15cm de diâmetro; nível 3) forma grave, que inclui qualquer tipo de lesão cobrindo extensas regiões da pele (KRZYŚCIAK, PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA, PIASZCZYŃSKI, 2014).

As lesões da CBM são resistentes e difíceis de tratar e os métodos adotados podem variar conforme a extensão e severidade das lesões, presença de complicações e agente etiológico. As opções de tratamentos estão disponíveis em métodos físicos, antifúngicos sistêmicos e adjuvantes imunológicos (QUEIROZ-TELLES, 2015; BRITO, BITTENCOURT, 2018). Os métodos físicos incluem cirurgia, termoterapias e terapia fotodinâmica, sendo que na maioria dos casos, os métodos são combinados com antifúngicos para melhores resultados (QUEIROZ-TELLES et al., 2017b). A cirurgia é considerada a melhor opção para o tratamento da CBM e é recomendada para casos de lesões iniciais (QUEIROZ-TELLES et al., 2017b) sendo que antifúngicos são administrados anteriormente visando reduzir o tamanho da lesão e posteriormente para evitar possível recorrência (BRITO, BITTENCOURT, 2018). As termoterapias incluem a crioterapia ou chamada ainda de criocirurgia, onde se utiliza nitrogênio líquido sob a lesão com auxílio de um aplicador ou spray (CASTRO, PIMENTEL, LACAZ, 2003; QUEIROZ-TELLES et al., 2017b). Outra termoterapia utilizada no tratamento de CBM é a terapia de calor, que apesar de ser menos utilizada, consiste na aplicação diária de uma fonte de calor sobre as lesões. (HIRUMA et al., 1993; BRITO, BITTENCOURT, 2018; QUEIROZ-TELLES et al., 2017b). A terapia fotodinâmica, por sua vez, é uma técnica que foi inicialmente utilizada no tratamento de câncer, mas que passou a ser empregada na terapia contra patógenos (LYON et al., 2013). Esta abordagem consiste na exposição de um composto fotossensibilizador à luz com comprimento de onda excitatório para tal composto, capaz de ativar o mesmo. A ativação do fármaco tem por resultado a produção de espécies reativas de oxigênio dentre outras moléculas reativas, levando ao dano das células no local alvo (LYON et al., 2011; LYON et al., 2013).

Os antifúngicos sistêmicos são alternativas de tratamentos não físicos e são encontrados em diferentes opções como aqueles derivados de azol, tais como

itraconazol, cetoconazol, fluconazol e saperconazol que são administrados de forma oral, bem como derivados de alanina como a terbinafina e ainda os medicamentos de uso quimioterápico como calciferol, 5-fluorocitosina e anfotericina B (BONIFAZ, PAREDES-SOLIS, SAUL, 2004). Destes citados acima, os mais utilizados são itraconazol e terbinafina, sendo este primeiro considerado a terapia padrão e também o mais utilizado no tratamento de CBM (QUEIROZ-TELLES et al., 2017; BRITO, BITTENCOURT, 2018). Já os adjuvantes imunológicos, como glucana e imiquimod têm sido utilizados em combinação com drogas antifúngicas e os resultados em geral podem apresentar cura ou ainda redução significativa das lesões (QUEIROZ-TELLES et al., 2017b).

2. Agentes etiológicos da CBM

A CBM é ocasionada por um grupo bastante diversificado de fungos negros os quais pertencem a família Herpotrichiellaceae, ordem Chaetothyriales (QUEIROZ-TELLES et al., 2017b) e estão acomodados em diferentes gêneros, sendo eles: *Cladophialophora*, *Exophiala*, *Fonsecaea*, *Phialophora* e *Rhinocladiella* (TEIXEIRA, M. de M. et al., 2017; MORENO, VICENTE, DE HOOG, 2018). Em geral esses fungos assumem coloração negra devido à presença de melanina tanto em suas estruturas reprodutivas quanto vegetativas, apresentam reprodução por brotamento e crescimento lento. Seu modo clonal de reprodução permite certa diferenciação entre os gêneros uma vez que os conídios de *Cladophialophora* estão dispostos em cadeias longas e secas (Figura 3C), de *Exophiala* apresentam desenvolvimento anelídico (Figura 3D), em *Fonsecaea* estão dispostos em cadeias curtas e agrupados em dentículos (Figura 3A), em *Phialophora* são produzidos através de colarinhos com cabeças viscosas (Figura 3B) e em *Rhinocladiella* são produzidos simpodialmente e dispostos em extensões celulares alongadas (Figura 3E) (QUEIROZ-TELLES et al., 2017b).

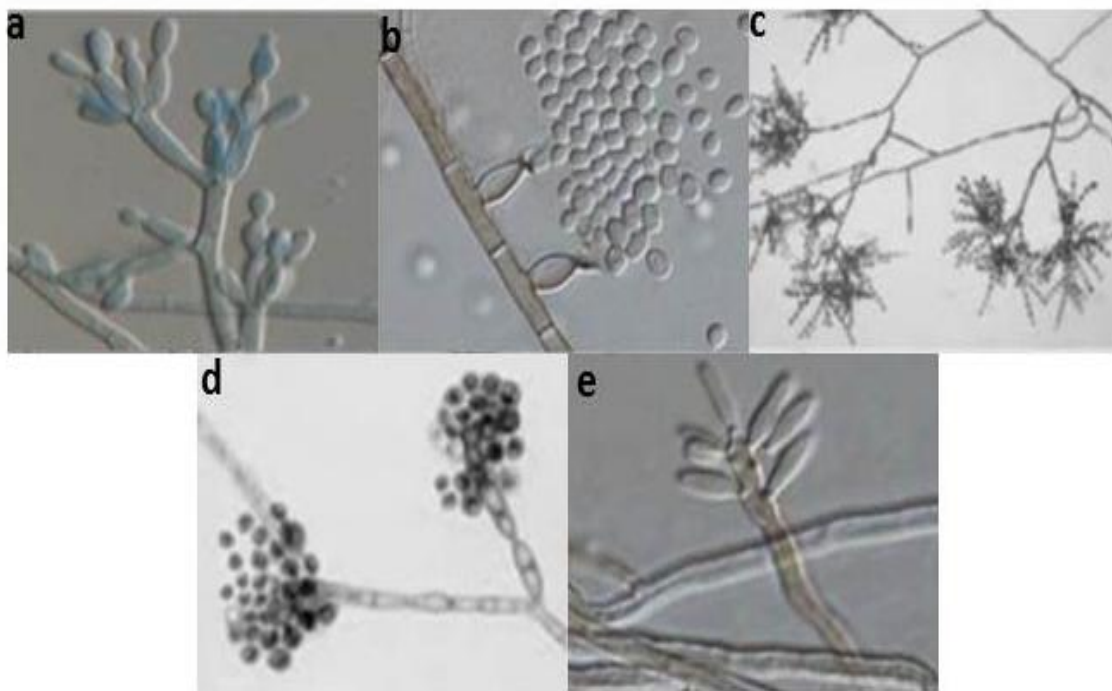


Figura 3: Disposição dos conídios de agentes causadores da cromoblastomicose(CBM). Em a) *Fonsecaea spp.*; b) *Phialophora verrucosa*; c) *Cladophialophora carrionii*; d) *Exophiala dermatitidis* e e) *Rhinocladiella aquaspersa*. Fonte: QUEIROZ-TELLES et al. (2017b) com modificações.

Estes organismos apresentam grande diversidade em seu estilo de vida, sendo estes, considerados “poliextremotolerante” termo introduzido para definir a ecologia destes fungos, pois são encontrados em ambientes que oferecem certa hostilidade, tais como, locais pobres em nutrientes, com baixa umidade e com exposição à radiação. Outra característica destes organismos é a tolerância a altas temperaturas (40-42°C) (QUEIROZ-TELLES et al., 2017b; MORENO, VICENTE, DE HOOG, 2018).

O gênero *Cladophialophora* compreende duas espécies causadoras de CBM, *C. carrionii* e *C. samoensis*, o *Exophiala* compreende as espécies *E. spinifera* e *E. dermatitidis*, o gênero *Phialophora* a espécie *P. verrucosa*, o gênero *Rhinocladiella* compreende a espécie *R. aquaspersa* e o gênero *Fonsecaea* compreende cinco espécies causadoras de CBM, *F. pedrosoi*, *F. monophora*, *F. nubica*, *F. multimorphosa* e *F. pugnacius* (QUEIROZ-TELLES et al., 2017b; FENG, DE HOOG, 2017). Destes citados acima, as espécies que mais são relatadas por ocasionar a CBM são *F. pedrosoi*, *C.*

carrionii e *P. verrucosa* (AMEEN, 2009; KRZYŚCIAK, PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA, PIASZCZYŃSKI, 2014).

F. pedrosoi é o agente da CBM mais relatado em zonas tropicais da América Latina, sendo as populações rurais de Cuba, Porto Rico e República Dominicana, altamente afetada por esta espécie. *C. carrionii* é bastante relatado em zonas áridas e semiáridas como alguns estados da Venezuela. Já para a espécie *P. verrucosa* que é encontrada em planícies e em condições semelhantes de *F. pedrosoi*, os relatos são dispersos por várias partes do mundo (TORRES-GUERRERO et al., 2012).

2.1 *Fonsecaea pedrosoi*

F. pedrosoi apresenta colônias de textura aveludada e coloração escura (Figura 4), são anamórficos e apresentam conidiogênese simpodial com conídios isolados ou em cadeias curtas e são capazes de crescer a 37°C. Apesar de este gênero conter cinco espécies clinicamente relevantes (FENG, DE HOOG, 2017) *F. pedrosoi* é a espécie mais frequente em todo o mundo, e é considerado o principal agente etiológico de CBM no Brasil (MARTÍNEZ, TOVAR, 2007; QUEIROZ-TELLES et al., 2017b). Este patógeno, por sua vez, apresenta crescimento lento em cultura e sua colônia assume aspecto aveludado, restrito, podendo ser plana a elevada. Essas colônias apresentam coloração escura e sua maturação ocorre geralmente em 14 dias (SANTOS et al., 2007).

Assim como os demais agentes causadores da CBM, o *F. pedrosoi* é considerado um organismo polimórfico, pois apresenta grande variação morfológica frente às mudanças de habitat. Essa variação se deve à sua alta plasticidade e adaptabilidade (QUEIROZ-TELLES, 2017b) sendo capaz de apresentar conídios como estrutura de reprodução, hifas/micélio em seu estágio saprofítico e ainda as células conhecidas como células/corpos escleróticos como estrutura parasitária. Também são conhecidas por células muriformes, fumagóides ou Medlar (SANTOS et al., 2007).

F. pedrosoi produz hifas septadas com micélio extenso, filamentoso e produtor de conídios, estes por sua vez, apresentam forma de barril com coloração marrom (SILVA, 1957; SANTOS et al., 2007). As células escleróticas podem se apresentar sozinhas ou em um agregado esférico, são arredondadas, amarelo-acastanhadas, com paredes grossas e altamente pigmentadas, dividindo-se por septação (Figura 4). Essas estruturas são altamente resistentes devido suas paredes espessas. A alta deposição de

melanina na parede destas células confere a elas maior resistência contra a ação de células imunes do hospedeiro (SILVA, 1957; QUEIROZ-TELLES et al., 2017b).

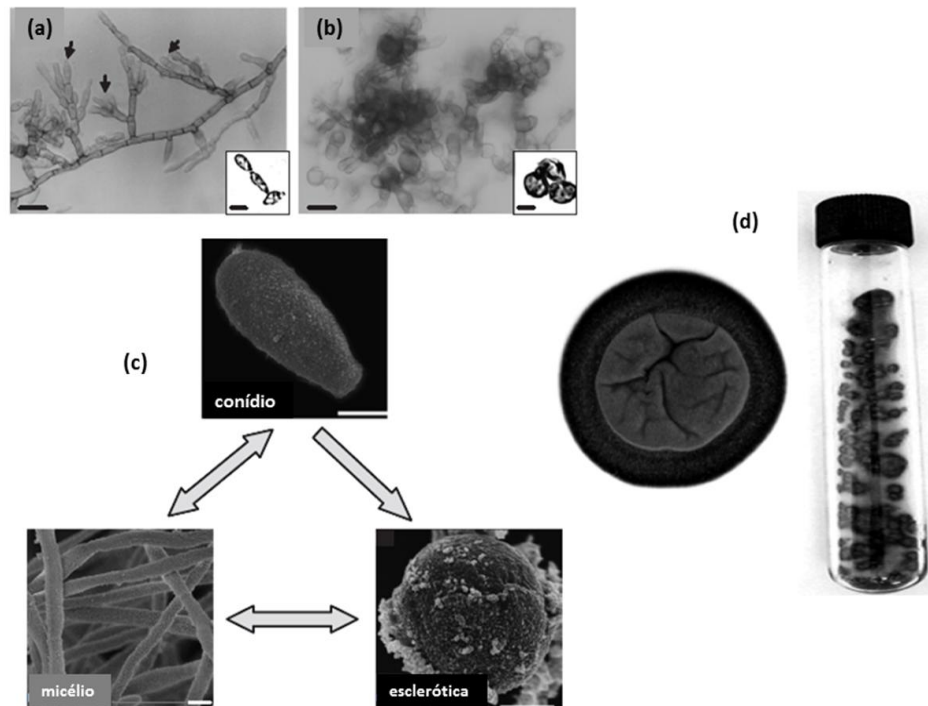


Figura 4: Morfologia de *F. pedrosoi*: Microscopia de luz (a-b) e microscopia eletrônica de varredura (c). Em (a) micélios com formação de conídios (setas); (b) células escleróticas; (c) formas potenciais de diferenciação (conídio, micélio e esclerótica). Em (d) visualização macroscópica de culturas de *F. pedrosoi*. Fonte: Santos et al. (2007) com modificações.

Embora a infecção fúngica seja ocasionada por meio da inoculação de fragmentos de hifas ou conídios no momento do trauma, as alterações morfológicas para as células escleróticas ocorrem no interior do hospedeiro (ALVIANO et al., 2004; NIMRICHTER et al., 2005). A transição morfológica de qualquer uma destas formas fúngicas pode gerar outra, exceto a estrutura esclerótica para a de conídio (SANTOS et al., 2007). Diferentemente da forma esclerótica, a produção de hifas e conídios de *F. pedrosoi* *in vitro* ocorre facilmente. Quando este fungo é cultivado sob condições estáticas, o crescimento em forma de hifas é preferencialmente induzido enquanto sob agitação, estimula-se a formação de conídios (SANTO et al., 2007).

Apesar da dificuldade de obtenção das formas escleróticas, alguns estudos têm utilizado diferentes abordagens na tentativa de induzir a formação das mesmas *in vitro*.

Szaniszlo e colegas (1976) induziram o que eles chamaram de corpos multicelulares e de paredes espessas, semelhante a características de corpos escleróticos, por meio da acidificação do meio de cultura (SZANISLO, HSIEH, MARLOWE, 1976). Com o mesmo objetivo, Alviano e colaboradores (1992) obtiveram uma grande população de células escleróticas utilizando meio de cultura em faixa de pH ácido suplementado com propranolol (ALVIANO et al., 1992). Este mesmo estudo foi validado posteriormente por Silva e equipe (2002) que reproduziram o cultivo de células de *F. pedrosoi* em meio de cultura em faixa de pH ácido acrescido de propranolol. Neste estudo, foi realizado a comparação entre as células escleróticas obtidas *in vitro* com células escleróticas obtidas *in vivo* e observaram por análises de microscopia óptica e eletrônica de transmissão que as células cultivadas *in vitro* nas condições propostas por Alviano e colaboradores (1992) eram morfológicamente semelhantes às obtidas *in vivo* (DA SILVA et al., 2002).

Estudos sobre a forma parasitária permitem entender a adaptação do fungo nas condições do hospedeiro possibilitando identificar possíveis fatores que estejam envolvidos na morfologia parasitária e na interação parasito-hospedeiro, permitindo assim, o desenvolvimento de uma ação mais racional para a doença. Contudo, faltam determinações reais de sua vulnerabilidade, pois apesar de se conhecer muito bem a morfologia das células escleróticas, sua fisiologia ainda é bastante obscura (SILVA, 1957). Acredita-se que as células escleróticas sejam um mecanismo de adaptação evolutiva pela qual permitiu a sobrevivência dos fungos frente à carência nutricional e aos mecanismos de defesa do hospedeiro aos quais os patógenos se deparam durante o processo infeccioso, permitindo que nessa estrutura, assumam mais chances de sobreviver dentro do microambiente do hospedeiro (QUEIROZ-TELLES et al., 2017b). Para além das células escleróticas, estes patógenos desenvolveram fatores de virulência que lhe conferem maior sucesso e chances de sobrevivência, tais como aderência, hidrofobicidade, presença de melanina e termotolerância, (FENG, DE HOOG, 2017; QUEIROZ-TELLES et al., 2017b).

3. Fatores de virulência de *F. pedrosoi*

3.1 Aderência e hidrofobicidade

A adesão à superfície do hospedeiro é necessária para se obter sucesso na colonização e estabelecimento da infecção. A hidrofobicidade da superfície celular é uma das características que contribui neste processo uma vez que, aumenta as interações hidrofóbicas entre as células fúngicas e as superfícies (ANGIOLELLA et al., 2018). A parede celular é caracterizada por uma organização e composição bioquímica extremamente complexa. Essa composição inclui proteínas que são altamente glicosiladas e possuem grupamentos fosfato carregados negativamente em suas cadeias laterais de carbono, o que afeta a carga eletrostática e contribui para a hidrofobicidade de superfície celular. Essa característica é importante para a aderência à superfície do hospedeiro, desempenhando assim, papel fundamental na interação parasito-hospedeiro (TRONCHIN et al., 2008).

Os propágulos infecciosos dos agentes da CBM conseguem se aderir as células epiteliais do hospedeiro devido à essa hidrofobicidade que se dá pela presença de polissacarídeos extracelulares hidrofílicos e outros compostos como peptidases e glicosfingolipídios, depois de se aderirem as células se diferenciam para células muriformes que são resistentes à destruição por células do hospedeiro, permitindo assim o estabelecimento da doença (FENG, HOOG, 2017).

Moléculas relacionadas com adesão tem sido descritas em *F. pedrosoi*. Uma adesina de superfície semelhante à lectina foi descrita como uma estratégia de adesão de *F. pedrosoi* às células hospedeiras (SANTOS et al., 2007). Limongi e colaboradores (1997) utilizaram células apresentando mutações em seus padrões de glicosilação a fim de observar o processo de adesão às células hospedeiras por *F. pedrosoi*. Este estudo sugeriu que as células conidiais expressam adesinas do tipo lectina com afinidade para manose e N-acetilglucosamina, sendo que a manose estava aparentemente envolvida na etapa de adesão enquanto N-acetilglucosamina na internalização fúngica (LIMONGI et al., 1997)

A entrada dos patógenos na célula hospedeira é iniciada pela ligação a superfície e seguida pela internalização. A adesão e invasão de *F. pedrosoi* nas células epiteliais e macrófagos também foram associadas à ação de proteínas cinases. Macrófagos, células

epiteliais e conídios de *F. pedrosoi* foram pré-tratados com inibidores de proteína cinase sestaurosporina, genisteína e calfofostina antes da infecção em um estudo realizado por Limongi e equipe (2003) e observaram que o pré-tratamento interrompeu a invasão das células epiteliais e que a estaurosporina diminuiu a adesão e invasão dos conídios aos macrófagos. Apesar de não ter sido observado efeito na interação com macrófagos, esse estudo sugeriu que a maquinaria associada a proteínas cinases é necessária para invasão de células não fagocíticas durante o processo ativo de penetração de células fúngicas nas células do hospedeiro (LIMONGI et al., 2003).

3.2 Melanina

Apesar do conhecimento das melaninas fúngicas se darem desde o início dos anos 60, sua importância na patogênese ainda é um assunto atual (LANGFELDER et al., 2003) e isso se deve ao fato de sua estrutura ainda não ser completamente definida (NOSANCHUK, STARK, CASADEVALL, 2015). As melaninas são macromoléculas formadas pela polimerização oxidativa de compostos indólicos e/ou fenólicos, carregados negativamente e de alto peso molecular, que resultam principalmente em pigmentos de cor preta ou marrom (LANGFELDER et al., 2003, NOSANCHUK, STARK, CASADEVALL, 2015). Vários tipos de melaninas foram identificados para fungos, porém, há dois tipos mais importantes: DHN-melanina, nome dado devido a um intermediário da via (1,8-di-hidroxi-naftaleno) e DOPA-melanina, nome dado devido a um precursor da via (L-3,4-di-hidroxi-naftaleno) (LANGFELDER et al., 2003).

Inicialmente, na síntese da DHN-melanina, malonil-CoA é convertido ao primeiro intermediário detectável da via, o 1,3,6,8-tetra-hidroxi-naftaleno (1,3,6,8-THN) pela poliketídeo sintase que posteriormente é reduzido por uma redutase específica produzindo esclatona. Essa esclatona é desidratada à 1,3,8-tri-hidroxi-naftaleno e posteriormente reduzida à vermelona que novamente é desidratada, levando ao intermediário que nomeia a via, o 1,8-di-hidroxi-naftaleno (1,8-DHN). Acredita-se que as etapas posteriores envolvam dimerização das moléculas de 1,8-DHN seguida de polimerização possivelmente por uma laccase. A DOPA-melanina, por sua vez, pode ser derivada de dois subgrupos de enzimas, as lacases e as catecol oxidases (mais conhecidas como tirosinases). As lacases catalisam a oxidação de di-hidroxifenóis em

quinonas, já as tirosinases catalisam a oxidação em duas etapas da tirosina. Em geral, a lacase ou a tirosinase catalisam a hidroxilação de L-tirosina em dopaquinona ou de L-DOPA em dopaquinona. A hidroxilação e posterior descarboxilação produzem di-hidroxiindois, que polimerizam formando a DOPA-melanina (LANGFELDER et al., 2003).

A presença da melanina tem sido descrita como um importante fator de virulência, uma vez que este pigmento possui propriedades antioxidantes, de ligação a metais, termoestável, anti-radioativas, de fotoproteção, proteção contra desidratação, estressores químicos e mecânicos, bem como contra as respostas imunológicas do hospedeiro (CORDERO, CASADEVALL, 2017; CUNHA et al., 2010). A melanina presente nos patógenos fúngicos geralmente é localizada na parede celular; em *F. pedrosoi* é relatado a produção constitutiva de melanina em organelas chamadas de melanossomas pela via DHN, sendo elas produzidas nessas regiões e depois transportadas para a parede celular (ALVIANO et al., 1991; CUNHA et al., 2010; REVANKAR, SUTTON, 2010). Cunha e colaboradores (2005) utilizaram um inibidor da síntese de melanina, o triciclazol, em culturas de *F. pedrosoi* a fim de observar a susceptibilidade de células de *F. pedrosoi* deficientes na produção de melanina contra macrófagos de camundongos. Neste estudo foi possível observar que células de *F. pedrosoi* com produção de melanina comprometida são mais susceptíveis à morte por macrófagos em um período de 24h comparado às células de *F. pedrosoi* que eram capazes de produzir o pigmento (CUNHA et al., 2005).

Um trabalho realizado por van de Sande e colaboradores (2007) demonstrou que a presença de melanina tornava cepas de *Madurella mycetomatis*, um fungo melanizado que ocasiona a doença eumicetoma, menos susceptíveis a fármacos como cetoconazol e itraconazol (VAN DE SANDE et al., 2007). Outro estudo demonstrou que cepas não melanizadas de *Wangiella dermatitidis*, agente causador de feohifomicose, foram menos virulentas em camundongos, comparado a cepas que produziam melanina, implicando na associação da melanina à virulência (DIXON et al., 1992). Um estudo realizado mais recentemente apontou que cepas de *Fonsecaea monophora* não melanizadas são mais susceptíveis à antifúngicos, ao estresse oxidativo e que a virulência foi atenuada em *Galleria mellonella* (XIAO, XING et al., 2021).

Ensaios utilizando o inibidor da síntese de melanina, o triciclazol, mostraram que a mesma tem sido relacionada a morfologia fungica. Os resultados obtidos apontaram que a deficiência na síntese de melanina não afetava a viabilidade das células de *F. pedrosoi*, mas sim a topografia celular, pois diminuiu a quantidade de grânulos eletrodensos na superfície celular de conídios e células escleróticas. Foi possível observar também que as células escleróticas apresentavam invaginações na parte interna da parede celular, sugerindo que a melanina assumia papel na estruturação correta da parede celular fúngica, uma vez que a ausência da mesma diminuiu a robustez das células. (FRANZEN et al., 2006). O estudo e conhecimento sobre melaninas fúngicas envolvendo aspectos como síntese, armazenamento e transporte se fazem cada vez mais necessários, pois podem fornecer estratégias para o desenvolvimento de drogas ativas que possam interferir sobre esse importante fator de virulência, bem como fornecer maior entendimento a respeito da influência que estas estruturas assumem na patogênese (FRANZEN et al., 2008).

3.3 Termotolerância

O ambiente de organismos saprófitos fornece uma série de componentes necessários à sua sobrevivência, tais como fontes de nutrientes essenciais, íons, metais, gases atmosféricos e ainda pH e temperatura moderados (COONEY, KLEIN, 2008). Porém, os fungos patogênicos após invadirem um hospedeiro humano deparam-se com diversas barreiras para estabelecer o processo infeccioso devido às mudanças drásticas encontradas nesse novo ambiente. Barreiras como resposta imunológica do hospedeiro, privação de nutrientes essenciais, concentrações de dióxido de carbono e oxigênio diferentes daquelas encontradas no ambiente e ainda temperaturas restritivamente altas do corpo humano. Nesse sentido, os patógenos desempenham diferentes mecanismos em respostas a tais barreiras para obter sucesso no processo infeccioso (COONEY, KLEIN, 2008; NICHOLS, PERFECT, ALSPAUGH, 2007).

Alguns fungos assumem variação na sua morfologia, os quais são conhecidos como fungos dimórficos. Dentre estes, há os fungos termodimórficos, que apresentam mudanças morfológicas em resposta à mudança de temperatura, tais como os fungos patogênicos: *Histoplasma capsulatum*, *Penicillium marneffei*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Paracoccidioides lutz* e *Blastomyces dermatitidis* que em temperatura

ambiente apresentam morfologia de micélio e em temperaturas elevadas apresentam morfologia de leveduras (COONEY, KLEIN 2008, GAUTHIER, 2015).

Acredita-se que estas estratégias estejam relacionadas ao sucesso que a mudança morfológica pode promover à sobrevivência do patógeno em seu hospedeiro, como é o caso do fungo patogênico *H.capsulatum*, que é encontrado no ambiente na forma de hifas. Quando o solo é revirado, os propágulos dos micélios aerossolizam e são inalados pelo hospedeiro e se instalam no pulmão. Uma vez inalados, os propágulos dão origem a leveduras. Assim, formas de hifas têm a capacidade de responder a estímulos ambientais, tais como a diferença de temperatura encontrada no solo e no hospedeiro, alterando seu programa de desenvolvimento (INGLIS et al., 2013).

O nível de virulência também tem sido associado à tolerância e sensibilidade à temperaturas elevadas em cepas de *H. capsulatum*. As cepas consideradas virulentas para camungos (G1844A e G222B) e com baixo nível de virulência (Downs) foram submetidas a 37°C para induzir a transição morfológica. Todas as cepas demonstraram transição, porém as cepas G1844A e G222B demonstraram mudanças fisiológicas (concentração de ATP, taxa de respiração e componentes do transporte de elétrons) menos severas do que a cepa Down. Foi considerado que a sensibilidade a temperatura elevada é um fator-chave responsável pelas diferenças na virulência de cepas de *H. capsulatum* (MEDOFF et al., 1986). Foi encontrado também que as cepas Down tem expressão menos induzida do gene da proteína HSP70 a 37°C do que cepas virulentas (G222B) e que os baixos níveis de transcrição desse gene esteja relacionado a sua sensibilidade a temperatura e baixo nível de virulência (CARUSO et al., 1987). Para *Saccharomyces cerevisiae* foi encontrado que a termotolerância é um fator que permite diferenciar cepas clínicas de cepas industriais uma vez que as cepas de isolados clínicos são capazes de crescer à 42°C, diferentemente de cepas industriais. Esta temperatura é capaz de inibir o crescimento da maioria das cepas de laboratório. Nesse sentido a termotolerância observada em cepas clínicas de *S. cerevisiae* é uma característica considerada um traço de virulência a qual pode ajudar a explicar a presença desses isolados em hospedeiros humanos (MCCUSKER, et al., 1994).

Dentre os fungos que não são dimórficos dependentes de temperatura destaca-se o *Aspergillus fumigatus* que tem sido descrito como um patógeno oportunista que

apresenta a termotolerância como uma característica crítica para estabelecer a infecção no hospedeiro (NIERMAN et al., 2005). Este patógeno tem demonstrado algumas estratégias para se adaptar a altas temperaturas. Sueiro-Olivares e grupo (2015) avaliaram o perfil transcriptômico de *A. fumigatus* cultivados à 24 e 37°C, e observaram que o aumento de temperatura induziu genes envolvidos à vias metabólicas relacionadas a virulência, tais como biossíntese de gliotoxina, metabolismo de nitrogênio e ferro e nove genes que codificam alérgenos (SUEIRO-OLIVARES et al., 2015). A termotolerância em *Cryptococcus neoformans* tem sido associada à expressão de alguns genes, tais como RAS1, que apesar de ser dispensável para o crescimento normal a 24°C, se mostrou necessário para o crescimento a 37°C. Além disso, a ausência do gene tornou a cepa avirulenta em coelhos. Como a ausência do gene não afetou os fatores de virulência bem descritos para *C. neoformans* (melanina, cápsula) atribui-se que o fenótipo avirulento era diretamente atribuível ao crescimento sensível à temperatura (ALSPAUGH et al., 2000).

Outra resposta que fungos patogênicos humanos desenvolveram frente ao estresse ocasionado por temperaturas elevadas foi a expressão de genes responsáveis pela síntese de proteínas que lhe conferem proteção ao estresse térmico (LAURENT-WINTER, IBRAHIM-GRANET, 1992) as quais são conhecidas como proteínas de choque térmico ou HSPs (do inglês heat shock proteins) (LINDQUIST, CRAIG, 1988). Apesar de suas funções ainda não serem tão claras, as HSPs tiveram suas estruturas altamente conservadas ao longo da evolução, o que pode significar que a presença destas é crucial para a sobrevivência dos organismos que as expressam (GAO et al., 2016). Acredita-se que elas estejam envolvidas no reparo de proteínas que se desdobram e se agregam devido a mudanças de temperatura, promovendo a degradação destas proteínas mal dobradas ou se ligando a intermediários dobráveis a fim de impedir a agregação e também reativando proteínas que já se agregaram (QUEITSCH et al., 2000).

Os fungos negros têm sido referidos como microrganismos termotolerantes, os quais têm potencial de crescer em temperaturas entre de 37°C e 45°C (SEYEDMOUSAVI et al., 2014). O fungo negro *W. dermatitidis*, um patógeno humano responsável por ocasionar feohifomicose cutânea e disseminada, demonstrou potencial crescimento em uma ampla variação de temperaturas. Treze isolados deste microrganismo foram submetidos ao crescimento sob condições de temperatura de 25,

37, 40, 45 e 50°C. Todos os 13 isolados mostraram crescimento ótimo até 40°C. Essa capacidade de *W. dermatitidis* de crescer à 40°C tem sido útil no diagnóstico de feohifomicose, uma vez que este fungo pode ser facilmente confundido com *Exophiala jeanselmei*, que por sua vez não apresenta crescimento em temperaturas acima de 37°C (PADHYE, MCGINNIS, AJELLO, 1978).

A resposta ao choque térmico também foi observada para *F. pedrosoi* em um estudo realizado por Laurent-Winter e Ibrahim-Granet (1992) no qual o fungo foi submetido à temperatura de 45°C em intervalos de 30 e 90 minutos. No período de 30 minutos foram observadas 26 novas proteínas que eles chamaram de primeiras HSPs enquanto que em 90 minutos foram observadas 6 novas proteínas que eles chamaram de HSPs tardias, as quais não estavam presentes em 30 minutos. Eles observaram que os primeiros 30 minutos de incubação são cruciais para o metabolismo fúngico, uma vez que a maioria das HSPs foram induzidas neste período de incubação. O trabalho concluiu que *F. pedrosoi* dispõe de mecanismos de resposta ao estresse de temperatura e apontou a necessidade de análises moleculares para melhor compreender a forma pela qual estes fungos regulam seu metabolismo de tal forma que são capazes de crescer em altas temperaturas (LAURENT-WINTER, IBRAHIM-GRANET, 1992).

Sendo assim, altas temperaturas, como a temperatura corporal dos mamíferos, que é significativamente mais elevada que a temperatura que fungos patogênicos encontram no ambiente, tem sido um desafio importante para fungos que estabelecem infecções humanas, de forma que a termotolerância e os mecanismos relacionados a esse fator de virulência têm sido descritos como características cruciais para patogênese (BLOOM et al., 2019).

4. Proteômica no estudo da termotolerância de fungos

Os fungos são capazes de detectar pequenas mudanças no ambiente por meio de sistemas sensoriais e regulatórios, o que é essencial a sua sobrevivência, pois essa percepção é capaz de induzir alterações transcricionais e traducionais necessárias para resistir a tais mudanças (COONEY, KLEIN, 2008). Com o objetivo de elucidar os processos regulatórios em seus mais diferentes níveis celulares, muitos pesquisadores têm se apoiado nos estudos “ômicos” para melhor compreender e monitorar os

processos e respostas celulares pelos quais os microrganismos utilizam (OTTO et al., 2012). Uma das vertentes é a proteômica, área do estudo que identifica e quantifica proteínas, suas modificações pós-traducionais e as mais diversas propriedades dessas moléculas, objetivando descrições detalhadas da estrutura e função (PATTERSON, AEBERSOLD, 2003; KRISTENSEN et al., 2010). A proteômica é uma área amplamente utilizada a fim de compreender a dinâmica de sistemas biológicos. Por meio desta vertente, é possível obter um levantamento das proteínas que participam ativamente dos mecanismos de resposta de uma célula (MONTEIRO et al., 2012; OTTO et al., 2012) considerando as modificações traducionais e pós-traducionais que controlam diretamente o estado funcional celular (JAMESDANIEL, SALVI, COLING, 2009).

A proteômica fúngica, especialmente, obteve significativo avanço com a disponibilidade de múltiplas sequencias de genomas e por meio do avanço tecnológico das ferramentas analíticas (DOYLE, 2011). Esses estudos vêm sendo impulsionados na necessidade de se compreender a natureza patogênica dos fungos, bem como o potencial biotecnológico das enzimas que estes organismos possam apresentar e ainda nas consequências clínicas das infecções fúngicas. E visando compreender a complexidade da bioquímica fúngica, a proteômica fornece informações definitivas como identidade proteica, localização, modificação pós-traducional e modelos *in silico* da predição de genes em fungos, tornando-se um componente integral de todas as abordagens ômicas e de sistemas em grande escala (DOYLE, 2011). Portanto, conhecer as proteínas que participam dos processos metabólicos de um organismo é de grande importância, pois estas moléculas estão presentes na maioria das atividades biológicas e, em conjunto, fornecem uma ampla compreensão da dinâmica e dos sistemas biológicos pelos quais elas participam (PATTERSON, AEBERSOLD, 2003).

A temperatura é um fator que afeta diretamente a dinâmica das proteínas e o crescimento dos fungos. Quando os patógenos se deparam com aumento de temperatura, seu metabolismo é alterado e as vias de resposta ao calor são iniciadas. O perfil proteômico obtido pela mudança de temperatura pode ser então utilizado para entender as mudanças fisiológicas que ocorrem nas células fúngicas. Nesse sentido, muitos estudos têm utilizado da abordagem proteômica para melhor compreender os mecanismos de adaptação de fungos patogênicos à temperatura do hospedeiro. Análises

comparativas de perfis proteômicos desempenham papel fundamental para compreender mudanças na abundância de proteínas. Tais análises podem fornecer informações de vias específicas de respostas ao estresse por temperatura bem como de moléculas que podem assumir perfil de biomarcadores ao estresse (BAKAR, KARSANI, ALIAS, 2020).

Estudos que envolvem resposta proteômica de fungos ao estresse de temperatura têm sido realizados com diversas espécies de fungos patogênicos. Guimarães e colaboradores (2011) investigaram o efeito da mudança de temperatura no proteoma de *H.capsulatum*. Este trabalho revelou que os níveis de Hsp60, um antígeno imunodominante e principal ligante de superfície para receptores CR3 em macrófagos, eram aumentados tanto no citoplasma quanto na parede celular sob estresse de temperatura. Foi observado também que a Hsp60 interagia com diferentes proteínas conforme a temperatura aumentava, as quais participam de diversos processos metabólicos. Este trabalho concluiu que, Hsp60 é um regulador chave de diversos processos celulares como sinalização celular, replicação e expressão de proteínas associadas à virulência (GUIMARAES et al., 2011).

Análises proteômicas envolvendo a expressão de genes e proteínas envolvidos na resposta à temperatura do hospedeiro também tem sido utilizados a fim de investigar os mecanismos pelos quais fungos patogênicos utilizam durante o estabelecimento da infecção. O fungo *P.brasiliensis* é encontrado em seu ambiente na morfologia de micélio, porém quando este se depara com temperaturas elevadas, como aquela encontrada em seu hospedeiro, assume morfologia de levedura. Com o objetivo de compreender os possíveis mecanismos moleculares que direcionam a morfogênese de *P. lutzii*, Rezende e sua equipe (2011) comparou o perfil proteômico deste patógeno nas fases de micélio, transição de micélio para levedura e na fase de levedura. Foi obtido um total de 18, 30 e 33 proteínas diferencialmente expressas, respectivamente. Foi possível observar na fase de micélio a presença de uma superóxido dismutase de Mn que é uma proteína envolvida na prevenção do estresse oxidativo nas mitocôndrias, além de uma peroxirredoxina, que é uma enzima antioxidante com potencial de redução para diversas moléculas. Foi relatado ainda que na fase micelial o metabolismo é predominantemente aeróbio comparado a fase de levedura. Durante a fase de transição as proteínas estavam categoricamente relacionadas ao resgate e defesa celular e foram

identificadas várias HSPs. Na fase de levedura por sua vez, foram categorizadas proteínas envolvidas na via glicolítica, ciclo do glioxilato, e também proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídios. De modo geral, este trabalho proporcionou uma visão integrada da reorganização metabólica durante a morfogênese de *P. brasiliensis* (REZENDE et al., 2011).

A abordagem proteômica auxiliou na elucidação de componentes protéicos de vesículas secretadas por *C.neoformans* (RODRIGUES et al., 2008) as quais estão diretamente envolvidas na virulência deste patógeno. A proteômica revelou que as vesículas continham em sua composição proteínas de choque térmico, superóxido dismutase e ainda reguladores de transdução de sinal (RODRIGUES et al., 2008). Albrecht e grupo (2010) também submeteram *A. fumigatus* ao estresse de temperatura e observaram a regulação positiva de proteínas envolvidas no enovelamento de proteínas, transcrição, tradução e estresse oxidativo (ALBRECHT ET AL., 2010).

Os estudos que se apoiam em abordagens proteômicas têm cada vez mais auxiliado na compreensão dos mecanismos utilizados por patógenos fúngicos para o desenvolvimento do processo infeccioso. Tais estudos apontam as estratégias utilizadas por estes microrganismos e presumem as rotas que lhe são necessárias para resistir às reações imunes bem como para se adaptar as condições de estresse dentro do hospedeiro (DO AMARAL et al., 2019).

Nesse sentido, a abordagem proteômica pode auxiliar em uma compreensão mais abrangente dos mecanismos de termotolerância e adaptações metabólicas que *F. pedrosoi* assume em resposta a temperatura do hospedeiro durante a infecção.

5. JUSTIFICATIVA

Fonsecaea pedrosoi tem sido descrito como o principal agente etiológico da cromoblastomicose no Brasil. Esta doença considerada negligenciada, afeta a pele e tecidos subcutâneos e acomete em maioria indivíduos desfavorecidos, engajados em atividades rurais, levando estes à incapacidade produtiva. A habilidade de *F. pedrosoi* sobreviver a temperaturas elevadas, como a do hospedeiro, tem sido descrita como um fator de grande importância para a virulência deste microorganismo. Porém, pouco se sabe sobre os mecanismos pelos quais este patógeno utiliza para sobreviver e se adaptar ao ambiente do hospedeiro. Trabalhos envolvendo respostas e mecanismo de adaptação de patógenos fúngicos tem sido bem realizado para os casos de fungos termodimórficos, já para fungos dimórficos não dependentes de temperatura, como é o caso de *F. pedrosoi*, pouco se sabe. A escassez de dados referentes a respostas metabólicas frente à temperatura do hospedeiro se estende para os demais fungos negros causadores de CBM.

Nesta perspectiva, uma abordagem proteômica que visa identificar e caracterizar o proteoma, bem como descrever mecanismos de resposta adotados por *F. pedrosoi* em uma condição que mimetiza uma característica do hospedeiro mostra-se de suma importância. Atentando-se a necessidade da utilização de novas abordagens para melhor compreender as respostas que este patógeno assume durante a infecção, o presente estudo faz-se de tamanha relevância uma vez que a abordagem utilizada é pioneira para *F. pedrosoi*.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo geral

Caracterizar o proteoma do patógeno humano *F. pedrosoi* submetido a temperatura do hospedeiro (37°C).

6.2 Objetivos específicos

- Verificar o efeito da temperatura de 37°C em culturas do *F. pedrosoi*;

- Identificar as proteínas reguladas por 37°C de *F. pedrosoi* submetido à 28 e 37°C por cromatografia líquida e espectrometria de massas;
- Classificar funcionalmente as proteínas identificadas;
- Propor um modelo para as mudanças metabólicas induzidas pela mudança de temperatura;
- Avaliar os efeitos da temperatura 37°C de sobre o consumo de glicose nas culturas de *F. pedrosoi*;
- Avaliar os efeitos da temperatura 37°C sobre o conteúdo de quitina nas células de *F. pedrosoi*.

7. MATERIAIS E MÉTODOS

7.1 Cultivo do fungo

Células da cepa CBS 27.137 do fungo *F. pedrosoi* foram cultivadas em meio Batata Dextrose Ágar (BDA) pH 5,6 e mantidas à 22°C por 14 dias. Para obtenção das proteínas, as células foram inoculadas em meio Sabouraud líquido (0,5% de extrato de carne, 0,5% de peptona de caseína e 4% de glicose) à 28°C, sob agitação de 150 rpm por 7 dias. Após esse período, as células foram centrifugadas, lavadas por 3 vezes com tampão fosfato salino (PBS) e a massa celular foi transferida para novos meios Sabouraud líquido e cultivadas por 24 horas, sendo uma condição de crescimento à 28°C e a outra condição à 37°C, ambas sob agitação de 150 rpm. As etapas foram realizadas em triplicata biológica.

7.2 Obtenção dos extratos proteicos

Após o crescimento por 24 horas as culturas foram coletadas em sistema de filtração utilizando papel filtro qualitativo. As células retidas no filtro foram transferidas para microtubos contendo micropérolas de vidro e tampão bicarbonato de amônio 50mM, pH 8,0. Sequencialmente, foram submetidas à lise em aparelho Beadbeater (*Biospec Products Inc*) por 8 ciclos de 30 segundos, com intervalos de 1 min no gelo. O lisado contendo as proteínas citoplasmáticas foi transferido para novos tubos e centrifugado 5 vezes a 14.000 x g por 15 min à 4°C. O sobrenadante foi transferido para

novos tubos e armazenados a -80°C . Os extratos proteicos intracelulares foram quantificados utilizando o método de Bradford utilizando solução de albumina de soro bovino (BSA) para a curva padrão (Bradford, 1976). A integridade das proteínas foi verificada por eletroforese SDS-PAGE.

7.3 Eletroforese unidimensional (SDS-PAGE)

Para avaliar a integridade do extrato proteico, volumes referentes a $10\ \mu\text{g}$ de proteína foram misturadas com tampão de amostra [Tris-HCl $0,2\ \text{M}$ pH 6,8, SDS 40% (v/v), glicerol 20% (v/v), β -mercapto etanol 20% (v/v) e traços de azul de bromofenol] e aquecidas à 100°C por 10 minutos. A seguir, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE (12%) (WALKER, 1996). O gel contendo os extratos proteicos foi corado com Azul de Coomassie (*Plus One Coomassie Tablets Phast Gel Blue R-350, GE Healthcare*) e depois descorado em solução descorante [Metanol 5% (v/v), ácido acético 10% (v/v)].

7.4 Digestão trípica do extrato proteico

A digestão trípica foi realizada com $150\ \mu\text{g}$ de proteína como descrito por Da Silva Rodrigues et al. (2016); Murad et al. (2011) com adaptações. Em suma, as amostras sofreram ação do surfactante RapiGEST™ [0,2% (v/v)], sendo utilizado $25\ \mu\text{L}$ para cada $50\ \mu\text{g}$ de extrato proteico (*Waters Corporation, Milford, MA*) por 15 minutos à 80°C . Após, foi adicionado $2,5\ \mu\text{L}$ de DTT $100\ \text{mM}$ (*Dithiotreitol, GE Healthcare*) nas amostras e as mesmas foram incubadas por 30 minutos à 60°C a fim de reduzir pontes dissulfeto. Em seguida, foi adicionado $2,5\ \mu\text{L}$ de iodoacetamida $300\ \text{mM}$ (*GE Healthcare*) seguido de incubação ao abrigo de luz por 30 minutos e em temperatura ambiente para alquilação de cisteínas. As amostras foram digeridas por meio da adição de $40\ \mu\text{L}$ de tripsina $50\ \text{ng}/\mu\text{g}$ (*Promega, Madison, WI, USA*) à 37°C por 16 horas. As amostras foram por fim centrifugadas à $14000\times g$ por 30 minutos à 4°C . O sobrenadante obtido foi transferido para novos tubos e os mesmos foram secos à vácuo. Após a secagem, o digesto foi ressuspenso em formiato de amônio $20\ \text{mM}$, acrescido de fosforilase B de coelho ($200\ \text{fmol}/\mu\text{L}$, *Mass PREP™ Digestion Standart, Waters*), utilizado como padrão endógeno de quantificação.

7.5 Análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (Nano UPLC-MS^E), análise *in silico* e identificação das proteínas

Os peptídeos trípticos gerados após a digestão com tripsina foram separados por cromatografia líquida em nano escala com o auxílio do sistema NanoACQUITY UPLC Waters. Os dados de MS obtidos foram processados e examinados com o auxílio do software *Protein Lynx Global Server* (PLGS) versão 3.0.2 (Waters Corporation, Manchester, UK) (MURAD et al., 2011). As amostras foram analisadas em três réplicas (BAILAO et al., 2014). A identificação das proteínas e as análises do nível de quantificação seguiram como descrito anteriormente (MURAD, RECH, 2012, BAILAO et al., 2014) na qual a busca foi realizada utilizando o banco de dados do genoma de *F.pedrosoi* CBS 271.37 (<https://www.uniprot.org/taxonomy/1442368>).

As análises *in silico* foram realizadas por busca de similaridades de sequências e domínios em bancos de dados juntamente com suporte em ferramentas de bioinformática. As ferramentas utilizadas foram BLASTP – Basic Local Alignment Search Tool disponibilizadas em banco de dados do NCBI – National Center for Biotechnology Information (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e UNIPROT (<https://www.uniprot.org/>) onde as sequências das proteínas obtidas para *F. pedrosoi* foram submetidas à busca de similaridade as com sequências já disponíveis neste bancos de dados que disponibilizam sequências já descritas para outros organismos. As proteínas que não foram anotadas automaticamente de acordo com o banco de dados do genoma de *F. pedrosoi* foram manualmente anotadas. A proteínas então identificadas foram submetidas ao banco de dados KEGG – Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (<https://www.genome.jp/kegg/>) à fim de categorizar funcionalmente as proteínas reguladas. As categorias funcionais foram anotadas de acordo com o esquema de classificação FunCat2 (RUEPP et al., 2004). As proteínas identificadas com uma diferença de alteração de pelo menos 1,2 entre as condições foram consideradas reguladas positivamente (ASSUNCAO et al., 2020).

7.6 Dosagem de glicose

A concentração de glicose das culturas de *F. pedrosoi* foi determinada utilizando o kit Bioclin Glucose Monoreagent (K082, QUIBASA QUIMICA BÁSICA Ltda, Belo Horizonte, Brasil). As células foram incubadas por 24, 48 e 72 horas nas temperaturas

de 28 e 37°C e o sobrenadante das culturas foi utilizado para dosagem de glicose de acordo com as instruções do fabricante. As dosagens foram realizadas em triplicata. A partir disso, Test-T de Student foi utilizado para verificar a diferença estatística entre as culturas de 28 e 37°C, considerando significantes os valores de $p \leq 0,05$.

7.7 Dosagem de quitina

Células de *F. pedrosoi* cultivadas nas diferentes condições de temperatura foram coletadas por centrifugação à 3500 x g, lavadas e ressuspensas em PBS. As células foram tratadas por 30 minutos com Calcofluor White (Sigma-Aldrich). Após o tratamento, as células foram lavadas com PBS e analisadas por microscopia de fluorescência (Zeiss AxioCam MRC-Scope A1) utilizando filtro com faixa de comprimento de onda de 300 à 433nm. Os dados relativos à densidade de pixels (D) e a área (A em μm^2) das células obtidos a partir da análise das fotomicrografias de campo escuro através do software *Axion Vision V 4.8.2.0* (Carl Zeiss AG, Alemanha). A razão entre essas duas variáveis (D/A indica a intensidade de fluorescência (IF) dessas células. O ensaio foi realizado em triplicata nos tempos de 24 e 72 horas, sendo que para cada réplica, três réplicas foram utilizadas para calcular a IF. A partir disso, Test-T de Student foi utilizado para verificar a diferença estatística entre as culturas de 28 e 37°C, considerando significantes os valores de $p \leq 0,05$.

8. Resultados e discussão

8.1 Crescimento de *F. pedrosoi*

Para avaliar os efeitos da temperatura no crescimento de *F. pedrosoi*, este fungo foi submetido à 28 e 37°C. Foi possível observar que as culturas apresentam um perfil diferencial frente a essa variação de temperatura, no qual as culturas de 37°C apresentaram crescimento lento comparado às culturas de 28°C e, além disso, a produção de melanina também aparentou estar menor a 37°C (Figura 5).

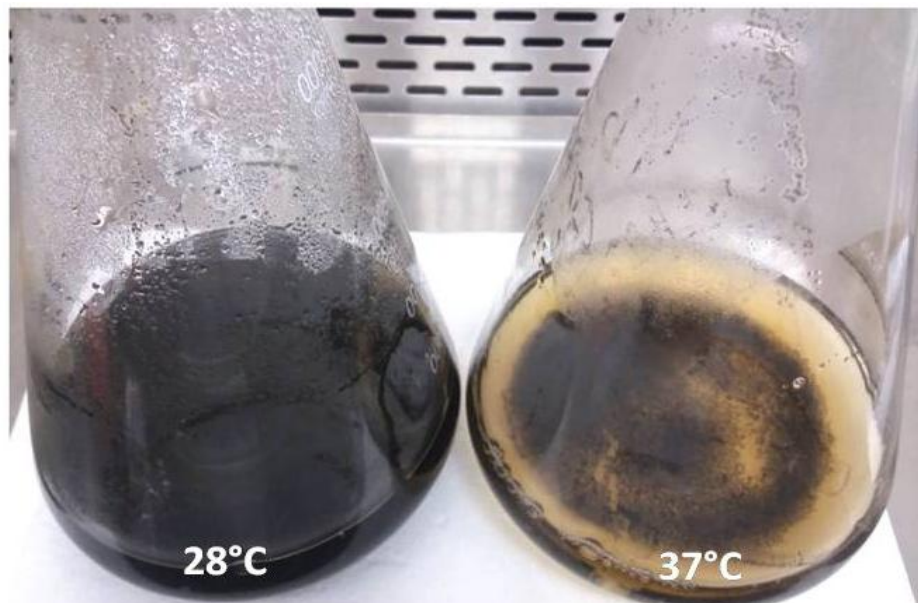


Figura 5: Crescimento de *F. pedrosoi* em diferentes condições de temperatura (28 e 37°C).

Esses dados sugerem que o estresse de temperatura afeta o crescimento de *F. pedrosoi* e também a síntese de melanina deste patógeno. Acredita-se que essa diferença de crescimento ocorra devido mudanças provocadas na parede celular. Hazen e Hazen (1987) encontraram perfil similar para culturas de *Candida albicans*, onde observou-se que à 37°C, as culturas demonstraram germinar menos em relação as culturas cultivadas em temperatura ambiente (23-25°C). Este estudo sugeriu que ocorram mudanças na composição da membrana e parede celular de *C. albicans* (HAZEN, HAZEN, 1978). Para *A.fumigatus* foi encontrado que o aumento de temperatura afetou a pigmentação, uma vez que culturas à 37°C se apresentaram menos pigmentadas em relação a culturas à 25°C, sugerindo uma regulação dependente de temperatura (HAGIWARA et al., 2017). O mesmo foi encontrado para espécies de *Sporothrix* onde 26 cepas foram inoculadas nas temperaturas de 22, 30 e 37°C e apenas 6 cepas demonstraram melanização à 37°C sugerindo que as demais cepas tiveram a taxa de melanização influenciada devido a mudanças morfológicas ou ainda por diferenças nos mecanismo de melanização (ALMEIDA-PAES et al., 2009).

8.2 Obtenção de extratos proteicos

Os extratos proteicos de *F. pedrosoi* foram obtidos e avaliados qualitativamente por SDS-PAGE. Como mostrado na Figura 6, os seis extratos correspondentes as triplicatas dos cultivos a 28 e 37°C apresentam bandas de alto a baixo peso molecular

sem a presença de arrastes, indicando integridade dos mesmos. Foi possível observar que o perfil é conservado nas réplicas das mesmas condições e que entre as diferentes condições de temperatura a expressão de proteínas é diferencial.

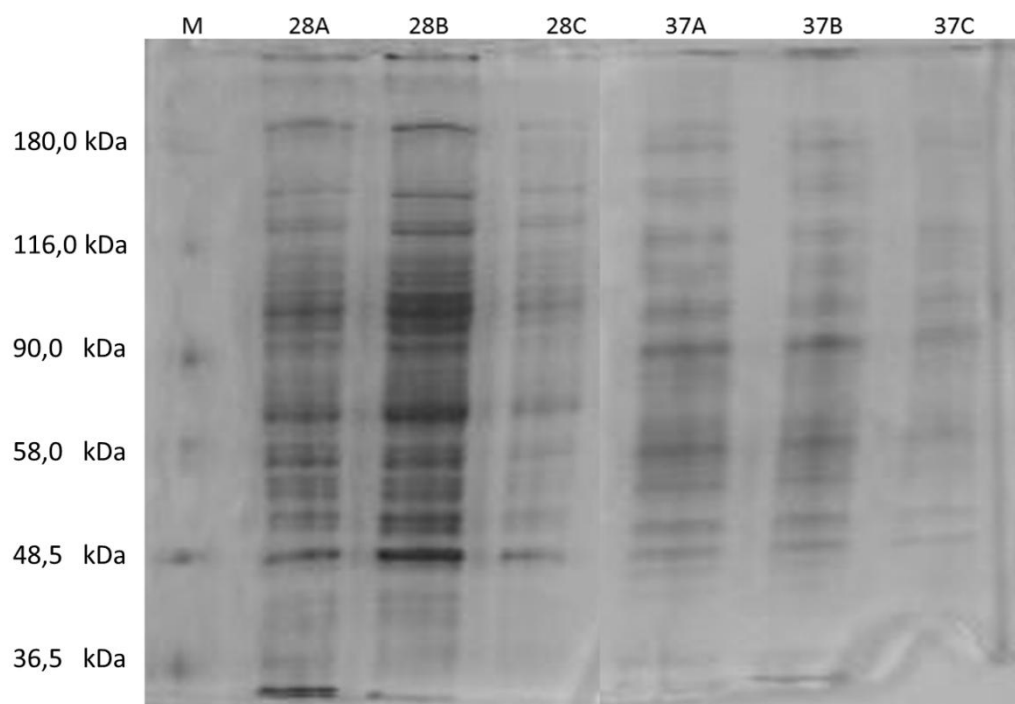


Figura 6: Eletroforese das proteínas intracelulares de *F. pedrosoi* cultivado à 28 e 37°C. A massa referente as bandas do marcador utilizado está indicado à esquerda. As linhas 28A, 28B e 28C são referentes ao perfil das proteínas das réplicas a 28°C e as 37A, 37B e 37C são referentes ao perfil das proteínas das réplicas de 37°C.

8.3 Análise proteômica de *F. pedrosoi*

Após digeridos, os extratos proteicos do isolado CBS 271.37 do fungo *F. pedrosoi* foram submetidos à análise proteômica na qual foi possível identificar um total de 525 proteínas. Deste total, 101 foram induzidas (19%) e 385 reprimidas (73%) quando submetidas à 37°C. Considerando as 101 proteínas induzidas, 49 correspondem a proteínas hipotéticas e/ou não caracterizadas (48%) e das 385 identificadas como reprimidas 154 não apresentam função conhecida (40%) (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1: Proteínas induzidas em *F. pedrosoi* cultivado à 37°C.

Nº de acesso	Descrição	Score	Fold Change
1. METABOLISMO			
1.1 Metabolismo de aminoácidos			
A0A0D2GAK1	Metilmalonato-semialdeído desidrogenase (acilação)	1411,9	4,437
A0A0D2DI83	2-oxo isovalerato desidrogenase subunidade alfa	690,08	37C
A0A0D2E3X0	4-aminobutirato transaminase	565,56	3,455
A0A0D2GNH7	Agmatinase	755,65	3,064
A0A0D2G8R3	Colina desidrogenase	1269,46	1,419
A0A0D2GD43	Aspartato aminotransferase	2895,72	1,665
A0A0D2GUG1	3-hidroxiisobutirato desidrogenase	1870,24	37C
A0A0D2DC68	Cetol-ácido redutoisomerase, mitocondrial	970,15	37C
1.2 Metabolismo de nucleotídeos			
A0A0D2GM33	Tiamina Tiazol Sintase	1669,18	37C
A0A0D2GPT6	Cisteínadessulfurase, mitocondrial	784,87	37C
1.3 Metabolismo de compostos de carbono e carboidratos			
A0A0D2GU81	Manitol-1-fosfato 5-desidrogenase	2548,4	2,293
A0A0D2E2B8	aldeído desidrogenase (NAD +)	4895,6	1,506
A0A0D2F177	Glicogênio [amido] sintase	699,97	37C
A0A0D2H689	Lactoilglutationaliase	1219,63	37C
1.4 Metabolismo de lipídeos, ácidos graxos e isoprenoides			
A0A0D2H5G4	Dihidroxiacetonaquinase	2478,64	1,750
A0A0D2E1D5	Acetil-CoA C-acetiltransferase	2880,56	1,233
A0A0D2GP70	Acil-CoA oxidase	798,14	37C
2. ENERGIA			
2.1 Glicólise e gliconeogênese			
A0A0D2GZA8	Fosfoglicomutase	792,39	37C
2.2 Vias do ácido tricarbóxico			
A0A0D2HE43	Citrato sintase	2224,18	1,616
A0A0D2GPU7	Subunidade de ferro-enxofre da succinato desidrogenase [ubiquinona], mitocondrial	904,76	37C
2.3 Transporte de elétrons e conservação de energia associada à membrana			
A0A0D2G643	Flavoproteínas transportadoras de elétrons	944,54	1,476
3. SÍNTESE DE PROTEÍNAS			
A0A0D2HLQ9	A proteína ribossômica 40S S5	1783,3	1,803
A0A0D2DN25	A proteína ribossômica 40S S3	1350,09	1,822
A0A0D2GQC7	A proteína ribossômica 40S S18	3665,76	2,075
A0A0D2DRL0	A proteína ribossômica 40S S28	2696,25	1,377
A0A0D2GSI6	A proteína ribossômica 40S S0	4518,27	1,896
A0A0D2GAQ8	A proteína ribossômica 40S S7	990,99	37C

Nº de acesso	Descrição	Score	Fold Change
A0A0D2GPH8	A proteína ribossômica 40S S11	809,93	37C
A0A0D2GCZ5	A proteína ribossômica 40S S9	916,11	37C
A0A0D2GDQ4	A proteína ribossômica 40S S6	2128,03	1,390
A0A0D2GLH8	Proteína associada a ribonucleoproteína	1583,62	3,819
4. DESTINO PROTEICO (dobramento, modificação e destino)			
A0A0D2GCW8	Proteína ribossômica L40 Ubiquitina-60S	1916,37	1,934
A0A0D2GS68	Proteína ribossômica S27a Ubiquitina-40s	1916,37	2,534
A0A0D2G0Y3	Tipo alfa da subunidade proteassoma	903,69	1,877
A0A0D2GG75	Tipo alfa da subunidade proteassoma	1894,44	2,944
A0A0D2H4M3	Aminopeptidase	882,36	2,075
A0A0D2GQQ0	Poliubiquitina	1923,98	2,664
A0A0D2FBD3	Domínio de proteína dissulfeto-isomerase	928,77	37C
A0A0D2DDW7	DNAJ como membro 2 da subfamília A	779,76	37C
A0A0D2G9Z2	Chaperone A específico de tubulina	1814,55	37C
A0A0D2GXA8	Proteína semelhante a Hsp90	11497,1	1,246
5. PROTEÍNA COM FUNÇÃO DE LIGAÇÃO OU REQUISITO DE COFATOR (estrutural ou catalítico)			
A0A0D2DYP5	14-3-3 proteína epsilon da família	25174,97	37C
6. COMUNICAÇÃO CELULAR/MECHANISMO DE TRANSDUÇÃO DE SINAL			
A0A0D2EVK1	Família Rab	1176,6	37C
A0A0D2G8T1	Subunidade reguladora de proteína quinase dependente de cAMP	983,77	37C
A0A0D2FFU4	Proteína de ligação a GTP rhoA	1509,16	37C
7. RESGATE CELULAR, DEFESA E VIRULÊNCIA			
A0A0D2HDB3	Catalase-peroxidase	9441,66	1,537
A0A0D2HNM9	Tioredoxina	8828,41	12,553
A0A0D2FGX9	Glutaredoxinamonotiol da família Grx4	2462,68	37C
A0A0D2DU80	Fosfoproteína 1 induzida por estresse	1720,51	37C
A0A0D2GY51	Superoxide dismutase	1247,95	13,065
8. BIOGÊNESE DE COMPONENTE CELULAR			
A0A0D2DU86	UTP - glicose-1-fosfato uridililtransferase	552,86	1,521
A0A0D2GV19	Cadeia beta da tubulina	1201,74	37C
9. NÃO CLASSIFICADO			
A0A0D2D9M9	Proteína hipotética	1502,7	1,750
A0A0D2GAS7	Proteína hipotética	1697,14	1,896
A0A0D2F6B1	Proteína hipotética	4434,39	2,247
A0A0D2H3C9	Proteína hipotética	882,62	3,158
A0A0D2E5F6	Proteína hipotética	1270,26	4,806
A0A0D2G984	Proteína hipotética	1854,7	1,221

N° de acesso	Descrição	Score	Fold Change
A0A0D2E6H2	Proteína hipotética	515,06	1,336
A0A0D2HJZ7	Proteína hipotética	3891,18	1,349
A0A0D2GZU3	Proteína hipotética	1212,75	2,159
A0A0D2GI01	Proteína hipotética	507,52	1,476
A0A0D2GYP1	Proteína hipotética	4065,91	1,233
A0A0D2E4R2	Proteína hipotética	2530,17	1,476
A0A0D2FEZ9	Proteína hipotética	8006,59	37C
A0A0D2H3F9	Proteína hipotética	1813,37	37C
A0A0D2FFY0	Proteína hipotética	809,31	37C
A0A0D2GY53	Proteína hipotética	1325,26	37C
A0A0D2FHG0	Proteína hipotética	1187,98	37C
A0A0D2H633	Proteína hipotética	1433,47	37C
A0A0D2E842	Proteína hipotética	1032	37C
A0A0D2GX68	Proteína hipotética	780,47	37C
A0A0D2HGI8	Proteína hipotética	979,79	37C
A0A0D2GRV9	Proteína hipotética	861,59	37C
A0A0D2GLK4	Proteína hipotética	1117,54	37C
A0A0D2DVI7	Proteína hipotética	1820,88	37C
A0A0D2HD57	Proteína hipotética	1377,08	37C
A0A0D2EYR6	Proteína hipotética	1748,96	37C
A0A0D2H4L2	Proteína hipotética	1452,42	37C
A0A0D2EZ54	Proteína hipotética	3936,07	37C
A0A0D2DPS0	Proteína hipotética	1085,62	37C
A0A0D2EZH4	Proteína hipotética	1136,94	37C
A0A0D2EZY0	Proteína hipotética	1414,82	37C
A0A0D2F0F6	Proteína hipotética	1125,34	37C
A0A0D2GII5	Proteína hipotética	842,66	37C
A0A0D2ETT5	Proteína hipotética	13796,19	37C
A0A0D2GGT2	Proteína hipotética	965,18	37C
A0A0D2EUX5	Proteína hipotética	1072,13	37C
A0A0D2GBS2	Proteína hipotética	1335,85	37C
A0A0D2DKT6	Proteína hipotética	901,37	37C
A0A0D2GIR7	Proteína hipotética	1312,27	37C
A0A0D2GJL1	Proteína hipotética	1239,79	37C
A0A0D2GEU7	Proteína hipotética	1149,95	37C
A0A0D2GF05	Proteína hipotética	824,85	37C
A0A0D2DD54	Proteína hipotética	3139,29	37C
A0A0D2GAJ0	Proteína hipotética	798,89	37C
A0A0D2G6E4	Proteína hipotética	2945,44	37C

N° de acesso	Descrição	Score	Fold Change
A0A0D2G7A8	Proteína hipotética	738,05	37C
A0A0D2G879	Proteína hipotética	912,91	37C
A0A0D2D9J2	Proteína hipotética	1070,67	37C
A0A0D2G6M2	Proteína hipotética	1598,61	37C

N° de acesso: obtido do banco de dados de *Fonsecaapedrosoi* disponível em:
<https://www.uniprot.org/taxonomy/1442368>

Score: valor correspondente ao número de peptídeos.

FoldChange: Mudança na abundância de proteínas após comparação a 28° C

37C: Proteínas identificadas apenas na condição 37° C.

Tabela 2: Proteínas reprimidas em *F. pedrosoi* após cultivo à 37°C.

Nº de acesso	Descrição	Score	Fold Change
1. METABOLISMO			
1.1 Metabolismo de aminoácidos			
A0A0D2GZD9	Desoxihipusina sintase	945,81	28C
A0A0D2FIP9	Proteína H do sistema de clivagem de glicina	5565,69	28C
A0A0D2H4N6	Arginina N-metiltransferase 2	823,49	28C
A0A0D2H9G5	Proteína P do sistema de clivagem de glicina	644,45	28C
A0A0D2H757	Glutamina-frutose-6-fosfato transaminase (isomerização)	767,16	28C
A0A0D2GAX8	L-aminoadipato-semialdeído desidrogenase	474,32	28C
A0A0D2HH47	Arginino-succinato sintase	3296,51	0,711
A0A0D2DTJ0	Fosfo-2-desidro-3-desoxiheptonato aldolase	2049,73	28C
A0A0D2GVZ7	Succinato-semialdeído desidrogenase	1290,59	28C
A0A0D2DPU9	Glutamato sintase (NADPH)	528,32	28C
A0A0D2DXF0	1-pirrolina-5-carboxilato desidrogenas	4422,69	0,436
A0A0D2DAK7	Glutamato descarboxilase	2564,37	28C
A0A0D2G9I8	Glutamina sintetase	1534,1	28C
A0A0D2E0S6	Aminotransferase I de aminoácido aromático	717,57	0,453
A0A0D2GFE5	Espermidina sintase	3657,56	0,565
A0A0D2GSE8	5-metil tetrahydropteroilglutâmico-homocisteína S-metiltransferase	4636,56	0,697
A0A0D2F190	O-acetilhomoserina (tiol) –liase	2568,7	0,733
A0A0D2GD07	Arginino succinato liase	798,72	28C
A0A0D2GYN8	Glutationa S-transferase	574,9	28C
A0A0D2EMD2	N-acetil-gama-glutamil-fosfato redutase	472,15	28C
A0A0D2FGF3	Aminotransferase de aminoácido de cadeia ramificada	1775,19	0,491
A0A0D2G4C7	Homoserinaquinase	1448,74	0,346
A0A0D2GSM5	Homoserine desidrogenase	1138,54	0,763
A0A0D2E768	Aminotransferase de aminoácido de cadeia ramificada	1198,25	0,410
A0A0D2GRJ9	Arginase	3182,64	0,631
A0A0D2G315	Cistationina beta-sintase	792,71	28C
A0A0D2GNR3	Asparagina sintase (hidrolise de glutamina)	690,94	28C
A0A0D2F1C3	Dihidroxi-ácido desidratase	592,23	28C
A0A0D2GEL4	Aspartato-semialdeído desidrogenase	626,88	28C
A0A0D2GXJ8	Betaína aldeído desidrogenase	589,06	28C
A0A0D2EMP7	Fosfoferina transaminase	1975,55	28C
A0A0D2EMM0	Isovaleril CoA-desidrogenase	726,29	28C
A0A0D2H0D1	2-isopropilmalato sintase	2819,96	0,310

Nº de acesso	Descrição	Score	Fold Change
A0A0D2GI32	Ornitinaaminotransferase	3467,8	0,565
A0A0D2DCM3	Acetolactato sintase, subunidade pequena	796,68	28C
A0A0D2D9G7	Homocitrato sintase, mitocondrial	1207,91	28C
A0A0D2EWT8	Acilfosfatase	912,82	28C
A0A0D2FHF6	S-adenosil metionina sintase	742,09	28C
1.2 Metabolismo de nitrogênio e enxofre			
A0A0D2FEW1	Uricase	1559,62	28C
1.3 Metabolismo de nucleotídeo			
A0A0D2DG54	Desoxiuridina 5'-trifosfato nucleotidohidrolase	1292,85	28C
A0A0D2EYT5	Nucleosídeo difosfato quinase	19387,85	0,810
A0A0D2E6M6	Adenilosuccinatosintetase	4034,83	0,269
A0A0D2GCK5	Adenilosuccinatoliase	3922,6	0,326
A0A0D2H1A0	Inosina-5'-monofosfato desidrogenase	913,05	28C
A0A0D2G988	Pirimidina 5'-nucleotidase	700,24	28C
A0A0D2GT58	Fosforibosil amina-glicina ligase	1106,17	28C
A0A0D2GMX3	Uracilfosforibosil transferase	4894,62	0,329
A0A0D2GQV0	Diidroorotase, tipo homodimérico	1240,8	28C
1.4 Metabolismo de composto de carbono e carboidratos			
A0A0D2FZX6	Formiltetrahidrofolatodeformilase	3419,73	0,594
A0A0D2DD51	2-metilcitrato desidratase	5001,64	0,491
A0A0D2DZQ6	S-formilglutationahidrolase	2389,55	0,360
A0A0D2GNV6	S- (hidroximetil) glutationa desidrogenase	3295,12	0,208
A0A0D2HJE3	Enzima de desramificação de glicogênio	436,21	28C
A0A0D2GX80	Aldeído desidrogenase	478,55	28C
A0A0D2HP26	Aldeído desidrogenase dependente de NAD	609,04	28C
A0A0D2GBE9	Manitol desidrogenase dependente de NADP	7992,08	28C
1.5 Metabolismo de lipídeo, ácidos graxos e isoprenoides			
A0A0D2DRB1	Glicerol quinase	1562,52	28C
A0A0D2EKA4	3-hidroxiubutiril CoA desidrogenase	1414,27	0,458
A0A0D2EID4	Glicerolquinase	657,42	28C
A0A0D2GPB2	Farnesilpirofosfato sintase	1174,95	28C
A0A0D2GU66	Glicerol-3-fosfato desidrogenase [NAD (+)]	1688,1	28C
A0A0D2HLU5	Subunidade alfa da sintase do ácido graxo	484,16	28C
A0A0D2H3J8	Subunidade beta da sintase do ácido graxo	643,96	28C
A0A0D2GP21	Acil-coenzima A oxidase	802,3	28C
A0A0D2HIC7	Acil-CoA desidrogenase	4238,29	28C
A0A0D2F489	Acil-CoA desidrogenase	449,74	28C
A0A0D2E0D3	Pirofosfatase inorgânica	10657,58	0,463
A0A0D2HPL2	ATP-citrato sintase subunidade 2	2039,9	28C

Nº de acesso	Descrição	Score	Fold Change
A0A0D2H6B4	ATP-citrato sintase subunidade 1	1022,82	28C
A0A0D2G0B9	Acetil-CoA aciltransferase	2278,31	0,582
A0A0D2E224	Acetil-CoA C-acetil transferase	806,61	28C
A0A0D2DHX1	Acetil-Co A aciltransferase	3143,58	28C
A0A0D2GK84	Citrate liasesubunidade beta	2060,07	28C
A0A0D2GTP8	NADPH - citocromo P450 redutase	1264,52	28C
1.6 Metabolismo secundário			
A0A0D2GG68	Policetídeo sintase (PKS1)	624,69	28C
A0A0D2FFY6	Difosfomevalonato descarboxilase	685,42	28C
A0A0D2DHZ5	Trihidroxinaftalenoreductase	13269,78	0,256
A0A0D2GYU1	Citalonadesidratase	3644,77	0,554
2. ENERGIA			
2.1 Glicólise e gliconeogênese			
A0A0D2HJD0	Piruvato quinase	3393,17	0,511
A0A0D2DD45	Glicose 1-desidrogenase	1264,3	28C
A0A0D2GZE9	Triosefosfato isomerase	5215,18	0,690
A0A0D2F1F6	Enolase	20463,65	0,565
A0A0D2GYT1	Frutose-bisfosfatoaldolase 1	9551,93	0,670
A0A0D2FEY5	Glicose-6-fosfato isomerase	4821,36	0,677
2.2 Ciclo do glioxilato			
A0A0D2GP54	Isocitrato liase	522,21	28C
A0A0D2EKP6	Isocitratliase	512,04	28C
A0A0D2G990	Malato sintase	810,56	28C
2.3 Via da pentose fosfato			
A0A0D2F8G5	Glicose-6-fosfato 1-epimerase	764,6	0,506
A0A0D2GBZ6	Transaldolase	8625,64	0,496
A0A0D2GHM4	6-fosfogluconato desidrogenase, descarboxilação	11210,19	0,486
A0A0D2GXX4	Glicose-6-fosfato 1-desidrogenase	2150,76	0,511
2.4 Complexo da piruvato desidrogenase			
A0A0D2DZB4	Componente acetil transferase do complexo piruvato desidrogenase	1961,67	0,711
A0A0D2F341	Subunidade beta do componente E1 da piruvato desidrogenase	4894,73	0,431
2.5 Via do ácido tricarbóxico			
A0A0D2ESS2	Oxoglutarato desidrogenase (transferência de succinil), componente E1	879,04	0,463
A0A0D2GVX3	Citrato sintase	7117,3	0,511
A0A0D2GVK0	Isocitrato desidrogenase [NADP]	1693,86	0,657
A0A0D2DB23	Diidrolipoil desidrogenase	482,42	28C
A0A0D2DBW7	Aconitate hidratase, mitocondrial	522,65	0,683

Nº de acesso	Descrição	Score	Fold Change
A0A0D2EMN3	Fumarato hidratase, classe II	725,97	0,786
2.6 Respiração			
A0A0D2H1M2	Subunidade 4 da citocromo c oxidase, mitocondrial	2974,34	0,644
A0A0D2GRI8	NADH-citocromo b5 redutase	743,12	28C
A0A0D2E894	Subunidade Rieske do complexo citocromo b-c1, mitocondrial	478,79	28C
A0A0D2DPM9	NADH-ubiquinona oxidoreductase subunidade de 78 kDa, mitocondrial	1244,72	28C
2.7 Fermentação			
A0A0D2H5F3	Álcool desidrogenase	620,27	28C
A0A0D2H3T7	Álcool desidrogenase	1850,42	0,690
2.8 Conversão e regeneração da energia			
A0A0D2GLD1	ATP sintase subunidade beta	28943,27	0,543
A0A0D2DM13	ATP sintase subunidade beta d, mitocondrial	5984,4	0,748
A0A0D2HFN8	ATP sintase subunidade delta, mitocondrial	1807,68	28C
A0A0D2GG55	ATP sintase subunidade gama	9647,99	28C
3. CICLO CELULAR E PROCESSAMENTO DE DNA			
A0A0D2GS75	Subunidade alfa da caseína quinase II	602,38	28C
A0A0D2GTZ1	Proteína de controle de divisão celular 48	6962,65	0,697
A0A0D2GDD8	Exodeoxiribonuclease III	562,74	28C
A0A0D2G7M8	Antígeno nuclear de célula em proliferação	2292,93	28C
A0A0D2G9K3	Proteína de montagem de nucleossomo 1 semelhante a 1	791,59	28C
A0A0D2EIJ5	Endonuclease G, mitochondrial	669,65	28C
4. TRANSCRIÇÃO			
A0A0D2FHG4	Proteína de ligação de poliadenilato	442,95	28C
A0A0D2GB18	RNA helicase sub2 dependente de ATP	762,81	28C
A0A0D2GGG1	Helicase semelhante a RuvB	663,22	28C
5. SÍNTESE DE PROTEÍNAS			
A0A0D2GYQ7	Prolina-tRNA ligase	3102,29	28C
A0A0D2G4E3	Fator de alongamento 1-gama	15617,16	0,427
A0A0D2GP91	Proteína ribossomal L5 60S	3456,61	28C
A0A0D2HDV5	Fator de iniciação de tradução RLI1	556,93	28C
A0A0D2EWY0	Proteína ribossomal L30 60S	2923,08	0,444
A0A0D2GVF2	60S proteína ribossômica ácida P1	27149,04	0,548
A0A0D2DRR0	Proteína ribossomal L27 60S	7755,77	0,771
A0A0D2F9S7	Proteína ribossômica S13 40S	3648,38	0,532
A0A0D2HGP3	Proteína ribossomal ácida P2 60S	35346,79	0,582
A0A0D2GK54	Proteína ribossômica 60S L8-B	4897,03	0,042

Nº de acesso	Descrição	Score	Fold Change
A0A0D2GG15	Proteína ribossomal L15	9570,79	0,283
A0A0D2GGH3	Proteína ribossômica S4 40S	652,13	0,313
A0A0D2EZ66	Proteína ribossomal L4e de subunidade grande	2166,28	0,382
A0A0D2EKT2	Proteína ribossomal L20 60S	2420,99	0,548
A0A0D2EKW5	Proteína ribossomal L12 60S	8665,09	0,644
A0A0D2GST6	Proteína ribossômica S1 40S	1472,53	28C
A0A0D2DMX6	Proteína ribossômica 40S S12	433,48	28C
A0A0D2DUQ3	Proteína ribossomal L6 60S	965,51	28C
A0A0D2DD20	Proteína ribossomal L19	1208,71	28C
A0A0D2GU95	Proteína ribossomal L11 60S	1311,69	28C
A0A0D2EW33	Proteína ribossomal L7 / L12	1599,85	28C
A0A0D2G8N6	Proteína ribossômica 60S L18-A	2444,97	28C
A0A0D2DCQ7	Proteína ribossomal L2-A 60S	3709,09	28C
A0A0D2GW10	Proteína ribossômica 40S S14	3207,15	28C
A0A0D2HLI3	Proteína ribossômica 40S S17	1301,69	28C
A0A0D2HFA4	Fator de iniciação da tradução eucariótica 2 subunidade gama	682,16	28C
A0A0D2DM08	Fator de alongamento 3	1149,11	28C
A0A0D2GCS1	Fator de iniciação da tradução eucariótica 3 subunidade E	1612,77	28C
A0A0D2G5Q0	Fator de iniciação da tradução eucariótica 3 subunidadeF	791,32	28C
A0A0D2EK08	Fator de iniciação da tradução eucariótica 3 subunidade I	718,66	28C
A0A0D2DM09	Fator de alongamento 2	3687,34	0,582
A0A0D2GWB0	Leucina-tRNA ligase	1261,42	0,458
A0A0D2FBX7	Isoleucine-tRNA ligase	718,53	0,778
A0A0D2GRH9	aspartato-tRNA(Asn) ligase	843,22	28C
A0A0D2GYY6	Valina-tRNA ligase	480,29	28C
A0A0D2HDX7	Aspartato-tRNA (Asn) ligase	805,55	28C
A0A0D2DDA1	Cisteine-tRNA ligase	503,58	28C
A0A0D2GQP3	Treonina-tRNA ligase	629,17	28C
A0A0D2GES3	Aspartil / glutamil-tRNAmRNA da subunidade C da amidotransferase C	1250,95	28C
A0A0D2G9G8	Glicina-tRNA ligase	1528,11	28C
A0A0D2F9F8	Fator de iniciação da tradução eucariótica 6	3033,08	28C
A0A0D2H0C1	Fator de alongamento 1-alfa	786,1	0,501
6. DESTINO PROTEICO (enovelamento, modificação e destino)			
A0A0D2E6X5	Dipeptidil peptidase 3	1515,8	0,410
A0A0D2G1E1	Carboxipeptidase	1495,08	28C
A0A0D2GQG1	DipeptidaseXaa-Pro	509,47	28C

Nº de acesso	Descrição	Score	Fold Change
A0A0D2HLN7	Carboxipeptidase	532,36	28C
A0A0D2GWG2	Aminopectidase	1701,43	28C
A0A0D2G6Q6	Protease semelhante à subtilisina	1353,1	0,612
A0A0D2GW72	Peptídeo hidrolase	1100,41	28C
A0A0D2E3J0	Glutamato carboxipeptidase II	699,76	28C
A0A0D2G4B5	Aspartilamino peptidase	721,72	28C
A0A0D2H8Z6	Oligopeptidasetimet	637,57	28C
A0A0D2H1I4	Epsilon da subunidade da proteína do complexo T 1	511,53	28C
A0A0D2E8C1	Subunidade regulatória de proteassoma 26S RPN1	545,14	28C
A0A0D2F8C4	Subunidade regulatória de proteassoma 26S RPN2	476,12	28C
A0A0D2GT65	Subunidade regulatória de proteassoma 26S rpn11	602,8	28C
A0A0D2H1P5	Hidrolase do terminal carboxila da ubiquitina	649,85	28C
A0A0D2FHA0	Domínio de dissulfeto-isomerase de proteína	1649,95	0,486
A0A0D2GJG3	Subunidade alfa do complexo associado ao polipeptídeo nascente	1191,8	28C
A0A0D2EP09	Subunidades SCF do complexo E3 ubiquitina ligase C	3344,91	28C
A0A0D2GPK0	Tipo alfa da subunidade proteassoma	1173,05	28C
A0A0D2GHL9	Tipo de subunidade beta de proteassoma	2013,46	28C
A0A0D2GIC6	Tipo de subunidade beta de proteassoma	819,52	28C
A0A0D2GRD3	Enzima ativadora de ubiquitina E1 C	564,3	28C
A0A0D2EJP2	Subunidade beta de peptidase de processamento mitocondrial	4191,67	0,386
A0A0D2EUS3	Proteína dissulfeto-isomerase	5959,22	0,423
A0A0D2DWS3	Enzima E1 de ativação de ubiquitina	2289,71	0,241
7. PROTEÍNA COM FUNÇÃO DE LIGAÇÃO OU REQUISITO DE COFATOR (estrutural ou catalítico)			
A0A0D2G2E7	Histona H2B	2516,97	0,402
A0A0D2DQK1	Histona acetiltransferase tipo B subunidade 2	690,07	28C
8. PROTEÍNAS COM ATIVIDADE DE REGULAÇÃO			
A0A0D2DR38	Peptidilprolil isomerase	2174,69	0,532
A0A0D2E0R9	Serina / treonina-proteína fosfatase	615,58	28C
A0A0D2F644	Proteína dedo de zinco	612,69	28C
A0A0D2GHR2	Proteína de ligação a nucleotídeo de guanina, subunidade de proteína semelhante a beta	10115,45	0,307
A0A0D2FF75	Arp2 / 3 complexo subunidade 2 de 34 kDa	915,91	28C
A0A0D2DJ82	Subunidade 5 do complexo de proteína 2/3 relacionada à actina	3912,25	28C

Nº de acesso	Descrição	Score	Fold Change
9. TRANSPORTE CELULAR, TRANSPORTE FACILITADO E ROTAS DE TRANSPORTE			
A0A0D2H4I4	ADP, proteína transportadora de ATP	1371,51	28C
A0A0D2E0M7	ATPase da membrana plasmática	1361,94	28C
A0A0D2H2Q9	Efluxo desódio / potássio tipo ATPase	1356,85	28C
A0A0D2EKY8	Herança alterada da proteína mitocondrial 24, mitocondrial	2378,86	28C
A0A0D2GM43	Proteína de ligação a GTP ypt1	1224,16	0,280
A0A0D2FBR5	Subunidade D de próton ATPase tipo V	528,36	28C
A0A0D2H4V5	Subunidade A catalítica de próton ATPase tipo V	666,63	28C
A0A0D2DYK6	Cadeia pesada de clatrina	820,6	28C
A0A0D2DLA3	Cadeia leve de clatrina	1484,1	28C
10. COMUNICAÇÃO CELULAR/MECANISMO DE TRANSDUÇÃO DE SINAL			
A0A0D2GJ42	Calmodulina	5360,53	28C
A0A0D2DC84	Proteína quinase ativada por mitogênio	447,4	28C
11. RESGATE CELULAR, DEFESA E VIRULÊNCIA			
A0A0D2E2C8	Peroxidase	4335,52	0,650
A0A0D2DDU9	Peroxidase	1681,74	28C
A0A0D2G8Z9	Superoxido dismutase	4282,79	28C
A0A0D2DJV2	Beta-lactamase	3680,51	0,436
A0A0D2GQX1	DnaJ semelhante a membro 2 da subfamília C	2105,01	0,711
A0A0D2ETU0	Tioredoxinaredutase	884,05	28C
A0A0D2EIN7	Proteínasemelhante a Hsp88	3657,04	0,543
A0A0D2GZ39	Proteína semelhante a hsp75	3958,78	0,657
A0A0D2G419	Peroxidase dependente de ferro	768	28C
12. BIOGÊNESIS DE COMPONENTES CELULARES			
A0A0D2GQK8	1,3-beta-glucanosil transferase	1021,4	28C
A0A0D2GJM8	Alfa-manosidase	3071,81	28C
A0A0D2GFD4	Manose-6-fosfato isomerase	1142,42	0,486
A0A0D2FIF0	UDP-glicose 4-epimerase Gale	850,54	28C
A0A0D2HEQ5	Fosfomanomutase	1744,59	28C
A0A0D2GCX3	Serina hidroximetil transferase	3339,08	0,449
A0A0D2GHW2	Cadeia alfa da tubulina	493,61	28C
A0A0D2DD73	Proteína YOP1	955,76	28C
A0A0D2GJJ8	Alfa-1,4 glucanofosforilase	818,88	28C
A0A0D2GKC5	UDP-N-acetil glucosaminapirifosforilase	1990,74	0,280
13. NÃO CLASSIFICADO			
A0A0D2EMI3	Proteína hipotética	7208,77	0,472
A0A0D2EXD6	Proteína hipotética	730,47	28C
A0A0D2EKG0	Proteína hipotética	12933,05	0,120

N° de acesso	Descrição	Score	Fold Change
A0A0D2EKN8	Proteína hipotética	2984,63	0,440
A0A0D2GTM6	Proteína hipotética	692,3	28C
A0A0D2DJ52	Proteína hipotética	608,22	28C
A0A0D2G087	Proteína hipotética	2985,6	28C
A0A0D2G346	Proteína hipotética	947,79	28C
A0A0D2GZ79	Proteína hipotética	3130,55	0,220
A0A0D2DC61	Proteína hipotética	10522,32	0,382
A0A0D2DJP9	Proteína hipotética	3238,02	0,449
A0A0D2H929	Proteína hipotética	5750,35	0,657
A0A0D2GP68	Proteína hipotética	10285,13	0,677
A0A0D2E7X1	Proteína hipotética	1433,57	0,704
A0A0D2DSM7	Proteína hipotética	1935,31	0,755
A0A0D2GEN2	Proteína hipotética	3757,01	0,014
A0A0D2GJE5	Proteína hipotética	11095,55	0,283
A0A0D2GJI8	Proteína hipotética	1103,54	0,289
A0A0D2G1P7	Proteína hipotética	36570,79	0,326
A0A0D2GI41	Proteína hipotética	10406,93	0,329
A0A0D2H7V1	Proteína hipotética	979,78	0,406
A0A0D2DN14	Proteína hipotética	810,75	0,418
A0A0D2EMT3	Proteína hipotética	27479,04	0,436
A0A0D2GTP5	Proteína hipotética	5096	0,477
A0A0D2DXP8	Proteína hipotética	23321,3	0,522
A0A0D2GLY6	Proteína hipotética	1019,73	0,537
A0A0D2G9V4	Proteína hipotética	786,91	0,548
A0A0D2GVI9	Proteína hipotética	1945,64	0,637
A0A0D2EU45	Proteína hipotética	3987,09	0,644
A0A0D2H3P0	Proteína hipotética	1520,15	0,748
A0A0D2GPG3	Proteína hipotética	1263,74	0,810
A0A0D2GUI8	Proteína hipotética	1457,56	28C
A0A0D2FDK5	Proteína hipotética	931,66	28C
A0A0D2E3S5	Proteína hipotética	866,17	28C
A0A0D2GUT6	Proteína hipotética	501,24	28C
A0A0D2GUY0	Proteína hipotética	861,94	28C
A0A0D2HKC4	Proteína hipotética	934,43	28C
A0A0D2FEJ3	Proteína hipotética	641,41	28C
A0A0D2E4T5	Proteína hipotética	3244,12	28C
A0A0D2E4V2	Proteína hipotética	508,8	28C
A0A0D2E4V3	Proteína hipotética	566,22	28C
A0A0D2H337	Proteína hipotética	471,15	28C

Nº de acesso	Descrição	Score	Fold Change
A0A0D2FGB2	Proteína hipotética	2841,43	28C
A0A0D2E6S2	Proteína hipotética	632,94	28C
A0A0D2HN56	Proteína hipotética	520,13	28C
A0A0D2HP63	Proteína hipotética	5545,5	28C
A0A0D2E848	Proteína hipotética	901,75	28C
A0A0D2GNV1	Proteína hipotética	3570,69	28C
A0A0D2D941	Proteína hipotética	1809,91	28C
A0A0D2D955	Proteína hipotética	694,52	28C
A0A0D2HE72	Proteína hipotética	475,49	28C
A0A0D2GPF7	Proteína hipotética	1000	28C
A0A0D2DYN1	Proteína hipotética	587,69	28C
A0A0D2GW93	Proteína hipotética	1966,75	28C
A0A0D2GPT4	Proteína hipotética	1691,34	28C
A0A0D2F931	Proteína hipotética	738,03	28C
A0A0D2GQ75	Proteína hipotética	7917,82	28C
A0A0D2HG55	Proteína hipotética	832,82	28C
A0A0D2GXS2	Proteína hipotética	698,56	28C
A0A0D2GRQ2	Proteína hipotética	1261,18	28C
A0A0D2GYN5	Proteína hipotética	519,72	28C
A0A0D2E112	Proteína hipotética	3382,76	28C
A0A0D2HH41	Proteína hipotética	1058,27	28C
A0A0D2HH53	Proteína hipotética	541,7	28C
A0A0D2FB28	Proteína hipotética	2424,38	28C
A0A0D2FB52	Proteína hipotética	654,03	28C
A0A0D2HHH1	Proteína hipotética	1122,39	28C
A0A0D2E202	Proteína hipotética	465,04	28C
A0A0D2GT85	Proteína hipotética	2251,19	28C
A0A0D2GTF6	Proteína hipotética	833,48	28C
A0A0D2GU45	Proteína hipotética	3245,95	28C
A0A0D2E3G7	Proteína hipotética	2018,64	28C
A0A0D2GJ53	Proteína hipotética	474,41	28C
A0A0D2F2V7	Proteína hipotética	4328,97	28C
A0A0D2GR55	Proteína hipotética	1850,55	28C
A0A0D2F3I7	Proteína hipotética	1207,28	28C
A0A0D2DU32	Proteína hipotética	446,85	28C
A0A0D2F3U6	Proteína hipotética	1021,12	28C
A0A0D2H9W2	Proteína hipotética	7930,91	28C
A0A0D2H9X1	Proteína hipotética	720,51	28C
A0A0D2GKL2	Proteína hipotética	6842,64	28C

N° de acesso	Descrição	Score	Fold Change
A0A0D2GS90	Proteína hipotética	1227,92	28C
A0A0D2HAB4	Proteína hipotética	530,95	28C
A0A0D2F4K9	Proteína hipotética	1689,31	28C
A0A0D2GLE2	Proteína hipotética	459,39	28C
A0A0D2F4Z8	Proteína hipotética	1508,89	28C
A0A0D2F5A4	Proteína hipotética	722,35	28C
A0A0D2GTN1	Proteína hipotética	527,45	28C
A0A0D2F5J2	Proteína hipotética	1569,37	28C
A0A0D2DW95	Proteína hipotética	605,59	28C
A0A0D2GMC7	Proteína hipotética	648,72	28C
A0A0D2DWC7	Proteína hipotética	1500,33	28C
A0A0D2HC52	Proteína hipotética	466,52	28C
A0A0D2HCB0	Proteína hipotética	747,23	28C
A0A0D2HCB5	Proteína hipotética	2292,64	28C
A0A0D2HDI7	Proteína hipotética	1345,84	28C
A0A0D2F7I9	Proteína hipotética	884,21	28C
A0A0D2H3K4	Proteína hipotética	1475,48	28C
A0A0D2GL32	Proteína hipotética	1066,18	28C
A0A0D2H488	Proteína hipotética	519,24	28C
A0A0D2DPB1	Proteína hipotética	1218,7	28C
A0A0D2GFS5	Proteína hipotética	473,39	28C
A0A0D2GGI1	Proteína hipotética	697,88	28C
A0A0D2DQX6	Proteína hipotética	431,02	28C
A0A0D2GPX5	Proteína hipotética	2058,54	28C
A0A0D2GPX7	Proteína hipotética	2075,89	28C
A0A0D2H7M5	Proteína hipotética	6225,69	28C
A0A0D2GQ76	Proteína hipotética	642,76	28C
A0A0D2DSC0	Proteína hipotética	595,98	28C
A0A0D2DJ29	Proteína hipotética	1437,51	28C
A0A0D2DJ78	Proteína hipotética	662,63	28C
A0A0D2GGJ8	Proteína hipotética	1436,23	28C
A0A0D2DJ99	Proteína hipotética	1545,48	28C
A0A0D2GB48	Proteína hipotética	1315,06	28C
A0A0D2GHC0	Proteína hipotética	1555,81	28C
A0A0D2EV61	Proteína hipotética	462,65	28C
A0A0D2DKM9	Proteína hipotética	711,22	28C
A0A0D2EVW4	Proteína hipotética	540,36	28C
A0A0D2DLS8	Proteína hipotética	552,88	28C
A0A0D2EX59	Proteína hipotética	4946,51	28C

N° de acesso	Descrição	Score	Fold Change
A0A0D2GJR9	Proteína hipotética	1147,88	28C
A0A0D2H305	Proteína hipotética	1221,63	28C
A0A0D2H383	Proteína hipotética	523,98	28C
A0A0D2EY66	Proteína hipotética	476,44	28C
A0A0D2G7N9	Proteína hipotética	1011,81	28C
A0A0D2DH48	Proteína hipotética	467,33	28C
A0A0D2DHE4	Proteína hipotética	1301,32	28C
A0A0D2GYA6	Proteína hipotética	874,69	28C
A0A0D2GYH4	Proteína hipotética	1085,52	28C
A0A0D2DIQ0	Proteína hipotética	2247,11	28C
A0A0D2ETM5	Proteína hipotética	703,01	28C
A0A0D2DIW0	Proteína hipotética	748,82	28C
A0A0D2DCZ4	Proteína hipotética	456,59	28C
A0A0D2G9U1	Proteína hipotética	529,49	28C
A0A0D2DD69	Proteína hipotética	1249,92	28C
A0A0D2G4T0	Proteína hipotética	1196,73	28C
A0A0D2G522	Proteína hipotética	457,61	28C
A0A0D2DE44	Proteína hipotética	1404,49	28C
A0A0D2GAX2	Proteína hipotética	1130,78	28C
A0A0D2DEL1	Proteína hipotética	696,16	28C
A0A0D2DEN3	Proteína hipotética	2636,43	28C
A0A0D2EPD3	Proteína hipotética	2842,26	28C
A0A0D2DF43	Proteína hipotética	1059,4	28C
A0A0D2EJZ1	Proteína hipotética	585,36	28C
A0A0D2G2F3	Proteína hipotética	2086,6	28C
A0A0D2DBJ2	Proteína hipotética	683,98	28C
A0A0D2EKZ5	Proteína hipotética	917,5	28C
A0A0D2G8M7	Proteína hipotética	453,76	28C
A0A0D2G8Q0	Proteína hipotética	1651,44	28C
A0A0D2GS21	Proteína hipotética	1050,03	28C
A0A0D2ELM1	Proteína hipotética	1711,06	28C
A0A0D2G921	Proteína hipotética	591,1	28C
A0A0D2DCF2	Proteína hipotética	2343,24	28C
A0A0D2G3I0	Proteína hipotética	1104,29	28C
A0A0D2G637	Proteína hipotética	8853,36	28C
A0A0D2EIP9	Proteína hipotética	1078,62	28C
A0A0D2D9N4	Proteína hipotética	778,18	28C
A0A0D2EJ70	Proteína hipotética	509	28C
A0A0D2EJ81	Proteína hipotética	1048,99	28C

N° de acesso	Descrição	Score	Fold Change
A0A0D2EJA4	Proteína hipotética	1094,32	28C
A0A0D2G177	Proteína hipotética	1240,3	28C

N° de acesso: obtido do banco de dados de *Fonsecaapedrosoi* disponível em: <https://www.uniprot.org/taxonomy/1442368>

Score: valor correspondente ao número de peptídeos.

FoldChange: Mudança na abundancia de proteínas.

28C: Proteínas identificadas apenas na condição 28° C.

As proteínas induzidas após a mudança de temperatura para 37°C foram classificadas em 8 categorias funcionais distintas, além das proteínas não classificadas (Figura 7A). Do total de categorias, foi possível observar um maior número de proteínas induzidas envolvidas em processos como metabolismo (17%), sendo que desta categoria, o metabolismo de aminoácidos foi o que mais sofreu regulação (13%), obtenção de energia (4%) e síntese proteica (10%). Já as proteínas reprimidas após a mudança de temperatura para 37°C foram classificadas em 12 categorias funcionais distintas, além das proteínas não classificadas (Figura 7B). Os processos celulares que apresentaram maior número de proteínas reprimidas envolvem o metabolismo (20%) principalmente metabolismo de aminoácidos (48%) e ácidos graxos (23%); obtenção de energia (8%), síntese proteica (11%) e destino proteico (6%).

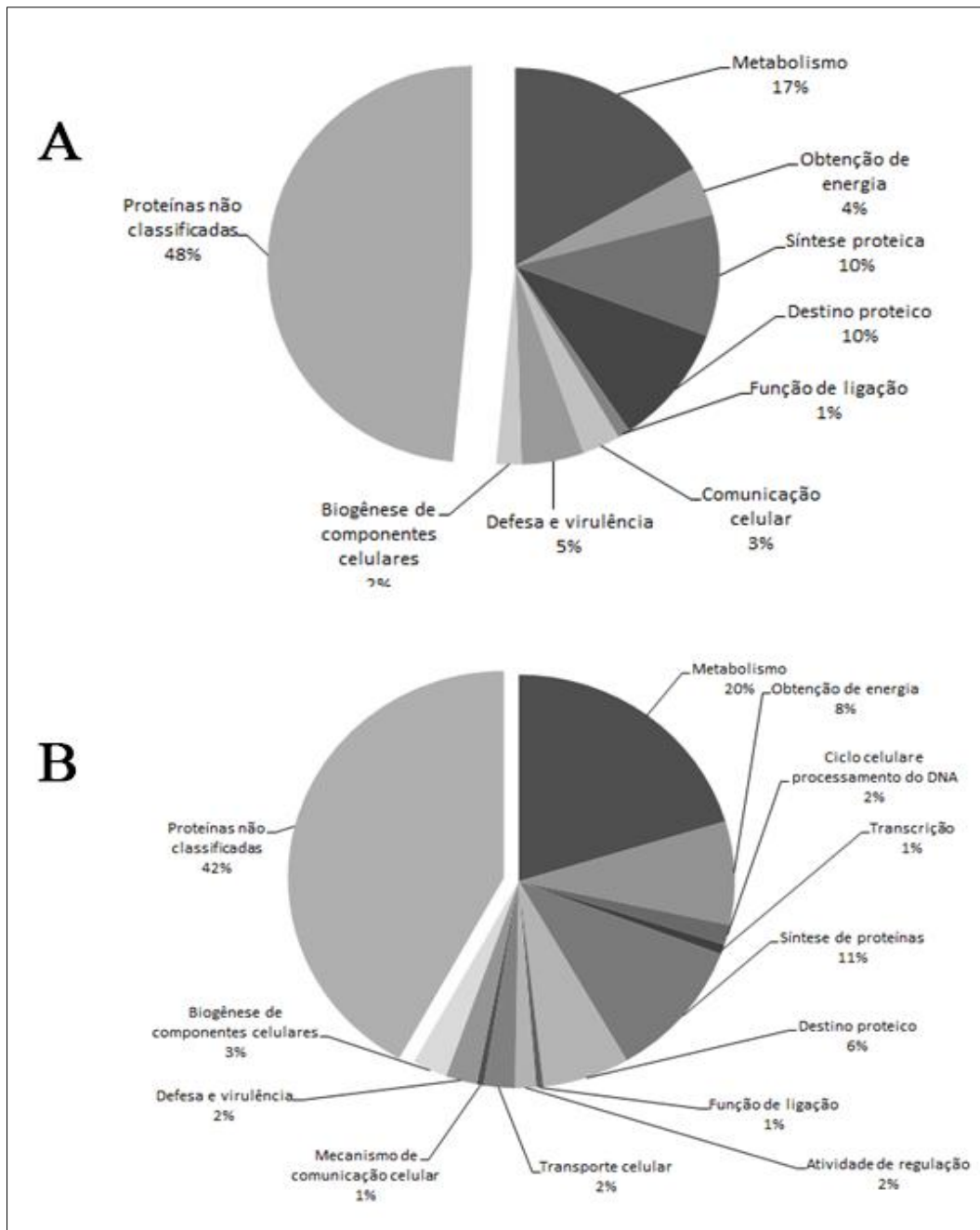


Figura 7: Distribuição categórica das proteínas reguladas de *F. pedrosoi* após cultivo à 37°C. (A) proteínas induzidas, (B) proteínas reprimidas.

Os resultados indicaram que grande parte das enzimas da via glicolítica (frutose bifosfato aldolase, triose fosfato isomerase, enolase e piruvato-cinase) do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) (piruvato-cinase, aconitase, isocitrato desidrogenase e fumarato hidratase) e ciclo do glioxilato (isocitrato liase e malato sintase) encontraram-se reprimidas (Figura 8). Do, Yamaguchi e Miyano (2009) obtiveram resultados similares

ao submeter *A. fumigatus* ao estresse de temperatura. Eles observaram que genes envolvidos no TCA, bem como genes envolvidos no metabolismo de nucleotídeos, estavam inicialmente reprimidos quando submetidos à 37, bem como, à 48°C e que muitos genes relacionados a proteínas de choque térmico tinham o nível de expressão diminuído. Porém, após um período mais prolongado, os genes envolvidos no TCA foram regulados positivamente e juntamente, genes de proteínas de choque térmico. Sugeriu-se que as proteínas de choque térmico possam atuar como reguladores-chave na regulação da transcrição de genes necessários no processo de adaptação térmica de *A. fumigatus* uma vez que após um tempo posterior as enzimas na via do TCA se demonstraram recuperadas juntamente com a indução de proteínas de choque térmico (DO, YAMAGUCHI, MIYANO, 2009). Acredita-se que *F. pedrosoi* assumam uma resposta similar, reprimindo as enzimas das vias do metabolismo central em períodos iniciais sob estresse de temperatura, mas que após certo tempo, mecanismo de regulação sejam adotados à fim de recuperar seu metabolismo e se adaptar ao ambiente do hospedeiro. Análises que visam a identificação de proteínas de *F. pedrosoi* à 37°C por períodos maiores são necessárias para confirmar nossas especulações e melhor compreender as adaptações que este patógeno assume.

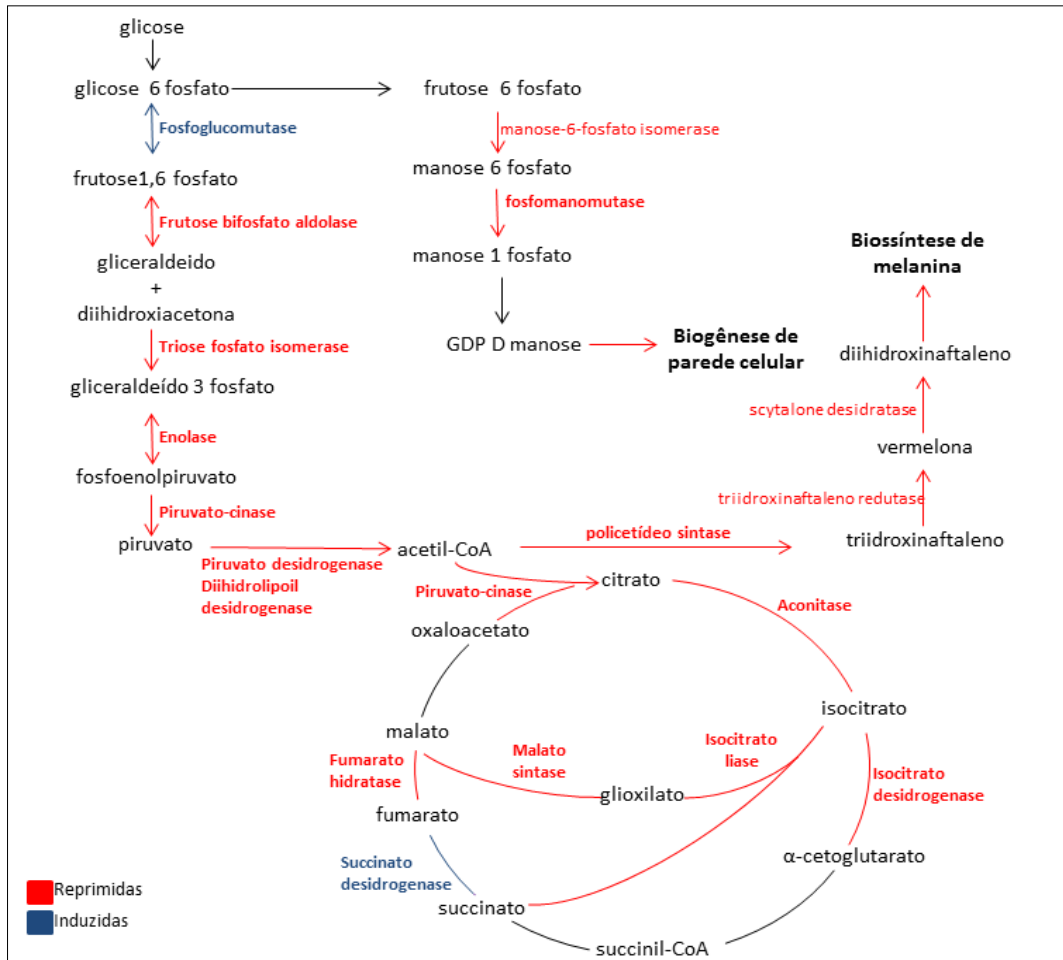


Figura 8: Adaptações metabólicas identificadas em *F. pedrosoi* induzidas pela mudança de temperatura.

A via glicolítica é a via preferencial de metabolismo de carbono em diversos organismos e é fundamental para o crescimento celular, porém, quando esta rota de obtenção de energia é alterada por algum fator estressante, vias alternativas de obtenção de energia são utilizadas por meio da reprogramação metabólica que visa à sobrevivência de patógenos fúngicos. Vias como ciclo do glioxilato, beta oxidação, gliconeogênese, degradação de aminoácidos e proteínas são fontes alternativas de metabolização de carbono que são utilizadas pelos fungos à fim de que a demanda energética da célula seja atendida (CHEW, CHEE, THAN et al., 2019).

Nossos achados mostraram que a via glicolítica está reprimida nos pontos das enzimas frutose bifosfato aldolase, triose fosfato isomerase, enolase e piruvato-cinase, como mostrado na Figura 8. Alguns trabalhos têm demonstrado que quando a via

glicolítica está reprimida devido a algum fator estressante, os patógenos utilizam de outras vias de degradação (PARENTE-ROCHA et al., 2018). Em nossas análises é possível observar que muitas proteínas relacionadas à degradação de ácidos graxos estão reprimidas (glicerol-3-fosfato desidrogenase, acil-CoA desidrogenase e acil-CoA-acetiltransferase). Porém, é possível observar a indução de algumas proteínas relacionadas à degradação de aminoácidos tais como agmatinase, oxoisovalerato desidrogenase e hidroxibutirato desidrogenase, sugerindo que *F. pedrosoi* possa estar utilizando da via de degradação de aminoácidos para obtenção de precursores das vias do metabolismo energético. Em ensaios realizados por Parente Rocha e colaboradores (2015) macrófagos foram infectados por *P. brasiliensis* a fim de analisar o perfil proteômico do fungo. Foi possível observar que durante a infecção a via glicolítica se apresentou reprimida e que as vias do metabolismo alternativo de carbono como catabolismo de aminoácidos, oxidação de ácidos-graxos e gliconeogênese estavam induzidas, sugerindo que os precursores da via glicolítica estavam sendo supridos pela degradação de outras fontes de carbono. (PARENTE-ROCHA et al., 2015).

Em contrapartida, foi observado em nosso trabalho que algumas enzimas envolvidas na síntese de aminoácidos, tais como argininosuccinato sintase, glutamato sintase, glutamina sintase, metiltetrahydropteriltriglutamato- homocisteína S-metiltransferase e asparagina sintase e também enzimas envolvidas na síntese de lipídeos, tais como citrato liase, glicerol quinase e diferentes subunidades da ácido graxo sintase estão reprimidas quando *F. pedrosoi* é submetido ao estresse de temperatura. Nosso trabalho também observou crescimento lento das culturas de 37°C comparado as de 28°C (Figura 5), o que pode ser justificado pela repressão de enzimas envolvidas na obtenção de energia e de moléculas constituintes das células como precursores de parede e lipídeos. Deste modo, sugere-se que a indução da degradação de aminoácidos ocorra a fim de suprir as demandas energéticas bem como precursores; e que a síntese de aminoácidos e ácidos graxos estejam reprimidas para poupar gasto de energia no processo de síntese de proteínas e lipídeos estruturais. O mesmo foi encontrado por Ye e colaboradores (2009) em um trabalho que objetivou comparar o perfil de expressão de *S. cerevisiae* sob estresse de temperatura (42°C). Eles puderam observar que a síntese de aminoácidos, nucleotídeos e a expressão de genes responsáveis pela síntese de proteínas estavam regulados negativamente em *S.*

cerevisiae quando submetida à estresse de temperatura, mas que, porém, a degradação de aminoácidos estava induzida, sugerindo economia energética por meio da repressão da síntese de proteínas (YE et al., 2009). Nesse sentido, julga-se que uma das primeiras respostas adotadas por *F. pedrosoi* seja reduzir todo seu metabolismo energético para se adaptar à temperatura do hospedeiro após 24 horas. Acredita-se que após um período mais longo, *F. pedrosoi* possa recuperar suas atividades metabólicas, porém novos ensaios são necessários para confirmar se o metabolismo energético é retomado após um período maior.

Low e colaboradores (2011) submeteram *A.fumigatus* a diferentes temperaturas (17 e 32°C) e observaram maior nível de expressão de genes de classe funcionais que incluem proteínas com função de ligação, destino da proteína, síntese de proteína e regulação do metabolismo a 17°C em relação a 32°C. Diante deste resultado, sugeriu-se que a atividade enzimática é aumentada em temperaturas mais baixas e que temperaturas mais altas possam afetar a atividade enzimática (LOW et al. 2011). Em nosso trabalho observamos que grande parte dos peptídeos envolvidos em categorias como síntese de proteínas e destino da proteína se apresentaram em grande parte reprimidos à 37°C, comparado com 28°C, bem como proteínas envolvidas na síntese de lipídeos, sugerindo que altas temperaturas possam afetar a atividade das proteínas dessas categorias, ressaltando a ideia de que a síntese de proteínas e o crescimento das culturas são reprimidas a fim de poupar gasto de energia, uma vez que as vias de obtenção de energia e síntese de lipídios encontram-se reprimidas.

Encontramos também em nossas análises proteômicas que enzimas envolvidas na síntese de melanina, tais como poliketídeo sintase (PKS1), scytalonedesidratase e triidroxinaftalenoreductase foram reprimidas à 37°C. Hagiwara e colaboradores (2017) também analisaram a síntese de melanina em *A. fumigatus* nas temperaturas de 25 e 37°C e observaram que o nível de pigmentação diferiu entre as duas condições, sendo que a cultura de 25°C apresentava-se mais pigmentada que a de 37°C, sugerindo que a temperatura mais baixa promoveu maior acúmulo de DHN-melanina nos conídios de *A. fumigatus*. Neste mesmo trabalho foi encontrado que a transcrição do gene que codifica a proteína PKS, uma proteína envolvida na primeira etapa da via DHN-melanina, era mais abundante nas culturas a 25°C do que a 37°C, confirmando que a biossíntese de DHN-melanina seja mais expressa em temperaturas mais baixas. Com o objetivo de

verificar o papel da biossíntese de melanina em *F. monophora* Xiao e equipe (2021) deletaram o gene da PKS e verificaram as consequências da deleção deste gene para as colônias deste fungo. Foi verificado que a deleção do gene promoveu diminuição da biossíntese de melanina e que conseqüentemente, afetou a capacidade de esporulação das colônias e desencadeou uma redução significativa no crescimento de *F. monophora* quando comparada com a cepa selvagem e complementada. Foi sugerido neste estudo que o sucesso na formação de conídios, esporulação e crescimento das colônias de *F. monophora* estão interligados ao processo de melanização pela PKS (XIAO et al., 2021). Além disso, foi proposto que se o TCA for saturado, o acetil-CoA gerado após a glicólise pode ser convertido em pentacetídeos, podendo ser usado para sintetizar DHN melanina (LEE, JUNG, KIM, 2003). Em conformidade com os estudos citados acima, acredita-se que a redução na produção de melanina observada nas culturas de 37°C sofra influência direta da falta de precursores gerados à partir da glicólise, uma vez que foi observada repressão das vias glicolítica e do TCA e que essa repressão da síntese de melanina reflete em um crescimento mais lento nas culturas crescidas à 37 °C, como foi possível observar em nosso trabalho.

Ainda sobre o que foi encontrado para a via glicolítica, discute-se que a repressão da mesma e do ciclo do TCA podem acarretar estresse oxidativo nas células fúngicas. Durante a respiração mitocondrial, em condições normais, o transporte de elétrons e a fosforilação oxidativa transportam elétrons ao longo de complexos de proteínas até que chegue a seu aceptor final, o oxigênio molecular. Desvios nesse trajeto podem acarretar a redução do oxigênio, gerando espécies reativas de oxigênio (ROS) (MORANO et al., 2012). A repressão da via glicolítica e ciclo do TCA podem afetar diretamente a entrega dos elétrons provenientes das moléculas de piruvato, que são geradas na glicólise e aproveitadas no TCA para então seguirem para a cadeia respiratória. Consistente com nossos dados de proteômica que apontam a repressão de enzimas da via glicolítica, a enzima piruvato desidrogenase, que é fundamental para a descarboxilação do piruvato à acetil-CoA, para então entrar na via do TCA (que também teve as enzimas reprimidas), encontramos a indução de proteínas envolvidas na resposta ao estresse oxidativo, tais como a catalase–peroxidase, superóxido dismutase e tioredoxina. Resultados similares foram encontrados anteriormente por Abrashev e colaboradores (2008) quando submeteram *A. niger* a diferentes condições de

temperatura (40, 50 e 60°) a fim de avaliar as respostas deste organismo. Foi possível observar que além da indução de HSPs, foram induzidas enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase e catalase em resposta ao estresse de temperatura (ABRASHEV et al., 2008). O proteoma de *A. fumigatus* submetido ao estresse de temperatura (30 para 48°C) foi avaliado e foram identificadas proteínas que estavam relacionadas em categorias como dobramento de proteínas, organização do citoesqueleto e resposta ao estresse oxidativo (ALBRECHT et al., 2010). Resultados semelhantes foram observados também para *S. cerevisiae*. Kim e colaboradores (2006) submeteram a cepa KNU5377 de *S. cerevisiae* ao estresse de temperatura (43°C) e observaram a indução de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo, tais como, Cu/Zn superóxido dismutase, catalase, glutathione redutase e tioredoxinas (KIM et al., 2006).

Neste sentido, nosso trabalho apontou que uma das respostas de *F. pedrosoi* quando submetido ao estresse de temperatura é a repressão de enzimas envolvidas na via glicolítica e que enzimas envolvidas na degradação de aminoácidos são induzidas como uma possível fonte alternativa de degradação de carbono. Observou-se também um mecanismo de economia energética por meio da repressão de enzimas envolvidas na síntese de proteínas e também pela repressão de enzimas envolvidas na síntese de lipídeos e parede, resultado que pode estar intimamente relacionado à significativa redução observada no crescimento das culturas à 37°C. A repressão da via glicolítica e do TCA afeta a disponibilidade de precursores da síntese de melanina e tem efeitos sobre o crescimento das culturas de *F. pedrosoi*. Além disso, a repressão da via glicolítica parece estar relacionada também a geração de ROS nas células deste fungo. Esta hipótese é condizente com nossos dados em que mostram que enzimas antioxidantes estavam induzidas à 37°C, sugerindo-se que a repressão da via glicolítica e também do TCA possa gerar estresse oxidativo na célula uma vez que a disponibilidade de precursores destas vias influencia diretamente na correta passagem de elétrons pela cadeia respiratória.

8.4 O cultivo a 37°C não afeta o consumo de glicose em *F. pedrosoi*

Como já mencionado, nossa análise proteômica apontou que quando submetido à 37°C a via glicolítica de *F. pedrosoi* encontra-se em grande parte reprimida. Nesse sentido, nosso trabalho buscou dosar as quantidades de glicose nas culturas de *F.*

pedrosoi a fim de avaliar o consumo da mesma. Porém, o resultado do ensaio confirmatório de dosagem de glicose (Figura 9) mostrou que não houve diferença no consumo de glicose entre as culturas de 28 e 37°C.

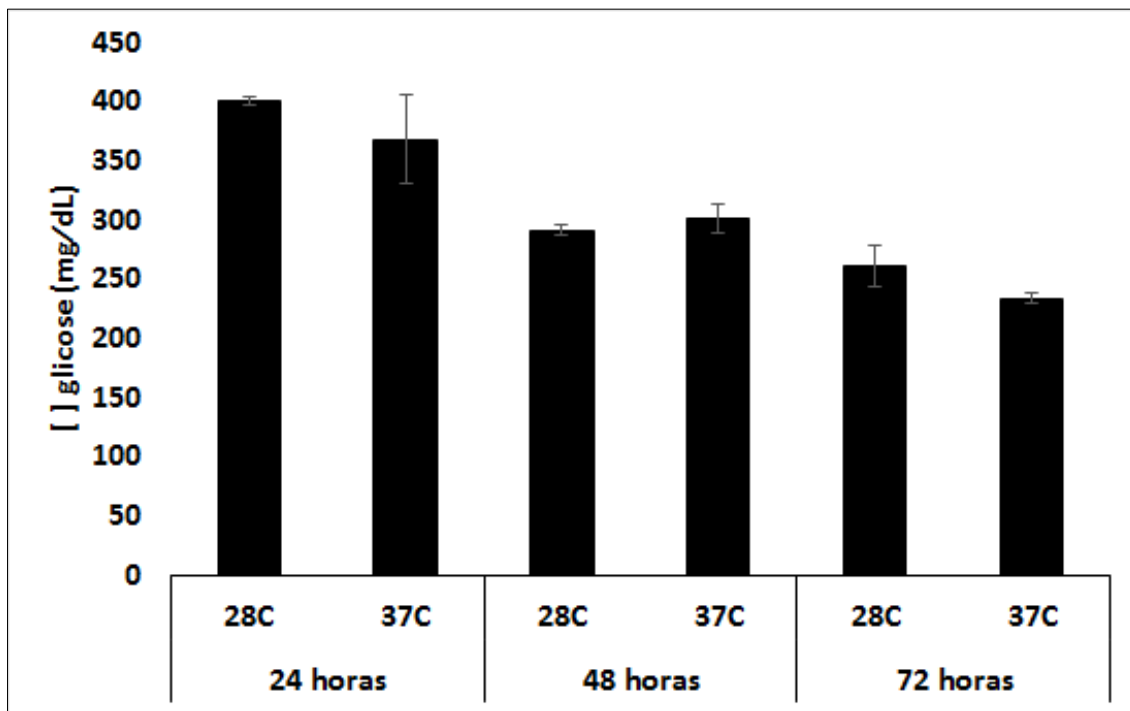


Figura 9: Quantificação de glicose. A dosagem de glicose do sobrenadante das culturas de *F. pedrosoi* foi realizada utilizando kit enzimático após 24, 48 e 72 horas nas temperaturas de 28 e 37°C. O teste t-Student foi usado para comparações estatísticas. A análise estatística foi realizada usando o teste t de Student considerando o valor de $p \leq 0,05$.

Esses resultados apontam que não houve diferença de consumo entre as condições de crescimento, indicando que a glicose possa estar sendo desviada para outras funções. Uma análise proteômica realizada em *P. brasiliensis* submeteu o patógeno sob diferentes condições de temperatura e apontou que a via glicolítica também se encontrou reprimida neste patógeno tanto na sua fase de transição de micélio para levedura e também na fase de levedura, indicando uma forte repressão do metabolismo celular quando submetido à temperatura do hospedeiro, mas que, porém, as enzimas envolvidas na beta-oxidação de ácidos graxos se encontravam induzidas, sugerindo a utilização desta via (ARAUJO et al., 2019). Dados similares foram encontrados por Lacerda Pigosso e grupo (2017) que observou que o metabolismo de glicose foi alternado para a beta-oxidação em leveduras de *P. brasiliensis* (LACERDA PIGOSSO et al., 2017). Assunção e colaboradores (2020) observaram resultados semelhantes em sua análise proteômica, na qual o patógeno *Histoplasma capsulatum* foi

submetido em uma condição que mimetiza os macrófagos do hospedeiro (privação de zinco). As análises do grupo apontaram que após 24h sob privação, a via glicotílica foi uma das que se demonstrou reprimida e que a glicose estaria sendo utilizada para fins estruturais (ASSUNCAO et al., 2020).

8.5 O conteúdo de quitina é diminuído quando *F. pedrosoi* é cultivado a temperatura do hospedeiro

O crescimento de *F. pedrosoi* a 37°C promoveu a repressão de enzimas envolvidas no remodelamento da parede celular, tais como: manose-6-fosfato isomerase, alpha manosidade, UDP-glicose-epimerase, fosfomanomutase, 1,3-beta-glucanosiltransferase, UDP-N-acetilglucosaminadifosforilase, e alfa-1,4 glucanofosforilase. Este resultado foi confirmado por nossas análises de dosagem de quitina por microscopia e medição de intensidade de fluorescência (Figura 10), onde observa-se menor quantidade de quitina nas células cultivadas à 37°C quando comparadas as cultivadas a 28°C nos tempos de 24 horas e 48 horas.

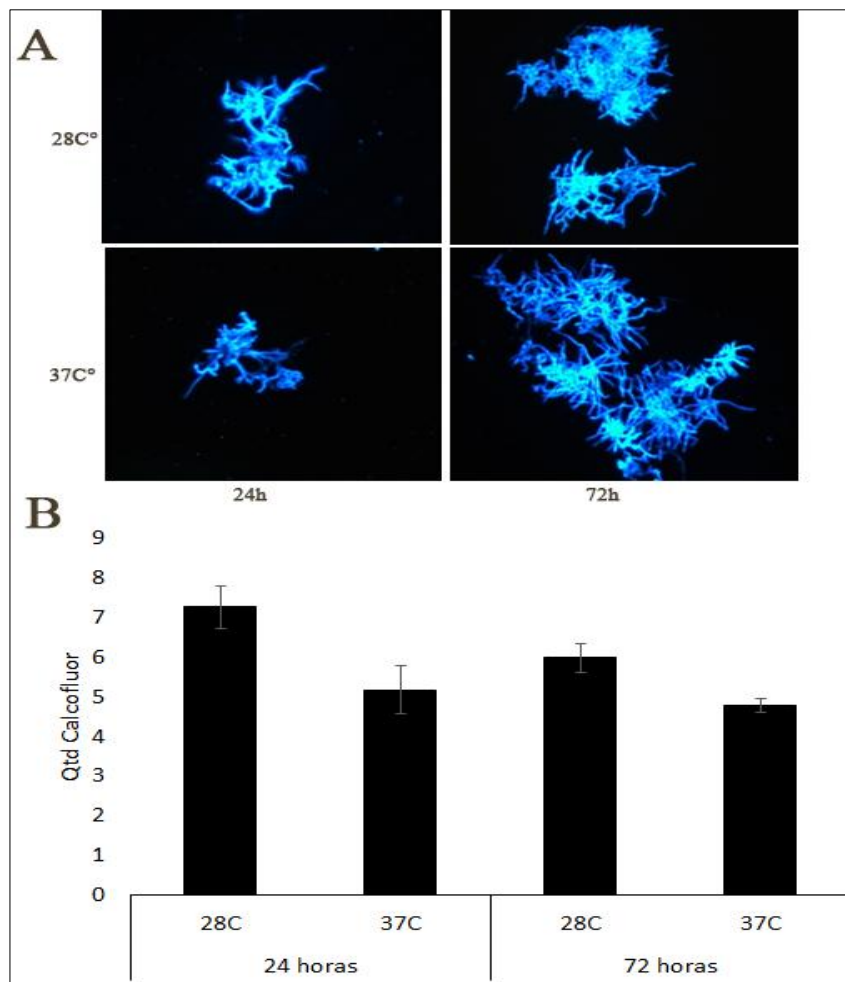


Figura 10: Efeito da mudança de temperatura na parede celular de culturas de *F. pedrosoi*. (A) Microscopia de fluorescência de *F. pedrosoi* cultivado à 28 e 37°C. As células foram marcadas com corante fluorescente calcofluor white após 24 e 72 horas de crescimento. (B) Quantificação de intensidade de fluorescência das culturas de *F. pedrosoi* cultivado à 28 e 37°C obtidas pelo software Axion Vision V 4.8.2.0 (Carl Zeiss). Os valores de densidade de pixels e área de cada célula foram adquiridos e utilizados para calcular a intensidade e fluorescência como descrito na seção materiais e métodos. Os dados foram expressos no gráfico com as médias da intensidade de fluorescência. A análise estatística foi realizada usando o teste t de Student considerando o valor de $p \leq 0,05$.

A parede celular fúngica é uma estrutura complexa, altamente dinâmica e tem a quitina como um dos principais componentes em sua composição. Esse polímero é essencial e contribui para resistência e integridade da parede celular (ADAMS 2004; BAKER et al., 2007). Muitos trabalhos têm discutido a remodelação da parede celular de fungos como um mecanismo para se adaptarem ao ambiente do hospedeiro, uma vez que estes patógenos transitam sua morfologia quando submetidos à temperatura do hospedeiro (SIL, ANDRIANOPOULOS, 2015). Bastos e equipe (2007) avaliaram o

perfil de expressão de *P. brasiliensis* na fase de transição de micélio para levedura e observaram que a transcrição de 34 genes relacionados a biogênese de membrana e parede celular foram regulados positivamente, indicando a necessidade de remodelação nos estágios iniciais da transição morfológica de *P. brasiliensis* (BASTOS et al., 2007). Chaves e equipe (2019) buscaram avaliar as respostas de *P. brasiliensis* durante a interação com macrófagos e encontraram que a indução de proteínas relacionada a síntese de precursores da parede celular, tais como quitina, estava relacionado ao acúmulo de enzimas da via glicolítica (CHAVES et al., 2019). Em oposição, observamos em nosso trabalho que *F. pedrosoi* reprime muitas enzimas envolvidas na via glicolítica, afetando, portanto, a síntese de precursores da parede celular, uma vez que não há acúmulo de enzimas glicolíticas. Dados similares foram observados por Petito e grupo (2020) no qual observaram que quando submetido a uma condição que mimetiza o hospedeiro (privação de cobre), *P. brasiliensis* apresentou perfil de proteínas relacionadas à síntese de polímeros da parede celular induzidas, sugerindo que a glicose gerada pelo ciclo do glioxilato estaria sendo utilizada para remodelar a parede celular deste fungo (PETITO et al., 2020). Os achados citados acima sugerem que a repressão da via glicolítica e do ciclo do glioxilato, como encontrado em nossas análises proteômicas, possa estar relacionada a diminuição dos níveis quitina, como encontrado em nossos resultados de dosagem de quitina. Uma vez que a repressão dessas vias gera menos precursores da via de biossíntese de parede, justifica-se o que encontramos em nossas análises proteômicas, as quais apontam repressão de enzimas das vias glicolítica e ciclo do glioxilato bem como a repressão de enzimas envolvidas na biossíntese de parede com nossos dados de dosagem de quitina. Acredita-se ainda que esses achados estejam em conformidade para o que encontramos para o crescimento de *F. pedrosoi*, que aparentou ser mais lento à 37°C e com menor taxa de melanização.

A melanina tem sido descrita como um componente de parede celular em diversos patógenos fúngicos como *A. fumigatus* (PIHET et al., 2009), *C. neoformans* (EISENMAN et al., 2005), *Sporothrix spp.* (ALMEIDA-PAES et al., 2017), *P. brasiliensis* (TABORDA et al., 2008) e também em *F. pedrosoi* (CUNHA et al., 2010), que confere integridade estrutural como constituinte da parede celular. Trabalhos realizados com *C. neoformans* encontraram que a melanina estava menos retida na parede celular de cepas deficientes na produção de quitina. Foi observado certo

vazamento desse pigmento para o meio extracelular, sugerindo que a mudança na composição da parede celular reduz a capacidade da parede se ligar à melanina ou ainda que os componentes de parede celular forneçam suporte para as proteínas da via de síntese de melanina (BAKER et al., 2007; BANKS et al., 2005). Apesar de nossas análises não terem observado vazamento de melanina para o meio extracelular nas culturas de 37°C acredita-se que a alteração na composição da parede celular, como a redução nos níveis de quitina, possa influenciar a síntese de melanina, uma vez que este polímero é depositado nessa organela. Portanto, acredita-se que alterações na parede celular possam acarretar a repressão de enzimas da via de biossíntese de melanina de *F. pedrosoi* quando submetido ao estresse de temperatura, sugerindo uma possível relação entre a síntese de parede celular e melanina.

Diante disso, nosso estudo explana que inicialmente *F. pedrosoi* sofre alterações na parede celular após ser submetido ao estresse de temperatura. Acredita-se que a repressão da glicólise e ciclo do glioxilato estejam relacionadas com a diminuição dos níveis de quitina, uma vez que os precursores da via glicolítica não estão sendo devidamente entregues para a via de biossíntese de parede celular. Por fim, na medida em que a melanina é depositada na parede celular e que ocorrem alterações nesta organela, salienta-se que a biossíntese de melanina seja influenciada e reprimida em decorrência das modificações ocasionadas na parede celular.

9. CONCLUSÕES

Em primeiro momento, nosso trabalho identificou e caracterizou proteínas celulares de *F. pedrosoi* submetido à temperatura do hospedeiro (37°C), no qual foi possível mapear rotas metabólicas e obter maior compreensão dos mecanismos que *F. pedrosoi* utiliza em uma condição que mimetiza uma das características do hospedeiro. Foi possível observar que *F. pedrosoi* promove uma minuciosa remodelação metabólica em resposta ao estresse de temperatura. Tal resposta envolve a repressão de vias como glicólise, TCA, ciclo do glioxilato, biossíntese de parede celular e melanina e em contrapartida induz enzimas de degradação de aminoácidos e proteínas antioxidantes. Essas respostas parecem ser utilizadas como primeira linha de defesa por este fungo sob estresse de temperatura. Trabalhos que comparem o perfil proteômico de fungos não termodimórficos submetidos à temperatura do hospedeiro ainda são muito escassos na literatura. Nesse sentido, o presente trabalho fornece informações valiosas diante da carência de dados que visam à abordagem proteômica para fungos negros, especialmente *F. pedrosoi*, e lança novas perspectivas a respeito das respostas metabólicas que este fungo negro assume em condições que mimetizam a infecção.

Referências Bibliográficas

ABRASHEV, Radoslav I. et al. Heat-shock-induced oxidative stress and antioxidant response in *Aspergillus niger* 26. **Canadian journal of microbiology**, v. 54, n. 12, p. 977-983, 2008.

ADAMS, David J. Fungal cell wall chitinases and glucanases. **Microbiology**, v. 150, n. 7, p. 2029-2035, 2004.

ALBRECHT, Daniela et al. Integrative analysis of the heat shock response in *Aspergillus fumigatus*. **BMC genomics**, v. 11, n. 1, p. 1-17, 2010.

ALMEIDA-PAES, Rodrigo et al. Melanin biosynthesis in pathogenic species of *Sporothrix*. **Fungal Biology Reviews**, v. 31, n. 1, p. 50-59, 2017.

ALSPAUGH, J. Andrew et al. RAS1 regulates filamentation, mating and growth at high temperature of *Cryptococcus neoformans*. **Molecular microbiology**, v. 36, n.2, p. 352-365, 2000.

ALVIANO, Celuta S. et al. Characterization of *Fonsecaea pedrosoi* melanin. **Microbiology**, v. 137, n. 4, p. 837-844, 1991.

ALVIANO, Celuta S. et al. Effect of environmental factors on *Fonsecaea pedrosoi* morphogenesis with emphasis on sclerotic cells induced by propranolol. **Mycopathologia**, v. 119, n. 1, p. 17-23, 1992.

ALVIANO, Daniela S. et al. Melanin from *Fonsecaea pedrosoi* induces production of human antifungal antibodies and enhances the antimicrobial efficacy of phagocytes. **Infection and immunity**, v. 72, n. 1, p. 229-237, 2004.

AMEEN, M. Chromoblastomycosis: clinical presentation and management. **Clinical and Experimental Dermatology: Clinical dermatology**, v. 34, n. 8, p. 849-854, 2009.

ANGIOLELLA, Letizia et al. Biofilm, adherence, and hydrophobicity as virulence factors in *Malassezia furfur*. **Medical mycology**, v. 56, n. 1, p. 110-116, 2018.

ARAÚJO, Danielle Silva et al. Metabolic peculiarities of *Paracoccidioides brasiliensis* dimorphism as demonstrated by iTRAQ labeling proteomics. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 555, 2019.

ASSUNCAO, Leandro do Prado et al. Insights into *Histoplasma capsulatum* behavior on zinc deprivation. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 10, p. 711, 2020.

BAILÃO, Elisa Flávia Luiz Cardoso et al. Hemoglobin uptake by *Paracoccidioides* spp. is receptor-mediated. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 5, p. e2856, 2014.

BAKAR, Nurlizah Abu; KARSANI, Saiful Anuar; ALIAS, Siti Aisyah. Fungal survival under temperature stress: a proteomic perspective. **PeerJ**, v. 8, p. e10423, 2020.

- BAKER, Lorina G. et al. Chitosan, the deacetylated form of chitin, is necessary for cell wall integrity in *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic cell**, v. 6, n. 5, p. 855-867, 2007.
- BANKS, Isaac R. et al. A chitin synthase and its regulator protein are critical for chitosan production and growth of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic cell**, v. 4, n. 11, p. 1902-1912, 2005.
- BASTOS, Karinne P. et al. The transcriptome analysis of early morphogenesis in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium reveals novel and induced genes potentially associated to the dimorphic process. **BMC microbiology**, v. 7, n. 1, p. 1-14, 2007.
- BLOOM, Amanda LM et al. Thermotolerance in the pathogen *Cryptococcus neoformans* is linked to antigen masking via mRNA decay-dependent reprogramming. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 1-13, 2019.
- BONIFAZ, Alexandro; PAREDES-SOLÍS, Vanessa; SAÚL, Amado. Treating chromoblastomycosis with systemic antifungals. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 5, n. 2, p. 247-254, 2004.
- BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BRITO, Arival Cardoso de; BITTENCOURT, Maraya de Jesus Semblano. Chromoblastomycosis: an etiological, epidemiological, clinical, diagnostic, and treatment update. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 93, n. 4, p. 495-506, 2018.
- BROWN, Gordon D. et al. Hidden killers: human fungal infections. **Science translational medicine**, v. 4, n. 165, p. 165rv13-165rv13, 2012.
- CARRIÓN, Arturo L. Chromoblastomycosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 50, n. 10, p. 1255-1282, 1950.
- CARUSO, M. et al., Heat shock 70 gene is differentially expressed in *Histoplasma capsulatum* strains with different levels of thermotolerance and pathogenicity. **Molecular microbiology**, v. 1, n. 2, p. 151-158, 1987.
- CASTRO, Luiz GM; PIMENTEL, Eugênio RA; LACAZ, Carlos S. Treatment of chromomycosis by cryosurgery with liquid nitrogen: 15 years' experience. **International journal of dermatology**, v. 42, n. 5, p. 408-412, 2003.
- CHAVES, Edilânia Gomes Araújo et al. Proteomic analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* during infection of alveolar macrophages primed or not by interferon-gamma. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 96, 2019.
- CHEW, Shu Yih; CHEE, Wallace Jeng Yang; THAN, Leslie Thian Lung. The glyoxylate cycle and alternative carbon metabolism as metabolic adaptation strategies of *Candida glabrata*: perspectives from *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of biomedical science**, v. 26, n. 1, p. 1-10, 2019.
- COONEY, Nicole M.; KLEIN, Bruce S. Fungal adaptation to the mammalian host: it is a new world, after all. **Current opinion in microbiology**, v. 11, n. 6, p. 511-516, 2008.

CORDERO, Radames JB; CASADEVALL, Arturo. Functions of fungal melanin beyond virulence. **Fungal Biology Reviews**, v. 31, n. 2, p. 99-112, 2017.

CUNHA, Marcel ML et al. Inhibition of melanin synthesis pathway by tricyclazole increases susceptibility of *Fonsecaea pedrosoi* against mouse macrophages. **Microscopy research and technique**, v. 68, n. 6, p. 377-384, 2005.

CUNHA, Marcel ML et al. Melanin in *Fonsecaea pedrosoi*: a trap for oxidative radicals. **BMC microbiology**, v. 10, n. 1, p. 80, 2010.

DA SILVA, Jorge P. et al. Comparison of *Fonsecaea pedrosoi* sclerotic cells obtained in vivo and in vitro: ultrastructure and antigenicity. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 63-69, 2002.

DA SILVA RODRIGUES, Leandro Nascimento et al. Osmotic stress adaptation of *Paracoccidioides lutzii*, Pb01, monitored by proteomics. **Fungal Genetics and Biology**, v. 95, p. 13-23, 2016.

DIXON, D. M. et al. Melanized and non-melanized multicellular form mutants of *Wangiella dermatitidis* in mice: mortality and histopathology studies: Melanin-bildende und nicht Melanin-bildendemultizelluläre Mutanten von *Wangiella dermatitidis* in Mäusen: Mortalitäts- und Gewebsuntersuchungen. **Mycoses**, v. 35, n. 1-2, p. 17-21, 1992.

DOYLE, Sean. Fungal proteomics: from identification to function. **FEMS microbiology letters**, v. 321, n. 1, p. 1-9, 2011.

DO AMARAL, Cristiane Candida et al. Proteomic analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* complex isolates: Correlation of the levels of differentially expressed proteins with in vivo virulence. **PLoS one**, v. 14, n. 7, p. e0218013, 2019.

DO, Jin Hwan; YAMAGUCHI, Rui; MIYANO, Satoru. Exploring temporal transcription regulation structure of *Aspergillus fumigatus* in heat shock by state space model. **BMC genomics**, v. 10, n. 1, p. 1-16, 2009.

EISENMAN, Helene C. et al. Microstructure of cell wall-associated melanin in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Biochemistry**, v. 44, n. 10, p. 3683-3693, 2005.

ESTERRE, Philippe; QUEIROZ-TELLES, Flavio. Management of chromoblastomycosis: novel perspectives. **Current opinion in infectious diseases**, v. 19, n. 2, p. 148-152, 2006.

FENG, Peiying; DE HOOG, G. S. *Fonsecaea* and Chromoblastomycosis. In: **Current Progress in Medical Mycology**. Springer, Cham, 2017. p. 333-353.

FRANZEN, Anderson J. et al. Effects of tricyclazole (5-methyl-1, 2, 4-triazol [3, 4] benzothiazole), a specific DHN-melanin inhibitor, on the morphology of *Fonsecaea pedrosoi* conidia and sclerotic cells. **Microscopy research and technique**, v. 69, n. 9, p. 729-737, 2006.

FRANZEN, Anderson J. et al. Ultrastructural characterization of melanosomes of the human pathogenic fungus *Fonsecaea pedrosoi*. **Journal of structural biology**, v. 162, n. 1, p. 75-84, 2008.

GAO, Liman et al. Advances in mechanisms and modifications for rendering yeast thermotolerance. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 121, n. 6, p. 599-606, 2016.

GAUTHIER, Gregory M. Dimorphism in fungal pathogens of mammals, plants, and insects. **PLoS pathogens**, v. 11, n. 2, p. e1004608, 2015.

GUIMARÃES, Allan Jefferson et al. *Histoplasma capsulatum* heat-shock 60 orchestrates the adaptation of the fungus to temperature stress. **PLoS One**, v. 6, n. 2, p. e14660, 2011.

HAGIWARA, Daisuke et al. Temperature during conidiation affects stress tolerance, pigmentation, and tryptacidin accumulation in the conidia of the airborne pathogen *Aspergillus fumigatus*. **PLoS One**, v. 12, n. 5, p. e0177050, 2017.

HAZEN, Kevin C.; HAZEN, Beth W. Temperature-modulated physiological characteristics of *Candida albicans*. **Microbiology and immunology**, v. 31, n. 6, p. 497-508, 1987.

HEIDRICH, Daiane et al. Melanin: Quantification and protection against oxidative stress in chromoblastomycosis agents. **Medical mycology**, v. 57, n. 2, p. 260-263, 2019.

HIRUMA, Masataro et al. Hyperthermic treatment of chromomycosis with disposable chemical pocket warmers. **Mycopathologia**, v. 122, n. 2, p. 107-114, 1993.

HOTEZ, Peter J.; KAMATH, Aruna. Neglected tropical diseases in sub-Saharan Africa: review of their prevalence, distribution, and diseases burden. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 3, n. 8, 2009.

HOTEZ, Peter J. et al. Control of neglected tropical diseases. **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 10, p. 1018-1027, 2007.

INGLIS, Diane O. et al. Comparative transcriptomics of infectious spores from the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum* reveals a core set of transcripts that specify infectious and pathogenic states. **Eukaryotic cell**, v. 12, n. 6, p. 828-852, 2013.

JAMESDANIEL, Samson; SALVI, Richard; COLING, Donald. Auditory proteomics: methods, accomplishments and challenges. **Brain research**, v. 1277, p. 24-36, 2009.

KIM, Il-Sup et al. Heat shock causes oxidative stress and induces a variety of cell rescue proteins in *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377. **Journal of microbiology**, v. 44, n. 5, p. 492-501, 2006.

KRISTENSEN, Torsten N. et al. Research on inbreeding in the 'omic'era. **Trends in ecology & evolution**, v. 25, n. 1, p. 44-52, 2010.

KRZYŚCIAK, Paweł M.; PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA, Małgorzata; PIASZCZYŃSKI, Michał. Chromoblastomycosis. **Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii i Alergologii**, v. 31, n. 5, p. 310, 2014.

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

LANGFELDER, Kim et al. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 38, n. 2, p. 143-158, 2003.

LAURENT-WINTER, Christine; IBRAHIM-GRANET, Oumaima. Heat-shock response in *Fonsecaea pedrosoi*, a pathogenic fungus. **Canadian journal of microbiology**, v. 38, n. 12, p. 1286-1291, 1992.

LEE, Jung-Kul; JUNG, Hyung-Moo; KIM, Sang-Yong. 1, 8-dihydroxynaphthalene (DHN)-melanin biosynthesis inhibitors increase erythritol production in *Torula corallina*, and DHN-melanin inhibits erythrose reductase. **Applied and environmental microbiology**, v. 69, n. 6, p. 3427-3434, 2003.

LIMONGI, Cristiana L. et al. The influence of surface carbohydrates on the interaction of *Fonsecaea pedrosoi* with Chinese hamster ovary glycosylation mutant cells. **Mycopathologia**, v. 138, n. 3, p. 127, 1997.

LIMONGI, Cristiana L.; DE SOUZA, Wanderley; ROZENTAL, Sonia. Protein kinase antagonists inhibit invasion of mammalian cells by *Fonsecaea pedrosoi*. **Journal of medical microbiology**, v. 52, n. 3, p. 201-209, 2003.

LINDQUIST, Suzan; CRAIG, Elizabeth A. The heat-shock proteins. **Annual review of genetics**, v. 22, n. 1, p. 631-677, 1988.

LIU, Hongbo et al. *Wangiella (Exophiala) dermatitidis* WdChs5p, a class V chitin synthase, is essential for sustained cell growth at temperature of infection. **Eukaryotic Cell**, v. 3, n. 1, p. 40-51, 2004.

LOW, Swee Yang et al. The allergenicity of *Aspergillus fumigatus* conidia is influenced by growth temperature. **Fungal biology**, v. 115, n. 7, p. 625-632, 2011.

LYON, Juliana Pereira et al. Photodynamic antifungal therapy against chromoblastomycosis. **Mycopathologia**, v. 172, n. 4, p. 293-297, 2011.

LYON, Juliana Pereira et al. In vitro photodynamic therapy against *Fonsecaea pedrosoi* and *Cladophialophora carrionii*. **Mycoses**, v. 56, n. 2, p. 157-161, 2013.

MARTÍNEZ, Rubén López; TOVAR, Luis Javier Méndez. Chromoblastomycosis. **Clinics in dermatology**, v. 25, n. 2, p. 188-194, 2007.

MCCUSKER, John H. et al., Genetic Characterization of pathogenic *Saccharomyces cerevisiae* isolates. **Genetics**, v. 136, n. 4, p. 1261-1269, 1994.

MEDOFF, G. et al., Correlation between pathogenicity and temperature sensitivity in different strains of *Histoplasma capsulatum*. **The Journal of clinical investigation**, v. 78, n. 6, p. 1638-1647, 1986.

MINOTTO, Renan et al. Chromoblastomycosis: a review of 100 cases in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 44, n. 4, p. 585-592, 2001.

MONTEIRO, R. et al. Proteome of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain of sequence type ST398. **Journal of proteomics**, v. 75, n. 10, p. 2892-2915, 2012.

MORANO, Kevin A.; GRANT, Chris M.; MOYE-ROWLEY, W. Scott. The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 190, n. 4, p. 1157-1195, 2012.

MORENO, Leandro Ferreira; VICENTE, Vania Aparecida; DE HOOG, Sybren. Black yeasts in the omics era: achievements and challenges. **Medical Mycology**, v. 56, n. suppl_1, p. S32-S41, 2018.

MURAD, André M. et al. Detection and expression analysis of recombinant proteins in plant-derived complex mixtures using nanoUPLC-MSE. **Journal of separation science**, v. 34, n. 19, p. 2618-2630, 2011.

MURAD, Andre M.; RECH, Elibio L. NanoUPLC-MS E proteomic data assessment of soybean seeds using the Uniprot database. **BMC biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 82, 2012.

NICHOLS, Connie B.; PERFECT, Zahra H.; ALSPAUGH, J. Andrew. A Ras1-Cdc24 signal transduction pathway mediates thermotolerance in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Molecular microbiology**, v. 63, n. 4, p. 1118-1130, 2007.

NIERMAN, William C. et al. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. **Nature**, v. 438, n. 7071, p. 1151-1156, 2005.

NIMRICHTER, Leonardo et al. Structure, cellular distribution, antigenicity, and biological functions of *Fonsecaea pedrosoi* ceramide monohexosides. **Infection and immunity**, v. 73, n. 12, p. 7860-7868, 2005.

NOSANCHUK, Joshua D.; STARK, Ruth E.; CASADEVALL, Arturo. Fungal melanin: what do we know about structure?. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 1463, 2015.

OTTO, Andreas et al. Global relative and absolute quantitation in microbial proteomics. **Current opinion in microbiology**, v. 15, n. 3, p. 364-372, 2012.

PADHYE, A. A.; MCGINNIS, M. R.; AJELLO, L. Thermotolerance of *Wangiella dermatitidis*. **Journal of clinical microbiology**, v. 8, n. 4, p. 424-426, 1978.

PARENTE-ROCHA, Juliana Alves et al. Macrophage interaction with *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells modulates fungal metabolism and generates a response to oxidative stress. **PloSone**, v. 10, n. 9, p. e0137619, 2015.

PARENTE-ROCHA, Juliana Alves et al. In vitro, ex vivo and in vivo models: A comparative analysis of *Paracoccidioides* spp. proteomic studies. **Fungal biology**, v. 122, n. 6, p. 505-513, 2018.

PATTERSON, Scott D.; AEBERSOLD, Ruedi H. Proteomics: the first decade and beyond. **Nature genetics**, v. 33, n. 3, p. 311-323, 2003.

PETITO, Guilherme et al. Metabolic Adaptation of *Paracoccidioides brasiliensis* in Response to in vitro Copper Deprivation. **Frontiers in microbiology**, v. 11, p. 1834, 2020.

PIHET, Marc et al. Melanin is an essential component for the integrity of the cell wall of *Aspergillus fumigatus* conidia. **BMC microbiology**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2009.

QUEIROZ-TELLES, Flavio et al. Mycoses of implantation in Latin America: an overview of epidemiology, clinical manifestations, diagnosis and treatment. **Medical mycology**, v. 49, n. 3, p. 225-236, 2011.

QUEIROZ-TELLES, Flavio. Chromoblastomycosis: a neglected tropical disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, p. 46-50, 2015.

QUEIROZ-TELLES, Flavio et al. Neglected endemic mycoses. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 11, p. e367-e377, 2017a.

QUEIROZ-TELLES, Flavio et al. Chromoblastomycosis. **Clinical microbiology reviews**, v. 30, n. 1, p. 233-276, 2017b.

QUEITSCH, Christine et al. Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 12, n. 4, p. 479-492, 2000.

RASAMOELINA, T. et al. Chromoblastomycosis and sporotrichosis, two endemic but neglected fungal infections in Madagascar. *Journal de mycologie medicale*, v. 27, n. 3, p. 312-324, 2017.

REVANKAR, Sanjay G.; SUTTON, Deanna A. Melanized fungi in human disease. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 4, p. 884-928, 2010.

REZENDE, Tereza CV et al. A quantitative view of the morphological phases of *Paracoccidioides brasiliensis* using proteomics. **Journal of proteomics**, v. 75, n. 2, p. 572-587, 2011.

RODRIGUES, Marcio L. et al. Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. **Eukaryotic cell**, v. 7, n. 1, p. 58-67, 2008.

RUEPP, Andreas et al. The FunCat, a functional annotation scheme for systematic classification of proteins from whole genomes. **Nucleic acids research**, v. 32, n. 18, p. 5539-5545, 2004.

SANTOS, André LS et al. Biology and pathogenesis of *Fonsecaea pedrosoi*, the major etiologic agent of chromoblastomycosis. **FEMS microbiology reviews**, v. 31, n. 5, p. 570-591, 2007.

SEYEDMOUSAVI, Seyedmojtaba et al. Black yeasts and their filamentous relatives: principles of pathogenesis and host defense. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 3, p. 527-542, 2014.

SIL, Anita; ANDRIANOPOULOS, Alex. Thermally dimorphic human fungal pathogens—polyphyletic pathogens with a convergent pathogenicity trait. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 5, n. 8, p. a019794, 2015.

SILVA, Margarita. The parasitic phase of the fungi of chromoblastomycosis: development of sclerotic cells in vitro and in vivo. **Mycologia**, v. 49, n. 3, p. 318-331, 1957.

SZANISZLO, P. J.; HSIEH, P. H.; MARLOWE, J. D. Induction and ultrastructure of the multicellular (sclerotic) morphology in *Phialophora dermatitidis*. **Mycologia**, v. 68, n. 1, p. 117-130, 1976.

TABORDA, Carlos P. et al. Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi: a minireview. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 331, 2008.

TEIXEIRA, M. de M. et al. Exploring the genomic diversity of black yeasts and relatives (Chaetothyriales, Ascomycota). **Studies in mycology**, v. 86, p. 1-28, 2017.

TERRA, F. et al. Novo tipo de dermatite verrucosa; micose por *Acrotheca* com associação de leishmaniose. **BrasMed**, v. 36, p. 363-368, 1922.

TORRES-GUERRERO, Edoardo et al. Chromoblastomycosis. **Clinics in dermatology**, v. 30, n. 4, p. 403-408, 2012.

TRONCHIN, Guy et al. Adherence mechanisms in human pathogenic fungi. **Sabouraudia**, v. 46, n. 8, p. 749-772, 2008.

VAN DE SANDE, Wendy WJ et al. Melanin biosynthesis in *Madurellamyces tomatis* and its effect on susceptibility to itraconazole and ketoconazole. **Microbes and infection**, v. 9, n. 9, p.

WALKER, John M. (Ed.). **The protein protocols handbook**. Springer Science & Business Media, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report of the tenth meeting of the WHO strategic and technical advisory group for neglected tropical diseases. **Neglected tropical diseases**, 2017a. [acessoem 23 abril 2020].

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Integrating neglected tropical diseases into global health and development: fourth WHO report on neglected tropical diseases**. World Health Organization, 2017b. [acessoem 23 de abril 2020].

XIAO, Xing et al. Deletion of *pksA* attenuates the melanogenesis, growth and sporulation ability and causes increased sensitivity to stress response and antifungal drugs in the human pathogenic fungus *Fonsecaea monophora*. **Microbiological Research**, v. 244, p. 126668, 2021.

YE, Yanrui et al. Gaining insight into the response logic of *Saccharomyces cerevisiae* to heat shock by combining expression profiles with metabolic pathways. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 385, n. 3, p. 357-362, 2009.

