

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

**DAVI VINÍCIUS DE LIMA**

**Análise proteômica do fungo patogênico humano *Fonsecaea pedrosoi*,  
cultivado nas condições de temperatura de 22° C e 36° C**

**GOIÂNIA  
2017**

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

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

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

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: Davi Vinícius de Lima

Título do trabalho: Análise proteômica do fungo patogênico humano *Fonsecaea pedrosoi*, cultivado nas condições de temperatura de 22° C e 36° C

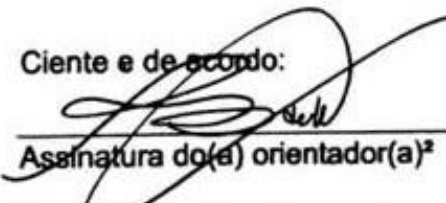
3. Informações de acesso ao documento:

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

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

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

Ciente e de acordo:

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

Data: 30/09/19

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

Casos de embargo:

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

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

**DAVI VINÍCIUS DE LIMA**

**Análise proteômica do fungo patogênico humano *Fonsecaea pedrosoi*,  
cultivado nas condições de temperatura de 22° C e 36° C**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Goiás, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Alexandre Melo Bailão**

**GOIÂNIA  
2017**

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

Lima, Davi Vinícius de

Análise proteômica do fungo patogênico humano *Fonsecaea pedrosoi*, cultivado nas condições de temperatura de 22° C e 36° C [manuscrito] / Davi Vinícius de Lima. - 2017.

XVI, 51 f.: il.

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, 2017.

Bibliografia.

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

1. Cromoblastomicose. 2. Proteoma. 3. Secretoma. 4. Virulência.  
I. Bailão, Alexandre Melo, orient. II. Título.

CDU 575



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

1       **ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Nº 053**

2       Aos onze dias do mês de setembro do ano de dois mil e dezessete  
3       (11/09/2017), às 14hs00min, no (a) Anfiteatro do ICB II, reuniram-se os  
4       componentes da banca examinadora: **Prof. Dr. Alexandre Melo Bailão,**  
5       **Prof. Dr. Juliano Domiraci Paccez e Prof. Dr. Evandro Novaes** para,  
6       em sessão pública presidida pelo primeiro examinador citado, procederem à  
7       avaliação da defesa de dissertação intitulada: **"Análise proteômica do**  
8       **fungo patogênico humano *Fonsecaea pedrosoi*, cultivado nas**  
9       **condições de temperatura de 22°C e 36°C."**, em nível de mestrado,  
10      área de concentração em **Genética e Biologia Molecular**, de autoria de **Davi**  
11      **Vinícius de Lima**, discente do Programa de Pós-Graduação em Genética e  
12      Biologia Molecular da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo  
13      presidente, que fez a apresentação formal dos membros da banca. A palavra,  
14      a seguir, foi concedida ao autor da dissertação que, em cerca de 42  
15      minutos, procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a  
16      apresentação, cada membro da banca arguiu o examinado, tendo-se adotado  
17      o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à  
18      avaliação da dissertação. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº  
19      1294/2014 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que  
20      regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular,  
21      a dissertação foi aprovada, considerando-se integralmente  
22      cumprido este requisito para fins de obtenção do título de Mestre em Genética  
23      e Biologia Molecular pela Universidade Federal de Goiás. A conclusão do curso  
24      dar-se-á quando da entrega da versão definitiva da dissertação na secretaria  
25      do programa, com as devidas correções sugeridas pela banca examinadora. no



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

27 pauta, às 16 horas e 15 minutos, encerrou-se a sessão de defesa  
28 e, para constar, eu, Gleizilene Braz Pereira dos Santos, Assistente em  
29 Administração do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de  
30 Goiás, lavrei a presente ata que, após lida e aprovada, será assinada pelos  
31 membros da banca examinadora em três vias de igual teor.

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

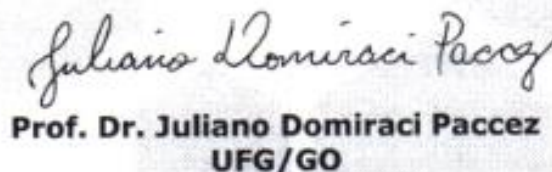
47

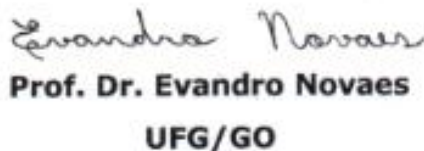
48

49

50

  
**Prof. Dr. Alexandre Melo Bailão**  
**Presidente da Banca**  
**UFG/GO**

  
**Prof. Dr. Juliano Domiraci Paccez**  
**UFG/GO**

  
**Prof. Dr. Evandro Novaes**  
**UFG/GO**




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

SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 53

TÍTULO DO TRABALHO: **ANÁLISE PROTEÔMICA DO FUNGO PATOGENICO HUMANO *Fonsecaea pedrosoi*, CULTIVADO NAS CONDIÇÕES DE TEMPERATURA DE 22°C E 36°C .”.**

AUTOR (A): **DAVI VINÍCIUS DE LIMA**

DISSERTAÇÃO Nº 053 DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR, DEFENDIDA E APROVADA EM SESSÃO PÚBLICA, NA DATA DE 11 DE SETEMBRO DE 2017, ÀS 14hs00min, NO (A) ANFITEATRO DO ICB II DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UFG, CUJA BANCA EXAMINADORA ESTEVE CONSTITUÍDA DOS SEGUINTE PROFESSORES:

 ..... <b>Prof. Dr. Alexandre Melo Bailão</b> Universidade Federal de Goiás	
 ..... <b>Prof. Dr. Juliano Domiraci Paccez</b> Universidade Federal de Goiás	 ..... <b>Prof. Dr. Evandro Novaes</b> Universidade Federal de Goiás

HOUVE MUDANÇA NO TÍTULO? SIM( ) NÃO (X)

CASO HAJA MUDANÇA, ESCREVER ABAIXO O NOVO TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:

.....  
.....  
.....

OBS: O título na dissertação impressa deve corresponder exatamente ao que se encontra na ata.

GOIÂNIA (GO) 11.09.2017

**TRABALHO REALIZADO NO LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR, DO DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS.**

**APOIO FINANCEIRO: CAPES/ CNPq/ FINEP/ FAPEG/UFG.**

## **BANCA EXAMINADORA**

### **TITULARES**

**Prof. Dr. Alexandre Melo Bailão – Presidente da banca**

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás

**Prof. Dr. Juliano Domiraci Paccez**

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás

**Prof. Dr. Evandro Novaes**

Melhoramento de Plantas, Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás

O que não me mata, me torna mais forte.

-Friedrich Nietzsche-

## DEDICATÓRIA

*Às pessoas que mais amo, prezo e admiro, pois sem elas não conseguiria concluir este árduo trabalho. Com imensa alegria e orgulho dedico este trabalho aos meus pais Osvair Júnior e Elenice que sempre me acompanharam, me ampararam e me mantiveram nos trilhos.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente e imensamente aos meus pais, que sempre me ensinaram o certo e errado, me ampararam e dedicaram-se a mim intensamente. O apoio de vocês foi primordial para realização desse trabalho. Obrigado por tudo!

À minha linda princesa, Juliana, que amo e que sempre está compartilhando comigo os momentos felizes e me apoiando e fortalecendo nos momentos difíceis. Obrigado por sempre ser compreensiva com meus momentos de estresse e estudo, sei que são difíceis tais momentos, mas com seu apoio sempre consigo superá-los. Te amo!

Aos meus irmãos Lucas e Rafael que são duas pessoas excepcionais de muito alto astral sempre descontraídos e com quem vivo grandes momentos. Obrigado por proporcionarem esses grandes momentos.

Aos meus avós paternos Brás e Benedita e maternos Adelino e Teolina, sempre com histórias cheias de sabedoria e ensinamentos, obrigado, vocês são os melhores avós do mundo.

A todos os meus familiares (não citarei nomes, pois é uma família gigante) que me apoiam e torcem por mim em todos os momentos e que sempre lembram de mim, apesar de eu nem sempre estar presente nas reuniões familiares.

A todos os meus amigos, mas principalmente àqueles com quem compartilhei e vivi momentos de descontração e também momentos tensos no dia a dia de trabalho. André o cara que sempre brinca com tudo, mas que está disponível toda hora para ajudar, Luiz Paulo e Lele companheiros de estrada e trabalho com quem tive conversas excelentes e muitas vezes meio loucas kkkk, Gabriel companheiro nas funções do lab., nas viagens pra Anápolis e de congresso, Laura que sempre me ajudou na bancada e muito mais nessa reta final. Valeu galera, sem vocês os dias seriam muito chatos, a amizade que conquistei de vocês vou levar para a vida toda (apesar do Lele não achar).

Agradeço também ao Igor, Renato, Zairo, Guilherme Petito, Lucas Nojosa, vocês também são pessoas muito queridas com quem construí uma grande amizade, obrigado pelas conversas, pelas companhias nos lanches e por sempre me ajudarem no lab.

Também a todos os outros colegas de trabalho do LBM com quem convivi e partilhei muitos momentos bons.

Ao professor Alexandre que sempre esteve disposto a ensinar e orientar, dedicando seu tempo e seus conhecimentos. Obrigado pela oportunidade, pela paciência e conhecimentos dedicados a mim.

Ao Carlos e ao Kassyo que sempre estavam se dedicando no trabalho com fungos negros e nunca me negavam ajuda, muitos resultados foram alcançados com a colaboração de vocês, obrigado.

À toda a equipe docente do Laboratório de Biologia Molecular. Ao professor Evandro pela colaboração com as análises *in silico*.

Aos órgãos financiadores e principalmente a CAPES pela bolsa que auxiliou muito durante esse tempo.

Aos docentes que comporão a banca, pelo tempo e disposição dedicados.

E a todos aqueles que nesses dois anos me apoiaram, ajudaram e me deram força.

Obrigado!

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	XI
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	XII
<b>LISTA DE ABREVEATURAS</b> .....	XIII
<b>RESUMO</b> .....	XV
<b>ABSTRACT</b> .....	XVI
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
1.1 Cromoblastomicose (CBM) .....	17
1.2 Fonsecaea pedrosoi.....	21
1.3 Rotas de secreção .....	24
1.4 Secretoma .....	26
1.5 Secretoma de fungos patogênicos .....	27
1.6 Fatores de virulência em fungos negros .....	29
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>34</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>35</b>
3.1 Objetivos gerais .....	35
3.2 Objetivos específicos .....	35
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>36</b>
4.1 Análises in silico .....	36
4.1.1 Predição de proteínas extracelulares de F. pedrosoi.....	36
4.2 Cultivo de F. pedrosoi .....	37
4.3 Obtenção dos extratos proteicos.....	37
4.3.1 Extratos extracelulares .....	37
4.3.2 Extratos Intracelulares .....	37
4.4 Digestão trípica das amostras.....	38
4.5 Identificação proteica por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (Nano-UPLC-MS <sup>E</sup> ).....	39
4.6 Análises in silico das proteínas identificadas por NanoUPLC-MS <sup>E</sup> .....	40

<b>5</b>	<b>RESULTADOS e DISCUSSÃO .....</b>	<b>41</b>
5.1.1	Análises preditivas <i>in silico</i> .....	41
5.1.2	Obtenção dos extratos proteicos extracelulares .....	51
5.1.3	Análises por NanoUPLC-MS <sup>E</sup> .....	54
5.1.4	Análise das Proteínas extracelulares identificadas.....	54
5.1.5	Análise das Proteínas intracelulares identificadas.....	56
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>64</b>
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>66</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>67</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1: Distribuição geográfica mundial, demonstrando áreas endêmicas baseado em números de casos relatados..</b> .....	19
<b>Figura 2: Tipos clínicos de lesões observadas em pacientes com cromoblastomicose..</b> .....	20
<b>Figura 3: Lesões de cromoblastomicose com diferentes graus de severidade:</b> .....	21
<b>Figura 4: Morfologias de <i>Fonsecaea pedrosoi</i>.</b> .....	23
<b>Figura 5: Modelos clássicos e alternativos de secreção propostos em leveduras.....</b>	25

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Proteínas potencialmente secretadas por <i>F. pedrosoi</i> identificadas por análises in silico. ....	43
<b>Tabela 2:</b> Proteínas extracelulares preferencialmente expressas à 22° C. ....	57
<b>Tabela 3:</b> Proteínas secretadas exclusivamente a 36° C e secretadas preferencialmente à 36° C.....	59
<b>Tabela 4:</b> Proteínas Intracelulares Induzidas a 36° C.....	60
<b>Tabela 5:</b> Proteínas Intracelulares Reprimidas a 36° C.....	62

## LISTA DE ABREVEATURAS

BDA: meio batata dextrose ágar

BLAST: *Basic Local Alignment Tool* (ferramenta de alinhamento de sequências)

°C: graus celsius

CBM: Cromoblastomicose

cDNA: DNA complementar

DNA: ácido desoxirribonucléico

DNase: desoxirribonuclease

*Fp*: *Fonseaea pedrosoi*

g: grama

h: hora

L: litro

1D-PAGE: Eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DTT: Ditioneitol

FMD: Enzima formamidase

GPI: Glicosil Fosfatidil Inositol

HSPs: Proteínas de choque térmico

KEGG: *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*

LC-MS/MS: Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

MM: Massa molecular

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

PBS: Tampão salino fosfato

PHB: Fosforilase B de coelho

PLGS: *ProteinLynx Servidor Global*

RNA: Ácido ribonucleico

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: Eletroforese em dodecil-sulfato de sódio em gel de poliacrilamida

SecretomeP: Preditor de vias secreção alternativas de secreção

SignalP: Preditor de via clássica de secreção

TFA: Ácido trifluoracético

UPLC-MS<sup>E</sup>: Nano cromatografia líquida de ultra desempenho -  
espectrômetro de massas

## RESUMO

O fungo polimórfico *Fonsecaea pedrosoi* é o principal agente etiológico da Cromoblastomicose (CBM), caracterizada como uma infecção micótica cutânea crônica, ocorrendo principalmente em regiões tropicais. A limitada disponibilidade de protocolos terapêuticos eficazes somada ao polimorfismo clínico da CBM, conduzem a terapias que na maioria das vezes são prolongadas e de elevada taxa recidiva. Resultados a respeito da biologia molecular de *F. pedrosoi* são escassos, no entanto, alguns fatores de virulência já foram descritos, evidenciando a necessidade de se explorar os mecanismos utilizados por este patógeno durante a infecção. O presente trabalho realizou análises *in silico* e em condições de cultivo específicas, com temperaturas de 22° C e 36° C, visando entender melhor o proteoma deste fungo, tanto intracelular, quanto o secretado. Afim de identificar essas proteínas, foram utilizadas ferramentas bioinformáticas que se encontram disponíveis on-line e permitiram realizar a predição de conjuntos de proteínas que podem ser secretadas por rotas clássicas e não clássicas. Após o método de predição *in silico*, realizou-se a identificação de proteínas nos extratos fúngicos por meio da metodologia de Cromatografia Líquida de Ultrapformance acoplada à Espectrometria de Massas (UPLC-MS<sup>E</sup>). Os resultados *in silico* foram corroborados pelos identificados nos extratos o que trouxe uma interpretação mais fidedigna. Dentre as proteínas identificadas podemos destacar que estão relacionadas à diversos processos biológicos, tais como, metabolismo de compostos de carbono, energia, proteínas relacionadas ao estresse térmico e oxidativo, defesa, proteínas relacionadas ao ciclo celular, entre outras funções. As análises demonstraram que a grande maioria das proteínas identificadas são secretadas por vias alternativas, e os resultados apontam para a grande importância dos papéis biológicos que essas proteínas secretadas podem desempenhar durante o estabelecimento da infecção. Dessa forma, observa-se que o fungo apresenta variações nos níveis de expressão proteica de acordo com a condição abordada podendo refletir em seu comportamento e nas respostas para o sucesso do estabelecimento da infecção.

Palavras chave: Cromoblastomicose, proteoma, secretoma, virulência.

## ABSTRACT

The Polymorphic fungus *Fonsecaea pedrosoi* is the main etiological agent of Chromoblastomycosis (CBM), characterized as a chronic cutaneous mycotic infection, occurring mainly in tropical regions. The limited availability of effective therapeutic protocols coupled with CBM clinical polymorphism lead to often prolonged and high relapse rate therapies. Results regarding the molecular biology of *F. pedrosoi* are scarce, however, some virulence factors have already been described, evidencing the need to explore the mechanisms used by this pathogen during infection. The present work carried out *in silico* analyzes under specific culture conditions, with temperatures of 22° C and 36° C, aiming to better understand the proteome of this fungus, both intracellular and secreted. In order to identify these proteins, we used bioinformatic tools that are available online and allowed the prediction of protein sets that can be secreted by classical and non-classical routes. After the *in silico* prediction method, proteins were identified in the fungal extracts by the Ultraperformance Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry (UPLC-MS<sup>E</sup>) methodology. Those identified in the extracts that brought a more reliable interpretation corroborated the results *in silico*. The proteins identified stand out for being related to various biological processes, such as metabolism of carbon compounds, energy, proteins related to thermal and oxidative stress, defense, proteins related to the cell cycle, among other functions. The analyzes showed that the vast majority of identified proteins are secreted by alternative pathways, and the results point to the great importance of the biological roles that these secreted proteins can play during the onset of infection. Thus, we observed that the fungus presents variations in protein expression levels according to the condition addressed and may reflect on its behavior and responses to the successful establishment of the infection.

Key words: Chromoblastomycosis, proteome, secretoma, virulence.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Cromoblastomicose (CBM)

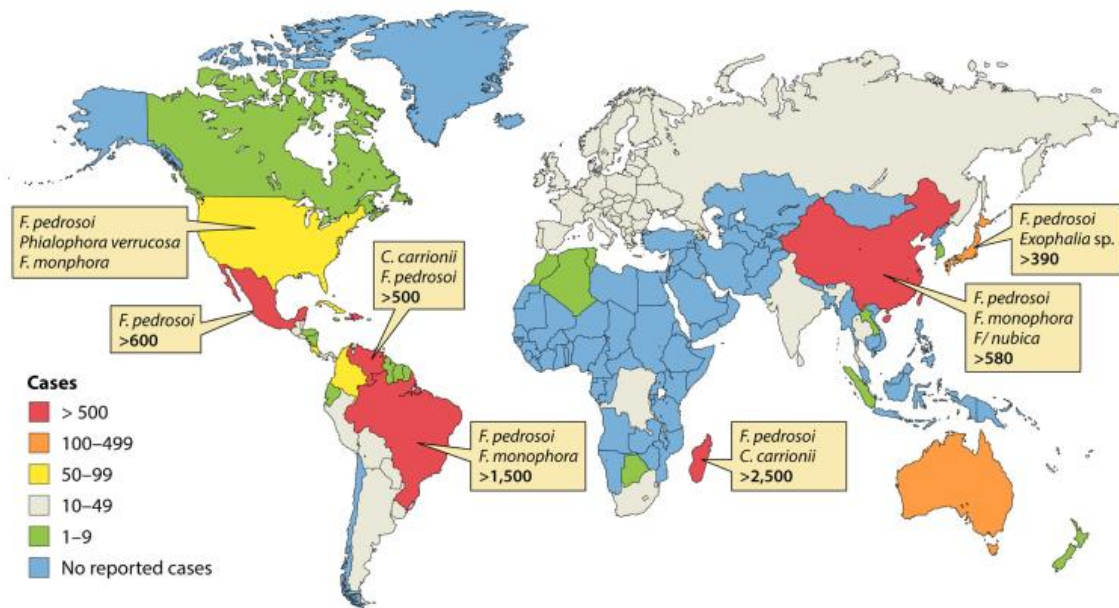
A cromoblastomicose (CBM) caracteriza-se por ser uma infecção micótica crônica de aspecto polimórfico, apresentando desenvolvimento lento, que acomete os tecidos cutâneo e subcutâneo. Esta patologia é provocada por uma grande diversidade de agentes fúngicos pigmentados ou dematiáceos como por exemplo, o próprio *Fonsecaea pedrosoi*, *Cladophialophora carrionii*, *Phialophora verrucosa*, *Rhinocladiella aquaspersa* e *Wangiella dermatitidis*. (MATTE *et al.*, 1997; BONIFAZ; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ; PERUSQUÍA-ORTIZ, 2010). É uma das patologias mais recorrentes na população rural ou em trabalhadores rurais, principalmente em homens, devido ao maior contato com solo ou vegetais e matéria orgânica em decomposição. A infecção se inicia por meio de fungos que são inoculados na pele através de algum tipo de lesão traumática quando estes trabalhadores estão manipulando material ou objetos contaminados com o fungo. A CBM apresenta uma variedade de nomes dependendo da região demográfica em que ocorre, sendo também denominada como cromomicose, doença de Fonseca, cladosporiose, formigueiro, doença de Pedroso, dermatite verrucosa, dermatite verrucosa cromoparasitária (ESTERRE; QUEIROZ-TELLES, 2006; SÁ *et al.*, 2007; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2009).

Alexandrino Pedroso descreveu, primeiramente, as características dessa doença em São Paulo, Brasil no ano 1911; porém os 6 primeiros casos da doença, denominada “figueira” até então, só foram descritos oficialmente em 1914 por Max Rudolph, um médico alemão que conseguiu pela primeira vez isolar e cultivar o fungo reproduzindo assim a patologia em modelo experimental. Entretanto, os aspectos histológicos da doença não foram descritos por ele, principalmente a presença dos corpos muriformes, que foram descritos por Lane e Medlar em 1915 (MCGINNIS, 1983; FUCHS; PECHER, 1992; QUEIROZ-TELLES, 2015). Assim o termo “cromoblastomicose” foi proposto pela primeira vez apenas em 1922 por um grupo de pesquisadores que definiram a patologia como uma dermatite verrucosa causada por fungos melanizados (TERRA *et al.*, 1922; MINOTTO *et al.*, 2001).

Os principais agentes etiológicos causadores desta patologia são os fungos pertencentes, principalmente, aos gêneros *Fonsecaea*, *Cladophialophora*, *Phialophora* e *Rhinocladiella* (TANG, 2001). Dentre estes fungos, os mais frequentes

no meio ambiente são as espécies *Fonsecaea pedrosoi* e *Cladophialophora carrionii* e as espécies menos frequentes são *Phialophora verrucosa*, *Rhinochrysiella aquaspersa* e *Wangiella dermatitidis*. Além destes, existem outros relatos mais recentes que *Exophiala jeanselmei* e *Exophiala spinifera* podem causar lesões de cromoblastomicose (ESTERRE; QUEIROZ-TELLES, 2006; VICENTE *et al.*, 2008). Adicionalmente, existem relatos que espécies como *F. monophora* e a recentemente descrita *F. nubica*, bem como outros fungos como *Aureobasidium pullulans*, *Chaetomium funicola* e *Catenulostroma chromoblastomycosun* podem estar associados a formação de lesões na cromoblastomicose (HOOG *et al.*, 2004; MOMIN *et al.*, 2008; NAJAFZADEH *et al.*, 2009).

A CBM é uma micose de dispersão global, mas ocorre predominantemente em zonas tropicais e subtropicais (**Figura 1**), estando presente em países como o Uruguai e na Argentina, bem como, em países como o México, Venezuela, África do Sul, Madagascar e Japão. O fungo *F. pedrosoi* é a espécie predominante e o principal agente etiológico causador dos casos de CBM nessas regiões (ESTERRE; QUEIROZ-TELLES, 2006; SANTOS *et al.*, 2007; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017). No Brasil existe uma grande variedade de casos relatados dessa doença, principalmente em regiões como a Amazônia que foi caracterizada como região endêmica após estudos relatarem 325 casos entre 1942-1997. E posteriormente mais de 500 casos foram descritos até o ano de 2015, porém esses dados são subestimados, pois essa patologia não é de notificação obrigatória (ESTERRE *et al.*, 1996; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2011; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017). Outras regiões do Brasil também são áreas endêmicas da CBM, como a região sul, tendo ocorrido no estado do Paraná entre 1985 e 1996, 71 casos relatados, além deste, também são consideradas áreas endêmicas os estados do Rio Grande do Sul, São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais (SILVA *et al.*, 1999).



**Figura 1: Distribuição geográfica mundial, demonstrando áreas endêmicas baseado em números de casos relatados.** Retirado de (QUEIROZ-TELLES et al., 2017).

Clinicamente as lesões apresentam aspecto polimorfo, caracterizado pela formação de nódulos, lesões papulosas eritemato-descamativas e pela forma clássica verrucosa, na qual nódulos e pápulas lentamente aumentam em número e volume e os mais antigos ulceram-se. (TOVAR et al., 2007). Por vezes, o interior dessas úlceras torna-se expostos, apresentando aparência papilomatosa, semelhante a couve-flor. As verrugas por sua vez podem ser planas e crostosas formando extensas placas que podem ulcerar. Normalmente como sintomas dessas lesões, o paciente relata a ocorrência de prurido e dor e o estado geral deste não é comprometido inicialmente, porém sem tratamento adequado pode-se perceber uma evidente debilitação do paciente (MARTÍNEZ; TOVAR, 2007).

As lesões localizam-se principalmente nos membros inferiores, na região dos pés e pernas, podendo se manifestar nas formas verrucosas, nodulares, tumorais, verrucosas com hiperqueratose ou em placas (**Figura 2**). Entretanto, também podem ocorrer nos membros superiores, face, orelha, pescoço, tórax, ombros e nádegas, apresentando graus de severidade da infecção, que pode ser classificada nas formas leve, moderada ou severa (**Figura 3**) (QUEIROZ-TELLES et al., 2009).

Indivíduos do sexo masculino são mais frequentemente acometidos provavelmente devido ao caráter comportamental da doença. Existem ainda outros fatores, como os hormonais ou genéticos que podem desempenhar papéis atuando

na adaptação fúngica ao tecido do hospedeiro durante a infecção apesar de ser conhecido que pessoas apresentando quadro de debilidade imunológica possam ser mais facilmente acometidas pela cromoblastomicose (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2009).



**Figura 2: Tipos clínicos de lesões observadas em pacientes com cromoblastomicose.** (A) Lesão inicial. (B) Lesão nodular. (C) Lesão tumoral. (D) Lesão cicatricial com borda verrucosa. (E) Lesão Hiperqueratósica verrucosa. (F) Lesão em placa violácea. Retirado de (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017).



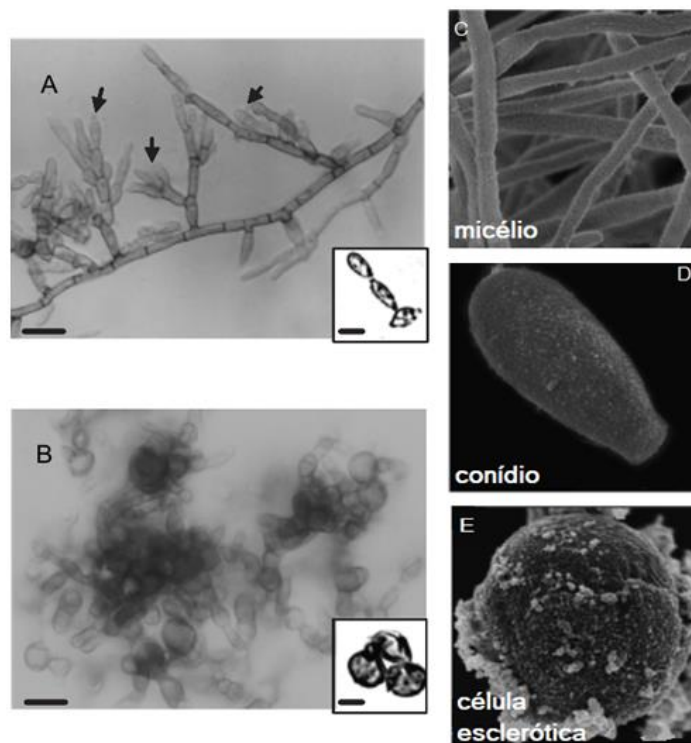
**Figura 3: Lesões de cromoblastomicose com diferentes graus de severidade:** (A) Formas leves. (B) Formas moderadas. (C) Formas severas. Retirado de (QUEIROZ-TELLES et al., 2017).

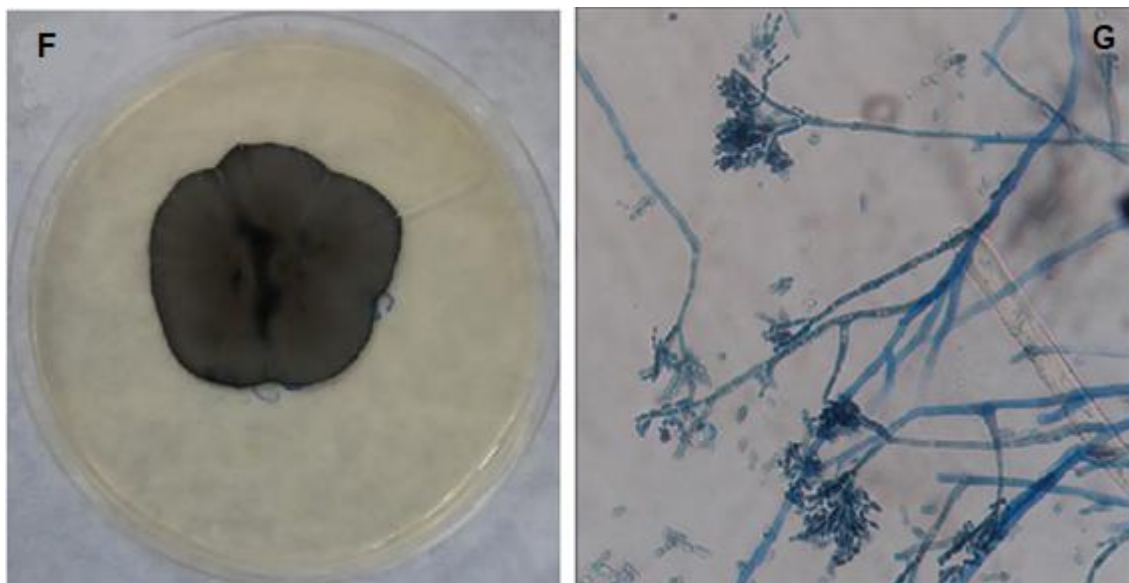
A CBM é uma doença recalcitrante e ainda não existe um tratamento eficiente para esta micose. Geralmente são utilizados antifúngicos clássicos (tiabendazol, anfotericina B e itraconazol), mas a eficácia é baixa. O índice de retorno das lesões é alto, fato este, parcialmente, explicado pelo alto índice de desistência por parte do paciente, pois o tratamento pode se prolongar por até 2 anos (QUEIROZTELLES et al., 2011). Várias outras opções terapêuticas são utilizadas, como: eletrocoagulação, mais recentemente crioterapia, remoção cirúrgica dos nódulos, afim de proporcionar melhores perspectivas de resposta ao tratamento. Devido a estes fatores a CBM demonstra-se como um sério caso de saúde pública, apresentando diversos casos oficialmente relatados e ainda milhares de outros não relatados que levam a incapacitação dos indivíduos acometidos por ela (LOPEZ MARTINEZ & MENDEZ TOVAR, 2007; QUEIROZTELLES et al., 2011).

## 1.2 *Fonsecaea pedrosoi*

O fungo patogênico humano *F. pedrosoi* é um valioso modelo para a biologia celular, sendo pertencente à classe *Eurotiomycetes*, da família *Herpotrichiellaceae* e a ordem *Chaetothyriales*. Seu ciclo de vida compreende diferentes estágios

morfológicos, apresentando estruturas características como as reprodutivas denominadas conídios (**Figura 4 A; 4 D**), o micélio (**Figura 4 A; 4 C**) mais comumente encontrado em ambiente saprofítico, e as células escleróticas ou corpos muriformes (**Figura 4 B; 4 E**) que são evidenciadas em tecidos infectados (LÓPEZ MARTÍNEZ; MÉNDEZ TOVAR, 2007; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017). Quando cultivado *in vitro* *F. pedrosoi* apresenta colônias com aspecto aveludado ou algodinoso, de cor esverdeada, amarronzada ou enegrecida (**Figura 4 F**). Microscopicamente, apresenta hifas septadas e conidióforo desenvolvido com presença de diversos conídios organizados de tal forma que se assemelham a uma flor (**Figura 4 G**) (SILVA *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2007).





**Figura 4: Morfologias de *Fonsecaea pedrosoi*.** (A) Microscopia óptica de micélio, incluindo a formação de conídios por conidióforos indicados pelas setas. (B) Microscopia óptica de células escleróticas de *F. pedrosoi*. (C) Microscopia eletrônica de varredura mostrando forma micelial. (D) MEV de conídio. (E) MEV de célula esclerótica. (F) Morfologia da colônia de *F. pedrosoi* cultivado em placa. (G) Montagem de Lactofenol azul de algodão (LPBC) mostrando hifas septadas e organização dos conídios no conidióforo (tipo Cladosporium) de *F. pedrosoi*. Adaptado de (SANTOS et al., 2007; NAYYAR, C., GULATI, N., & SHERWAL, B. L. 2016).

A melanina que é abundantemente presente na parede celular de fungos negros como *F. pedrosoi*, favorece a proteção física do fungo contra fatores ambientais, como a insolação, proporcionando foto-proteção, além de maior resistência mecânica devido a maior quantidade de melanina em sua parede celular, permitindo o desenvolvimento deste fungo em ambientes abertos e ensolarados, como por exemplo, no solo em áreas rurais. A melanina também pode atuar como fator de virulência para este fungo, oferecendo proteção contra as células imunes do hospedeiro, impedindo a lise e destruição do fungo após a fagocitose. Ocorrendo então o favorecimento da diferenciação fúngica em células escleróticas que formam propágulos no tecido epitelial do hospedeiro caracterizados por serem elementos esféricos ou ovoides, apesar de alguns ainda apresentarem filamentação, possuem característica coloração amarronzada. Esses corpos muriformes são bastantes resistentes aos ataques promovidos por células imunes efectoras como os

macrófagos, permitindo dessa forma o desenvolvimento da forma crônica da doença (ALVIANO *et al.*, 2009, CUNHA *et al.*, 2010). Os mecanismos moleculares relacionados com a virulência e patogênese de *F. pedrosoi* permanecem ainda obscuros. Entretanto, sabe-se que este fungo apresenta adesinas com capacidade de ligação a carboidratos dos tecidos/células do hospedeiro assim como a produção de aspartilpeptidases extracelulares que são consideradas também importantes fatores de virulência (RIBEIRO *et al.*, 2006; Palmeira *et al.*, 2008).

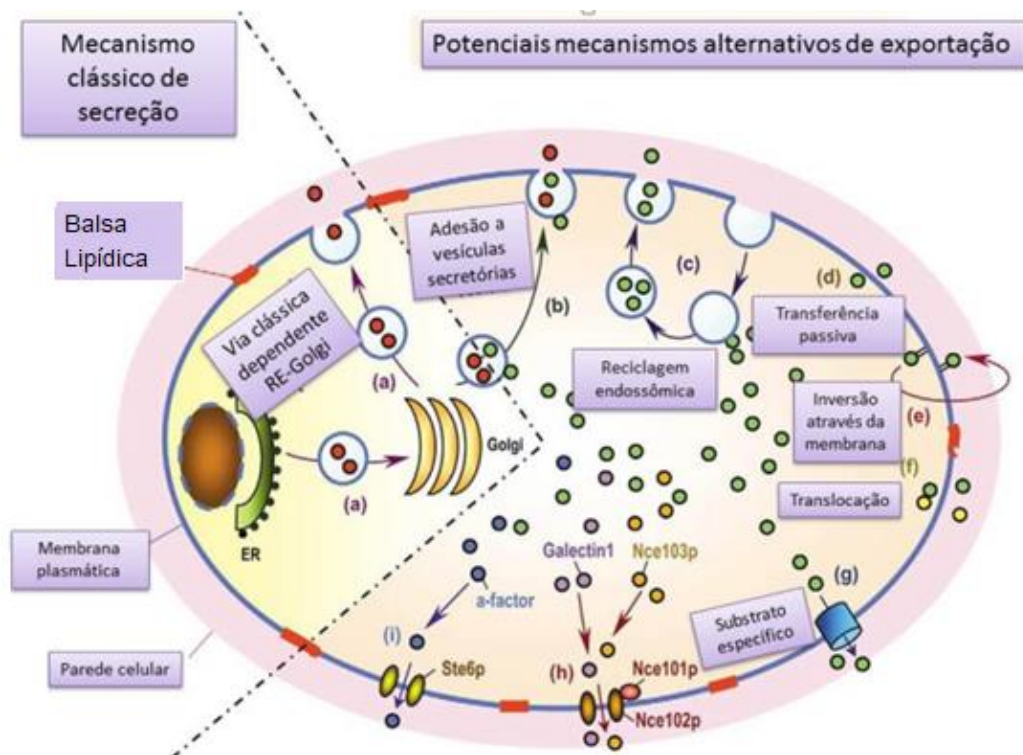
### 1.3 Rotas de secreção

A grande maioria das proteínas que são secretadas em eucariotos não são exportadas pela via do Retículo Endoplasmático/Golgi, guiadas por peptídeo sinal, mas por rotas alternativas ou ainda desconhecidas de secreção (BLOBEL; DOBBERSTEIN, 1975). Observando primeiramente as vias clássicas de secreção que apresentam moléculas com presença de sequências sinais que são extensões N-terminais das cadeias polipeptídicas nascentes que direcionam a proteína alvo para a membrana do retículo endoplasmático (RE) (VON HEIJNE, 1985). Em eucariotos sequências sinais orientam a inserção de proteínas na membrana do retículo endoplasmático e são normalmente clivadas pela peptidase de sinal (SPases) (PAETZEL *et al.*, 2002). Os peptídeos sinais resultantes são então rapidamente degradados, porém alguns ainda apresentam funções próprias (KAPP *et al.*, 2009).

As proteínas são removidas do retículo endoplasmático (RE) por meio de um processo de invaginação da membrana que em seguida proporciona o envolvimento dessas proteínas em vesículas membranosas transitórias. Essas vesículas são direcionadas para o complexo de Golgi. Estas, então, são direcionadas para a membrana plasmática onde se fundem a esta e descarregam o seu conteúdo para o exterior, processo este que é chamado exocitose (LODISH *et al.*, 2000).

Por outro lado, existem trabalhos que têm descrito a existência no meio extracelular, de diversas proteínas que não apresentam a sequência sinal e são funcionalmente ativas, sugerindo a existência de rotas de transporte não clássicas ou alternativas (CUERVO *et al.*, 2009; NICKEL; RABOUILLE, 2009; NOMBELA; GIL; CHAFFIN, 2006). Nombela (2006) descreveu rotas alternativas de secreção hipotéticas, tais quais: adesão de proteínas a vesículas endossomais, reciclagem

endossômica, transferência passiva através da membrana, inversão através da membrana, translocação, reconhecimento de um substrato específico, secreção de galectina mediada pelos genes *Nce101p* e *Nce102p*, e secreção do peptídeo a-feromona dirigido pelo transportador *Ste6p* (**Figura 6**). Nickel & Rabouille (2009) também descreveram que algumas proteínas contendo peptídeo sinal eram secretadas de forma não-convencional, sendo que, a saída do RE não envolvia a secreção por vesículas COPII ou não envolvia a passagem pelo aparelho de Golgi. Eles também descreveram quatro mecanismos alternativos de secreção de proteínas citoplasmáticas solúveis, um envolvendo a translocação direta através da membrana plasmática sem passar por Golgi, e outros três envolvendo intermediários vesiculares: uma via dependente de lisossomos, uma dependente de microvesículas e uma envolvendo a formação de vesículas internas em endossomos.



**Figura 5: Modelos clássicos e alternativos de secreção propostos em leveduras.** (a) Esquema do mecanismo clássico de secreção envolvendo o reconhecimento do peptídeo sinal e a exportação via RE-Golgi. (b-d) Mecanismos alternativos propostos: (b) Adesão de proteínas a vesículas endossomais, (c) Reciclagem endossômica, (d) Transferência passiva através da membrana. (e) Inversão através da membrana. (f) Translocação. (g) Reconhecimento de substrato

*específico. (h) Secreção de galectina mediada pelos genes Nce101p e substrato específico. (i) Secreção do peptídeo a-feromona dirigido pelo transportador Ste6p (NOMBELA; GIL; CHAFFIN, 2006, adaptada).*

#### **1.4 Secretoma**

O secretoma é caracterizado pelo conjunto total de proteínas secretadas, ou melhor, excretadas ou exportadas para o meio exterior da célula, representando cerca de 30% do proteoma de um organismo. Esta fração é constituída pelo conjunto de produtos de genes que são secretados por células e podem incluir uma enorme gama de diferentes classes de moléculas funcionais para a sobrevivência e/ou adaptação do organismo, dentre tais moléculas que estão presentes no secretoma, podemos citar como exemplo, as citocinas, quimiocinas, hormônios, anticorpos, enzimas digestivas, proteinases extracelulares, toxinas, entre outras (RANGANATHAN; GARG, 2009).

Algumas dessas moléculas podem estar envolvidas com uma diversidade de processos biológicos vitais, tais como migração celular, adesão celular, proliferação, comunicação celular, diferenciação, morfogênese, sobrevivência e defesa, respostas imunes e patogênese em bactérias e outros microrganismos (BONIN-DEBS; BOCHE; BRINKMANN, 2004). O termo secretoma foi primeiramente utilizado para descrever o repertório de proteínas que são processadas e lançadas via Retículo Endoplasmático (RE) - Complexo de Golgi (TJALSMA et al., 2000), mas é normalmente mais usado para denotar proteínas exportadas para regiões extracelulares, independente do mecanismo de exportação (GREENBAUM et al., 2001).

A secreção de proteínas em uma célula é um mecanismo altamente dinâmico, sua composição muda em resposta à estímulos externos (CACCIA et al., 2013) e tem a função de cumprir diversos papéis biológicos visando garantir sobrevivência e multiplicação do organismo nas diversas condições ambientais. Uma dessas funções é a digestão de potenciais substratos presentes no meio para obtenção de nutrientes, tais como carbono e nitrogênio e ainda vários micronutrientes essenciais, como o ferro, cobre, zinco, dentre outros. Devido então a essa gama de funções que estão envolvidas com os mais diversos papéis biológicos, muitas dessas proteínas podem ser de interesse em biotecnologia bem como para o estudo de virulência e

patogenicidade de agentes patogênicos (CARBERRY et al., 2006; FERNÁNDEZ-ACERO et al., 2007; YAJIMA; KAV, 2006).

Já em secretoma de fungos notamos duas categorias funcionais que podem ser caracterizadas: a primeira inclui atividades essenciais que permitem a célula fúngica se desenvolver como sapróbio; e a segunda, inclui qualquer sistema que permite que o organismo fúngico cresça às custas ou em associação com um hospedeiro vivo. Esses diferentes modos de vida dos fungos como saprófitas ou parasitárias, trazem a necessidade de caracterizar o secretoma desses organismos em relação a seu nicho para identificarmos mecanismos de sobrevivência, adaptação, patogenicidade e virulência que possam estar envolvidos com o secretomas (GIRARD et al., 2013). SANTOS (2006) mostrou que variações simples na composição do meio de cultura são capazes de induzir a secreção diferencial de peptidases em *Candida albicans*, e este fato ressalta a grande plasticidade do secretoma frente à exposição a condições diversas. Essa plasticidade é ainda mais importante quando se trata de condições que mimetizam a infecção. Nesse sentido, proteínas secretadas podem, direta ou indiretamente, estar envolvidas no diálogo molecular com o microambiente do hospedeiro, capacitando sua sobrevivência, multiplicação e disseminação (SILVA et al., 2012; GIRARD et al., 2013).

### **1.5 Secretoma de fungos patogênicos**

Com a finalidade de ter sucesso durante o estabelecimento da infecção, fungos patogênicos podem colonizar uma variedade de tecidos humanos devido as habilidades que desenvolveram para adaptar modificando sua expressão gênica, em resposta às mudanças no ambiente. Micro-organismos patogênicos se utilizam de proteínas secretadas não apenas para obtenção de nutrientes, como também contribui com mecanismos de virulência e assim obter uma maior taxa de sobrevivência nas condições hostis no hospedeiro. Diante disso, estudos nessa área vêm ganhando cada vez mais destaque e impacto (GIRARD et al., 2013).

Um estudo comparou o secretoma de *C. albicans* sob diferentes condições de temperatura, pH e na presença do indutor de desenvolvimento de hifas N-acetilglucosamina. Com a utilização desses parâmetros foi possível concluir a caracterização da secreção de proteínas sob condições ambientais adversas, identificando a composição do secretoma em cada condição, demonstrando que

este pode variar de acordo com as necessidades do organismo em determinado ambiente. Dentre essas condições foram identificadas 44 proteínas secretadas, sendo que 29 delas apresentaram uma função relacionada com a parede celular. Além disso, foi detectada uma isoforma da proteína de membrana plasmática Msb2 e ainda outras 6 proteínas preditas como associadas a compartimentos de vias secretoras (SORGO et al., 2010). Os resultados deste trabalho demonstram uma impressionante dinâmica do secretoma e evidenciam a grande capacidade do fungo de adaptar a composição do secretoma diante de condições adversas, provavelmente contribuindo para *C. albicans* lidar melhor com as diferentes condições que se encontram nos diversos ambientes e durante o processo de infecção que se apresenta como um ambiente altamente hostil para o patógeno (SORGO et al., 2010).

Posteriormente em outro trabalho foi caracterizado o proteoma extracelular e de vesículas citoplasmáticas de leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis*, isolado Pb18, sendo então comparadas as proteínas identificadas com ortólogos presentes em vesículas secretórias de outras espécies fúngicas (VALLEJO et al., 2012). Cerca de 85 proteínas foram identificadas exclusivamente nas frações vesiculares, 140 foram detectadas apenas em frações livres de vesícula, e 120 moléculas sobrepueram-se em ambas as frações. Cerca de 70% das proteínas foram preditas de serem secretadas, sendo que destas apenas 10% foram preditas de possuírem peptídeo sinal. Houve um enriquecimento das seguintes categorias funcionais: tradução e metabolismo de carboidratos, seguido por oxidação/redução, transporte, metabolismo de proteínas, resposta ao estresse e processos de sinalização. Algumas destas proteínas já foram descritas desempenhando funções durante a infecção, seja modulando a resposta imune ou promovendo a adesão a componentes da matriz, de forma a aumentar o sucesso do fungo durante a fase infecciosa.

Com o uso de uma abordagem proteômica em que foi associada a técnica de eletroforese bidimensional com espectrometria de massas (MALDI-Q-TOF MS / MS) Weber e colaboradores (2012) analisaram de forma comparativa o conjunto de proteínas extracelulares de células de levedura e micélio de *Paracoccidioides lutzii*. Neste estudo, 160 proteínas/isoformas foram identificadas, dentre essas 30 foram mais abundantes em micélio e 24 mais abundantes em levedura.

Albuquerque e colaboradores (2009) demonstraram que leveduras de *Histoplasma capsulatum* produzem vesículas heterogêneas e estas são secretadas. Grande parte destas vesículas foi composta de fosfolípídeos e proteínas associadas a resposta ao estresse, patogenicidade, virulência, vias de transdução de sinal, arquitetura da parede celular e metabolismo de aminoácidos. Foi demonstrado ainda, que algumas proteínas das vesículas, como por exemplo, histona 2B e a proteína de choque térmico Hsp60 reagiram com soro de pacientes com histoplasmose, sugerindo o envolvimento destas vesículas nas interações patógeno-hospedeiro.

Foi realizado também por outro grupo de pesquisa um estudo do proteoma extracelular de *H. capsulatum*, durante a fase patogênica do fungo, utilizando uma abordagem com o uso de um espectrômetro de massas LC-MS/MS para a definição das proteínas constituintes desse excretoma. Foram identificadas 33 proteínas que dentre elas estão relacionadas glicanases, proteínas relacionadas com a resposta ao estresse oxidativo, desidrogenases, chaperonas-like e ainda cinco novas proteínas, sendo esses achados comparados com extratos de micélios não patogênicos com o intuito de confirmar o envolvimento dessas proteínas com a fase patogênica do fungo (RAPPEYE et al., 2011).

Outro projeto desenvolvido na área realizou a análise do secretoma de *Aspergillus fumigatus* cultivado a 37° C em meio mínimo suplementado com diferentes fontes de carbono e nitrogênio para avaliar a secreção de proteínas durante a infecção no hospedeiro. Foram identificadas nesse estudo 64 proteínas diferentes, apresentando variados papéis no secretoma, tais como aquisição de nutrientes, glicólise, metabolismo de parede celular, sendo as mais abundantes as proteínas proteolíticas e as de defesa e resgate celular, assim sugerindo o envolvimento de algumas dessas proteínas com o aumento da virulência e patogenicidade do fungo durante a infecção e elucidando o papel da hemolisina, demonstrando a amplitude de variação que o secretoma de um fungo pode assumir de acordo com a condição encontrada (WARTENBERG et al., 2011).

## **1.6 Fatores de virulência em fungos negros**

A virulência e a patogenicidade de fungos são influenciadas por proteínas que auxiliam na interação com o hospedeiro, por permitir ao fungo aderir com maior

facilidade aos tecidos do hospedeiro, invadir novos compartimentos, evadir-se da resposta imune (MARCOS, 2011). Sendo assim a capacidade invasiva do fungo depende de mecanismos adaptativos que tem a função de resistir ao aumento da temperatura e ao ataque dos fagócitos (CAMARGO; FRANCO, 2000).

Já os fungos negros mostram adaptações a uma ampla gama de condições ambientais, tais como temperatura elevada, dessecação, elevadas concentrações de sal, variações no pH, deficiência de nutrientes e radiação UV. Adaptações essas que são proporcionadas por características específicas como a presença de parede celular melanizada, produção de polissacarídeos extracelulares (EPS) e formação de biofilmes (HOOG et al., 1993; GOSTINCAR, 2011).

Sendo assim a sobrevivência desses fungos no meio ambiente, bem como no ambiente hostil proporcionado pelo corpo do hospedeiro humano não se dá somente pela presença de melanina na parede celular, mas também pela ocorrência de lipídios, proteínas e polissacarídeos presentes na estrutura fúngica, bem como por fatores como a termotolerância (RIBEIRO *et al.*, 2006).

Normalmente as espécies que não são termotolerantes tendem a se desenvolver em ambientes saprofíticos sem apresentar capacidade infecciosa e são raras as infecções causadas por estes fungos em humanos (DE HOOG *et al.*, 2011). Sendo a termotolerância um importante fator de virulência nos fungos e leveduras negras (DE HOOG *et al.*, 2000). A tolerância à temperatura corpórea do ser humano é um requisito essencial para a patogenicidade, porém essa característica pode ter sido acidentalmente adquirida através de adaptação a habitats ambientais mais quentes, tais como superfícies em climas áridos e semiáridos (BADALI *et al.*, 2008).

Ainda outro aspecto abordando termotolerância a ser observado é a relação entre a temperatura máxima de desenvolvimento (DE HOOG *et al.*, 2011) e a capacidade de crescer a 37 °C, pois estes parecem ser fatores decisivos para a patogênese em fungos negros (STERFLINGER, 2006). Em vias gerais, clados que abrigam espécies capazes de crescer em temperaturas acima de 36-37 °C, como Clado bantiana, dermatitidis e jeanselmei, podem causar infecções sistêmicas ou disseminadas em humanos. Por outro lado, as espécies pertencentes a clados com desenvolvimento no máximo em torno de 36-37°C como Clado carrionii e europaea, são mais favoráveis de causarem infecções cutâneas, subcutâneas e superficiais (LI *et al.*, 2009; DE HOOG, *et al.*, 2011).

Em espécies que se disseminam por meio de veiculação hídrica, assim como as espécies do clado Salmonis, foi observada uma correlação entre a temperatura de crescimento do fungo com a temperatura do habitat natural do hospedeiro. Portanto a termotolerância contribuirá para determinar a escolha do hospedeiro: espécies fúngicas, com temperaturas máximas de crescimento de 27-33°C podem causar doenças em animais de sangue frio, enquanto fungos que crescem até 40°C pode causar infecções sistêmicas em mamíferos (DE HOOG *et al.*, 2011; VICENTE *et al.*, 2012; SEYEDMOUSAVI; GUILLOT; DE HOOG, 2013).

Adicionalmente os fungos e leveduras negras apresentam algumas exoenzimas, como as proteinases que atuam como importantes fatores de virulência desses microrganismos devido ao seu papel em degradar proteínas como colágeno, elastina e fibrinogênio, bem como algumas outras proteínas que desempenham funções imunológicas importantes, tais como imunoglobulinas e fatores do complemento, driblando assim alguns dos mecanismos de defesa do hospedeiro. Com a degradação destas proteínas podem ocorrer danos teciduais favorecendo a invasão e disseminação dos fungos nos tecidos do hospedeiro (Casadevall & Perfect 1998; Steenbergen & Casadevall 2003; Santagelo *et al.* 2004). FALTOU UMA REFERÊNCIA DE FUNGOS NEGROS!

Ainda há outras exoenzimas que atuam como fatores de virulência e podem ser produzidas por esses fungos, são as fosfolipases que desempenham papel na virulência fúngica por atuarem desestabilizando as células do hospedeiro por meio da hidrólise das ligações éster em glicerofosfolídeos, moléculas estas que estão presentes na bicamada lipídica da membrana plasmática, proporcionando assim a lise celular, criando lesões teciduais e favorecendo a penetração do patógeno nos tecidos do hospedeiro (Ghannoum *et al.*, 2000).

Outros estudos ainda descrevem mais alguns importantes fatores de virulência apresentados por fungos negros tais como, parede celular rígida que oferece proteção ao fungo dentro do hospedeiro. Assim como os diferentes componentes presentes em paredes celulares como melanina, quitina sintases e alguns conjuntos de enzimas hidrolíticas, como por exemplo, lipases, fostases, fosfolipases, estearases, peptidases, ecto-ATPases, gelatinases, DNases e ureases que atuam como fatores de virulência defendendo o fungo durante a resposta do

hospedeiro, bem como proporcionando também a aquisição de nutrientes (BUTLER *et al.*, 2005).

Outros fatores de virulência que podem ser relacionados são a formação de corpos muriformes por meio da diferenciação de hifas e conídios como forma de resistência as respostas imunológicas do hospedeiro (Silva CL, Ekizlerian SM, 1985; SALGADO, 2010).

Outro importante fator de virulência nos fungos e leveduras negras é a presença de melanina presente na parede celular das células vegetativas e reprodutivas (DIXON; POLAK-WISS, 1991). Melaninas podem ser produzidas por diversos tipos de organismos, desde bactérias até seres humanos podendo derivar de várias vias metabólicas, precursores, enzimas e intermediários distintos (JACOBSON, 2000). Muito embora as melaninas não sejam fatores cruciais para sobrevivência da célula fúngica, contribuem para o crescimento e desenvolvimento das espécies, bem como, podem auxiliar na proteção dos fungos contra as células do sistema imune do hospedeiro durante a infecção (BEEL, WHEELER; 1986; JACOBSON, 2000).

De modo geral, a presença de melanina confere resistência à célula fúngica contra as células efectoras do sistema imune, pois reduz a fagocitose, protege também contra derivados de oxigênio e nitrogênio, e ainda contra enzimas hidrolíticas, como quitinase e glucanase (JACOBSON, 2000; NOSANCHUK; CASADEVALL, 2003).

Em um estudo desenvolvido por Bocca *et al.* (2006) utilizando o fungo *F. pedrosoi*, a melanina inibiu a produção de óxido nítrico por macrófagos ativados, demonstrando que a melanização de células fúngicas é um importante fator de patogenicidade interferindo na resposta imune do hospedeiro. Em fungos, a biossíntese da melanina pode ocorrer a partir de vários precursores naturais, incluindo 1,8-dihidroxi-naftaleno (DHN), gama-glutaminil-4-hidroxibenzeno (GDHB), catecol, catecolaminas, tirosina e 3,4-dihydroxyphenylalanina (DOPA) (BLOIS, 1978; BEEL; WHEELER, 1986). A via DHN-melanina foi descrita como a mais frequentemente encontrada em ascomicetos e deuteromicetos, sendo o fator que caracteriza alguns fungos como sendo negros ou demáceos (KOG EJ, WHEELER, LANISNIK RIZNER *et al.*, 2004), sua produção está envolvida com a patogenicidade

de diversos fungos, principalmente aos pertencentes à ordem *Chaetothyriales* (FENG *et al.*, 2012).

A DHN melanina possui carga negativa, é hidrofóbica e apresenta peso molecular elevado surgindo através da polimerização oxidativa de compostos fenólicos ou precursores indólicos (SUN *et al.*, 2012). Para formação da melanina a partir do composto DHN, passos de dimerização e polimerização podem acontecer catalisados por fenoloxidasas, tais como a tirosinase e lacases, peroxidases, e talvez também catalases (BUTLER; DAY, 1998; EDENS *et al.*, 1999). Foi estudado também a influência de substratos orto e para-diphenoloxidase na formação deste pigmento em leveduras negras e os resultados sugeriram que o processo de melanização pode envolver mais enzimas e substratos do que aqueles até então conhecidos (YURLOVA *et al.*, 2008).

## 2 JUSTIFICATIVA

A cromoblastomicose (CBM) é uma patologia fúngica crônica humana, de progressão lenta, se desenvolve afetando o tecido cutâneo e subcutâneo, podendo ser causada por uma variedade de fungos dematiáceos. Entretanto, o principal agente etiológico causador dessa doença é o *F. pedrosoi* (McGinnis, 1983; De Hoog et al., 2000; Pires et al., 2012).

Essa patologia se caracteriza por estar relacionada diretamente com o tipo de ocupação, afetando usualmente indivíduos do sexo masculino que desenvolvem atividades rurais. Acomete normalmente os membros inferiores, que facilmente entram em contato direto com solo e ou vegetais em decomposição que podem estar contaminados com o fungo. A CBM é uma doença recalcitrante, que associada à sua epidemiologia, a baixa eficiência e ao longo tempo de tratamento (até dois anos) utilizando os métodos terapêuticos atuais apresenta-se, como um sério problema de saúde pública. Assim há necessidade do desenvolvimento de estudos pautados na análise e entendimento de seus patógenos, bem como nas relações parasito-hospedeiro que levam ao desenvolvimento das diversas formas clínicas da doença. Visando a apresentação de metodologias diagnósticas e terapêuticas mais eficientes (Lopez Martinez & Mendez Tovar, 2007; Queiroz-Telles et al., 2011).

*F. pedrosoi* apresenta uma enorme capacidade de se desenvolver em diversos ambientes, tornando-se então um excelente alvo para a proposição de estudos focados na melhor compreensão de seus mecanismos de virulência e patogenicidade, como por exemplo a expressão de melanina em sua parede celular ou a secreção de adesinas durante a infecção, além da identificação de proteínas e outras moléculas importantes para a obtenção de nutrientes e que proporcionam defesa em ambientes hostis, assim como os mecanismos de termotolerância, bem como o favorecimento da sobrevivência e do sucesso desse patógeno durante a infecção (Palmeira et al., 2008). Dessa maneira estudos sistemáticos que se utilizam de abordagens proteômicas demonstram grande importância para a identificação e caracterização do proteoma e secretoma desse fungo, possibilitando a elucidação de vias moleculares específicas que podem estar relacionadas com o sucesso da sobrevivência fúngica durante a infecção no hospedeiro (BOCCA et al., 2006; RIBEIRO et al., 2006).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivos gerais**

O presente trabalho tem por objetivos gerais caracterizar o exoproteoma e o proteoma celular de *F. pedrosoi* cultivado nas temperaturas de 22 e 36 °C.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Predizer o exoproteoma de *F. pedrosoi*;
- Identificar as proteínas celulares de *F. pedrosoi* reguladas por temperatura.
- Caracterizar o perfil proteômico das proteínas extracelulares de *F. pedrosoi* cultivado a 22 e 36 °C;

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Análises in silico

#### 4.1.1 Predição de proteínas extracelulares de *F. pedrosoi*

Com a obtenção do arquivo FASTA contendo o conjunto total de proteínas de *F. pedrosoi*, baixado pelo site do banco de dados Uniprot (<http://www.uniprot.org/proteomes/?query=fonsecaea+pedrosoi&sort=score>).

Procedeu-se a análise para predição da presença de peptídeo sinal, sendo utilizado para isso o software SignalP. Proteínas que apresentam sequência de peptídeo sinal são consideradas moléculas secretadas por via clássica, sendo que para essa predição foi adotado como ponto de corte o valor de 0,5 definido anteriormente em literatura, assim as sequências que apresentassem o valor maior ou igual a 0,5 eram preditas de apresentarem sequência de peptídeo sinal.

Para se determinar as proteínas preditas de serem secretadas por vias não clássicas ou alternativas foi utilizado o software denominado SecretomeP 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP>), sendo adotando um ponto de corte maior ou igual a 0,6 como cutoff. Ambos os softwares utilizam redes neurais e modelos de cadeia de markov para realizar as predições, sendo preditas então a presença de peptídeo sinal pelo primeiro software e o modelo de via de secreção no segundo.

Foram realizadas ainda análises conjuntamente às anteriores, análises essas de predição de potenciais adesinas e presença de âncoras gpi (Glicosil Fosfatidil Inositol) utilizando os softwares TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) e o GPI-SOM (<http://gpi.unibe.ch/>). Estas ferramentas analisam as sequências proteicas em formato FASTA, sendo que a ferramenta TMHMM produz uma série de informações sobre a sequência analisada, que para a predição de hélice transmembrana é levada em consideração o ponto de corte maior ou igual a 18, já a ferramenta GPI-SOM organiza as proteínas em uma tabela dividindo-as em zonas coloridas de acordo com a maior probabilidade de apresentarem âncoras gpi. Foram mantidas as análises utilizando os dois softwares para excluir o maior número possível de proteínas que poderiam estar de alguma forma (por alça transmembrana ou âncora gpi) ligadas a membrana plasmática do fungo.

## **4.2 Cultivo de *F. pedrosoi***

O isolado clínico de *F. pedrosoi* (CBS 271.37) foi utilizado em todas as etapas e experimentos deste trabalho. Este isolado foi mantido à 22°C em meio sólido Ágar-batata (BDA) e repicado a cada 15 dias. Para obtenção de extratos proteicos extracelulares, esporos do fungo foram inoculados em caldo batata e incubados a 22 °C ou 36 °C sob agitação por 10 dias. Posteriormente, a massa celular foi coletada por centrifugação (1200 x g por 15 min) e transferida para meio fresco líquido. A cultura foi incubada nas temperaturas específicas sob agitação por 72 h.

## **4.3 Obtenção dos extratos proteicos**

### **4.3.1 Extratos extracelulares**

Após incubação, as células foram removidas por centrifugação à 1200 x g por 15 min. O sobrenadante de cultura obtido foi sequencialmente filtrado em membranas de nitrocelulose com poros de 0,45 µm e 0,22 µm (WEBER et al., 2012). Os filtrados de cultura foram liofilizados e ressuspensos em 5 mL de tampão tris-HCl 50 mM pH 8,0 (da Fonseca et al., 2001). Em seguida, a mostra foi concentrada e lavada com tampão tris-HCl 50 mM pH 8,0, utilizando filtros com membranas de 10 kDa (Amicon - Millipore, Bedford, MA, USA). A concentração dos extratos proteicos foi obtida pelo método de Bradford, usando uma curva padrão de albumina de soro bovino (BSA) (BRADFORD, 1976).

### **4.3.2 Extratos Intracelulares**

Após a centrifugação a 4.000 g por 30 min e remoção do sobrenadante, as células fúngicas foram congeladas utilizando nitrogênio líquido e rompidas por maceração mecânica utilizando-se gral e pistilo. Posteriormente o macerado foi transferido para microtubos de 2 mL contendo beads de vidro, sendo então adicionado aos tubos contendo o macerado e as beads 1 mL de tampão de lise Tris-Cálcio pH 8,0 [1 mL de Tris HCl 2 M pH 8,8; 0,5 mL de CaCl<sub>2</sub> 1 M; 100 mL água destilada q.s.p.]. Em seguida as amostras foram submetidas a 5 ciclos de 30 segundos em agitador mecânico (Beadbeater – Biospec Product Inc.). Posteriormente, o lisado foi centrifugado a 14.000 g por 15 min a 4°C, para a remoção dos resíduos celulares, sendo este passo repetido de 10 vezes.

Com o intuito de avaliar a qualidade dos extratos proteicos, volumes referentes à 15 µg de proteína foram misturadas com tampão de amostra [Tris-HCl 0.2 M pH 6,8, SDS 40% (v/v), β-mercaptoetanol 20 % (v/v), glicerol 20 % (v/v) e de azul de bromofenol], aquecidas à 100 °C por 10 min e submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 12 %. Os géis dos extratos citoplasmáticos foram corados com Azul de Coomassie (*PlusOne Coomassie Tablets PhastGel Blue R-350, GE Healthcare*) e descorados em solução de metanol 5 % (v/v) e ácido acético 10 % (v/v), já os extratos de sobrenadante (secretados) foram corados usando método de nitrato de prata e descorados utilizando solução de metanol 5% (v/v) e ácido acético 10% (v/v).

#### **4.4 Digestão trípica das amostras**

Extratos proteicos dos sobrenadantes de cultura e das células do fungo de cada condição (150 µg) foram submetidos a digestão trípica. Inicialmente, adicionou-se as amostras o surfactante RapiGest SFTM 0,2 % (v/v) (*Waters Corporation, Milford, MA*). A mistura foi incubada a 80 °C por 15 min. Posteriormente, as proteínas foram reduzidas com 2,5 µL de DTT 100 mM (*Dithiotreitol, GE Healthcare*) a 60 °C por 30 min. A alquilação foi realizada pela adição de 2,5µL de iodoacetamida 300 mM (*GE Healthcare*) à temperatura ambiente de bancada por 30 min ao abrigo da luz. A digestão foi iniciada a partir da adição de 40 µL de tripsina 50 ng/µL (*Promega, Madison, WI, USA*) à 37 °C por 16hs. Ao final adicionou-se 40 µL de ácido trifluoracético (TFA) (*Sigma-Aldrich*) 5% (v/v). As amostras foram submetidas 14.000 rpm por 30 min a 4°C, o sobrenadante foi transferido para tubos novos e secados à vácuo. Os peptídeos foram ressuspensos em formiato de amônio (20 mM) acrescido com o padrão interno de 200 fmol de fosforilase B de coelho (PHB) (*MassPREPTM Digestion Standard*).

#### 4.5 Identificação proteica por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (Nano-UPLC-MS<sup>E</sup>)

Os peptídeos digeridos foram separados por cromatografia líquida de ultra desempenho utilizando o sistema *nanoACQUITY*<sup>TM</sup> (Waters Corporation, Manchester, Reino Unido). O sistema possui duas colunas de fase reversa em *tandem* em que são usadas as concentrações graduais crescentes (11.4%, 14.7%, 17.4%, 20.7% e 50%) de acetonitrila (ACN) (*Sigma-Aldrich*) para liberação dos peptídeos. Os espectros de massas foram obtidos utilizando o espectrômetro de massas modelo *Synapt G1 HDMS*<sup>TM</sup> (Waters, Manchester, UK), utilizando nanoeletrospray como fonte de ionização e dois analisadores - quadrupolo e tempo de voo (*nanoESI-QTOF*, Waters). [*Glu1*]-Fibrinopeptídeo B (GFB) foi utilizado como padrão externo para calibração de massa, sendo mensurado a cada 30 segundos. Quantidades iguais de peptídeos gerados foram fracionados em 5 partes e três réplicas experimentais foram obtidas para cada amostra (BAILÃO ET AL., 2014; LIMA ET AL., 2014; MURAD; RECH, 2012)

Os dados de espectrometria de massas obtidos através de UPLC-MS foram processados e examinados utilizando o ProteinLynx Global Server (PLGS) versão 3.0.2 (Waters Corporation, Manchester, UK) e banco de dados de *F. pedrosoi*. Estabelecendo a taxa de repetição de identificação mínima de 2 fragmentos iônicos por peptídeo e de 5 fragmentos para cada proteína, sendo levado em conta a identificação ao menos de um peptídeo por proteína em cada replicata. Também foram consideradas na busca no banco de dados as modificações: carbamidometilação de resíduos de cisteína, oxidação da metionina e fosforilação de serina, treonina e tirosina. Uma clivagem perdida foi permitida como parâmetro de identificação.

#### 4.6 Análises in silico das proteínas identificadas por NanoUPLC-MS<sup>E</sup>

Após a identificação das proteínas por espectrometria de massas, foi realizada a comparação dessas sequencias proteicas, com bancos de dados de proteínas afim de buscar similaridades de sequências e domínios conservados, por meio da ferramenta BLASTP (*Basic Local Alignment Search Tool*) esta encontrada no site do banco de dados NCBI - National Center for Biotechnology Information (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ou no banco de dados UNIPROT (<http://www.uniprot.org/blast/>). As proteínas que antes eram classificadas como hipotéticas conservadas foram devidamente classificadas de acordo com sua função, utilizando-se para isso o banco de dados MIPS - *Functional Catalogue Database* (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/funecatDB/>) e ainda quando possível, adicionalmente foram classificadas de acordo com sua classe enzimática utilizando-se o banco de dados de enzimas Kegg - *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* ([http://www.genome.jp/dbget-bin/www\\_bfind\\_sub?mode=bfind&max\\_hit=1000&dbkey=enzyme&keywords=](http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bfind_sub?mode=bfind&max_hit=1000&dbkey=enzyme&keywords=)).

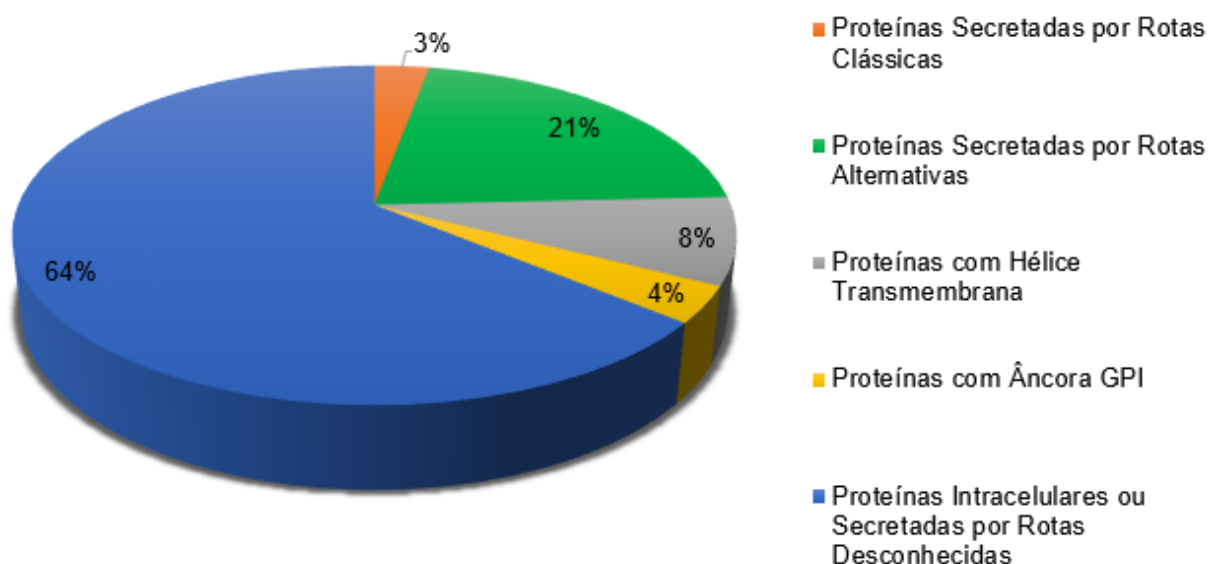
## 5 RESULTADOS e DISCUSSÃO

### 5.1.1 Análises preditivas *in silico*

Com a obtenção do arquivo em formato FASTA do conjunto total de proteínas de *F. pedrosoi* a partir do banco de dados Uniprot como descrito anteriormente. Foram realizadas as análises por softwares preditivos também descritos na metodologia, estas análises foram então iniciadas pelo software SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) que realizou a predição da presença ou ausência da sequência sinal ou também chamada de peptídeo sinal na porção N-terminal das proteínas a partir da utilização de um ponto de corte de 0,5. Sendo que o fungo apresenta um conjunto total de 12.527 proteínas que são expressas, desse conjunto total, 701 foram preditas de apresentarem peptídeo sinal de secreção, e dessas proteínas que foram preditas de apresentarem sequência de peptídeo sinal 132 foram preditas de apresentarem hélice transmembrana, bem como, desse conjunto de 701 sequências, 206 foram preditas de apresentarem âncora gpi. Portanto, dessas 701 sequências, restarão então 363 proteínas que são preditas de serem secretadas para o meio externo por meio de vias clássicas (**Figura 7**).

O total de 11.826 proteínas que não apresentaram peptídeo sinal foram submetidas a análise pelo software SecretomeP 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP>) que identifica proteínas exportadas por rotas alternativas. Esta análise identificou que 3.808 proteínas são secretadas por meio de rotas alternativas. Assim afim de definir com maior exatidão quais proteínas são secretadas por rotas alternativas para o meio exterior da célula, foram utilizados softwares com a finalidade de separar as proteínas que se ligam a parede ou a membrana plasmática. Esse conjunto de 3.808 proteínas foi então submetido a análise pelos softwares TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) para predição de alças transmembrana e ao software GPI-SOM (<http://gpi.unibe.ch/>) que prediz a presença de âncoras GPI. Desse conjunto, 907 proteínas foram preditas de apresentarem hélice transmembrana e 227 de apresentarem âncora de gpi. Portanto, restaram 2.674 proteínas que são preditas de serem potencialmente secretadas para o meio exterior da célula por rotas alternativas (**Figura 7**). Ainda do total inicial de proteínas restou um conjunto de 8.018 proteínas que foram preditas serem ausentes de peptídeo sinal, bem como, também não foram preditas de serem secretadas para o meio

exterior por rotas alternativas, sendo que essas 8.018 proteínas foram consideradas neste estudo proteínas intracelulares, ressalvando-se que ainda dentre estas proteínas consideradas intracelulares podem existir proteínas secretadas por rotas desconhecidas que não foram identificadas nessas análises (**Figura 7**).



**Figura 6: Porcentagem de proteínas secretadas em cada via, proteínas intracelulares e proteínas que possuem alça transmembrana ou âncora gpi.**

A maioria das 2.674 proteínas preditas de serem secretadas ainda não apresentam função descrita em literatura sendo até então classificadas como proteínas preditas hipotéticas. Portanto essas proteínas foram submetidas a análise pela ferramenta BLASTP (*Basic Local Alignment Search Tool*), para buscarmos similaridades em sequências proteicas homologas as de outros organismos de forma que possamos prever funções a essas proteínas, a partir desse conjunto, 258 proteínas foram preditas de apresentarem funções de acordo com sequências homologas já anotadas de outros organismos (**Tabela 1**).

**Tabela 1: Proteínas potencialmente secretadas por *F. pedrosoi* identificadas por análises *in silico*.**

Número de Acesso1	Nome da Proteína2	Categoria MIPS4
<b>Metabolismo</b>		
A0A0D2ENA6	carboxi muconolactona descarboxilase	Metabolismo de amino ácidos
A0A0D2GTF7	carboxi muconolactona descarboxilase	Metabolismo de amino ácidos
A0A0D2F685	carboxil peptidase D	Metabolismo de amino ácidos
A0A0D2DMC2	carboxil peptidase S	Metabolismo de amino ácidos
A0A0D2E607	Aromatic amino acid aminotransferase	Metabolismo de amino ácidos
A0A0D2H3I4	aromatic-L-amino-acid decarboxylase	Metabolismo de amino ácidos
A0A0D2FD01	5'/3'-nucleosidase SurE	Metabolismo de amino ácidos
A0A0D2G2I1	Agmatina deimanase	Metabolismo de amino ácidos
A0A0D2GKA9	carboxipeptidase D	metabolismo de amino ácidos
A0A0D2E222	glutamato carboxipeptidase II	metabolismo de amino ácidos
A0A0D2HKX3	serina peptidase	metabolismo de amino ácidos
A0A0D2GFK9	Putativa purina nucleosideo permease,	metabolismo de amino ácidos
A0A0D2HJ75	Carboxil estearase tipe B	metabolismo de amino ácidos
A0A0D2GVR6	putativa metalo-carboxipeptidase	metabolismo de amino ácidos
A0A0D2ELE7	carboxipeptidase D	metabolismo de amino ácidos
A0A0D2GQ22	estearase	metabolismo de ácidos graxos
A0A0D2ELS4	3-oxoacil-redutase	Metabolismo de ácidos graxos
A0A0D2H3B7	3-oxoacil-redutase	Metabolismo de ácidos graxos
A0A0D2H0H3	3-oxoacil-redutase	Metabolismo de ácidos graxos
A0A0D2F681	3-oxoacil-redutase	Metabolismo de ácidos graxos
A0A0D2GC43	3-oxoacil-redutase	Metabolismo de ácidos graxos
A0A0D2F5X2	Lipase	Metabolismo de ácidos graxos
A0A0D2GIL4	esterase / lipase	Metabolismo de ácidos graxos
A0A0D2H9B6	lipase putativa ATG15	Metabolismo de ácidos graxos
A0A0D2HEN2	Lipase secretada	Metabolismo de ácidos graxos

A0A0D2E151	lipase / esterase putativa	Metabolismo de ácidos graxos
A0A0D2DEE2	lipase 2	Metabolismo de ácidos graxos
A0A0D2F6V4	Proteína da família GDSL lipase / acil-hidrolase	Metabolismo de ácidos graxos
A0A0D2DWF6	glicosidase putativa	Metabolismo de compostos C-3
A0A0D2GKB8	gluconolactonase	Metabolismo de compostos C-3
A0A0D2H133	epimerase de açúcar-nucleosídeo-difosfato	Metabolismo de compostos C-3
A0A0D2HIB7	amidase putativa	Metabolismo de compostos C-3
A0A0D2GQ32	aspergillopepsina I	Metabolismo de compostos C-3
A0A0D2EQJ0	oxirredutase	Metabolismo de compostos C-3
A0A0D2EXK4	Cis-aconitato decarboxilase	Metabolismo de compostos C-3
A0A0D2G0G0	Carboximuconolactona decarboxil+D170:D196ase	Metabolismo de compostos C-3
A0A0D2G2L5	2,4-diclorofenol 6-mono oxigenase	Metabolismo de compostos C-3
A0A0D2F8Z2	2,6-dihidroxipiridina 3-mono oxigenase	Metabolismo de compostos C-3
A0A0D2GST7	2-amino-3-carboximuconato-6-semi aldeido decarboxilase	Metabolismo de compostos C-3
A0A0D2HDW3	2-dehidropantoato 2-redutase	Metabolismo de compostos C-3
A0A0D2GV78	3-hidroxibenzoato 6-hidroxilase	Metabolismo de compostos C-3
A0A177FJ89	3-hidroxibenzoato 6-hidroxilase	Metabolismo de compostos C-3
A0A0D2ENC0	4-aminobutirato aminotransferase	Metabolismo de compostos C-3
A0A0D2HIA1	4-coumarato--CoA ligase	Metabolismo de compostos C-3
A0A0D2H7N1	4-oxalocrotonato tautomerase	Metabolismo de compostos C-3
A0A0D2GVD1	5'-hidroxiaverantina desidrogenase	Metabolismo de compostos C-3
A0A177EZY5	5-ceto-4-deoxi-D-glucarato aldolase	Metabolismo de compostos C-3
A0A0D2FG76	Acetomidase	Metabolismo de compostos C-3
A0A0D2H293	12-oxifitodienoato 3	Metabolismo de compostos C-3
A0A0D2GY76	palmitoil-tioestearase	Metabolismo de compostos C-3
A0A0D2GT17	fenil-acetato 2-hidroxilase	Metabolismo de compostos C-3
A0A0D2GN54	putativa glicosidase	Metabolismo de compostos C-3
A0A0D2GRF5	putativa lipoxigenase	Metabolismo de compostos C-3
A0A0D2E0T2	putativa tanase	Metabolismo de compostos C-3

A0A0D2GVV3	putativa triacilglicerol lipase	Metabolismo de compostos C-3
A0A0D2HLQ4	alfa-glucosidase	Metabolismo de compostos C-3
A0A0D2HA85	alfa-glucosidase	Metabolismo de compostos C-3
A0A0D2DR85	Aril-sulfatase	Metabolismo de compostos C-3
A0A0D2GBD1	bifenil-2,3-diol 1,2-dioxigenase	Metabolismo de compostos C-3
A0A0D2HFG2	endo-1,3(4)-beta-glucanase	Metabolismo de carboidratos e compostos de C
A0A0D2H709	endo-1,3(4)-beta-glucanase	Metabolismo de carboidratos e compostos de C
A0A0D2HG49	Proteína contendo domínio de ligação a peptidoglicano	Metabolismo de carboidratos e compostos de C
A0A0D2F4V8	L-asparaginase	Metabolismo de carboidratos e compostos de C
A0A0D2EUR8	beta-N-acetil-hexoaminidase	Metabolismo de carboidratos e compostos de C
A0A0D2GL30	Endo-1,6-beta-D-glucanase BGN16.3	Metabolismo de carboidratos e compostos de C
A0A0D2DAH3	Proteína putativa de biossíntese de beta-1,6-glucano	Metabolismo de carboidratos e compostos de C
A0A0D2H3T9	beta-glucanorossidase	Metabolismo de carboidratos e compostos de C
A0A0D2DP57	B-(1-6) glucano sintase	Metabolismo de carboidratos e compostos de C
A0A0D2DHG1	aspartil/glutamil-tRNA(Asn/Gln) amidotransferase, subunidade C	Metabolismo de carboidratos e compostos de C
A0A0D2GSD1	Super família da proteína beta-lactamase	Metabolismo de carboidratos e compostos de C
A0A0D2DKP9	Proteína putativa exo-beta- -glucanase	Metabolismo de carboidratos e compostos de C
A0A0D2EVK9	alfa-galactosidase	Metabolismo de carboidratos e compostos de C
A0A0D2EK32	glucano-lactase	Metabolismo de carboidratos e compostos de C
A0A0D2EX02	Laccase-2	Metabolismo de carboidratos e compostos de C
A0A0D2EUI4	Lacase-2	Metabolismo de carboidratos e compostos de C
A0A0D2FFE0	amidase	Metabolismo de amido

A0A177EQP2	amidase, hidantoinase/carbamoilase	Metabolismo de amido
A0A0D2GD43	aspartato aminotransferase	Metabolismo de aspartato
A0A0D2DAM2	2,3- acido dihidroxibenzoico descarboxilase	metabolismo de aromáticos
A0A0D2E6G3	fosfatase ácida	metabolismo de fosfato
A0A0D2GPD5	Fosfoproteína fosfatase	metabolismo de fosfato
A0A0D2GUR1	agmatinase	Metabolismo de arginina e prolina
A0A0D2GMN7	3-fitase B	Metabolismo de inositol fosfato
A0A0D2GGK7	3-fitase	Metabolismo de inositol fosfato
A0A0D2F3M9	tirosinase	Metabolismo de melaninas
A0A0D2DKF7	3-fitase	Metabolismo de inositol fosfato
A0A0D2F3I7	3-fitase A	Metabolismo de inositol fosfato
<b>ENERGIA</b>		
A0A0D2H0I0	alfa,alfa-trealose-fosfato sintetase (formação de UDP)	Geração de energia
A0A0D2DIK9	ATP sintase F1, subunidade delta	Geração de energia
A0A0D2H198	ATP sintase mitocondrial F1 Fator do complexo 2	Geração de energia
A0A0D2G8D3	ATPase	Geração de energia
A0A0D2F0Q8	Proteína ligante de ATP	Geração de energia
A0A0D2GR60	ATP-dependente Clp endopeptidase, subunidade proteolitica	Geração de energia
A0A0D2GB18	ATP-dependent RNA helicase sub2	Geração de energia
A0A0D2DEP7	carbamoil-fosfato sinthase arginina-especifica cadeia curta	Geração de energia
A0A0D2GVU9	malato desidrogenase	Via de TCA e glioxilato
A0A0D2H651	acetil-CoA hidrolase	via da acetil-CoA
A0A0D2GQ75	Proteína Acetil-CoA sintase	via da acetil-CoA
A0A0D2GCG3	acetil-coenzima A sintase	via da acetil-CoA
A0A0D2G8W5	acetiltransferase	via da acetil-CoA
A0A0D2GGA6	acetiltransferase SidF	via da acetil-CoA
A0A0D2GPE2	acil-CoA desirogenase	via da acetil-CoA
A0A177ES21	acil-CoA desirogenase	via da acetil-CoA
A0A178D9K1	acil-CoA desirogenase	via da acetil-CoA
A0A0D2GZ14	acil-CoA N-aciltransferase	via da acetil-CoA
A0A0D2EYV8	acil-CoA oxidase	via da acetil-CoA
A0A0D2FEL5	acil-CoA tioestearase II	via da acetil-CoA
A0A177F4H0	alfa-metilacil-CoA	via da acetil-CoA
A0A177F786	acil-CoA tioesterase II	Via da Acetil-CoA
A0A0D2GWC1	2,3-diceto-5-metiltio-1-fosfopentano fosfatase	Via das pentoses-fosfato
A0A0D2GDF1	Aminoglicosideo fosfotransferase	Sistema de fosfotransferase
A0A0D2F8K4	CMGC/CDK/CDK8 proteina quinase	proteína quinase

A0A178DDQ5	CMGC/SRPK proteína quinase	proteína quinase
A0A0D2H029	15-hidroxiprostaglandina desidrogenase	Complexo piruvato desidrogenase
A0A0D2GQ14	3-hidroxiisobutirato desidrogenase	Complexo piruvato desidrogenase
A0A0D2GIJ2	colina desidrogenase	Complexo piruvato desidrogenase
A0A0D2GU69	colina-fosfato citidil-transferase	Complexo piruvato desidrogenase
<b>TRANSPORTE E GERENCIAMENTO ENERGÉTICO</b>		
A0A0D2E8X1	calmodulina	Ligante de cálcio
A0A0D2HP63	trocador de cálcio / próton	Transporte
A0A0D2H9U4	potássio: antiportas de hidrogênio	Transporte
<b>TRANSCRIÇÃO</b>		
A0A0D2DQV3	bZIP fator de transcrição	Fator de Iniciação da transcrição
A0A177EV07	bZIP fator de transcrição	Fator de Iniciação da transcrição
A0A178CAH7	dominio de proteína dedo C2H2	Fator de Iniciação da transcrição
A0A0D2DCE8	dominio de proteína dedo C2H2	Fator de Iniciação da transcrição
A0A0D2GD49	C2H2 dominio de proteína tipo dedo de zinco	Fator de Iniciação da transcrição
A0A0D2GWQ8	C6 fator de transcrição	Fator de Iniciação da transcrição
A0A0D2ESL1	C6 fator de transcrição	Fator de Iniciação da transcrição
A0A0D2GZG3	C6 dominio de proteína dedo de zinco	Fator de Iniciação da transcrição
A0A0D2EMQ3	CCR4-NOT subunidade de complexo de transcrição 7	Fator de Iniciação da transcrição
<b>CICLO CELULAR E PROCESSAMENTO DE DNA E RNA</b>		
A0A0D2GPU3	complexo de proteína regulatória de citoesqueleto de actina end3	Ciclo celular
A0A0D2GGR8	complexo de proteína actina, subunidade 3	Ciclo celular
A0A0D2GUF8	proteína de controle do ciclo celular cwf14	ciclo celular mitótico e controle do ciclo celular
A0A0D2H481	proteína de diferenciação celular rcd1	ciclo celular mitótico e controle do ciclo celular
A0A0D2E2U0	proteína de controle celular 18	ciclo celular mitótico e controle do ciclo celular
A0A0D2H6F0	proteína de controle de divisão celular 42	ciclo celular mitótico e controle do ciclo celular
A0A0D2G8G2	proteína ligante de ácido nucleico	ciclo celular mitótico e controle do ciclo celular
A0A0D2GZE2	proteína relacionada a actina 3	Ciclo celular
A0A0D2DM86	Proteína de autofagia-like 12	proteína de processamento
A0A0D2GPE5	CHL4 familia de proteínas de segregação de cromossomo	Restrição ou modificação de DNA
A0A0D2DT71	proteína de modificação de cromatina	Restrição ou modificação de

	EAF6	DNA
A0A0D2FHH1	complexo de remodelamento de cromatina subunidade ies6	Restrição ou modificação de DNA
A0A0D2H3S8	proteína de fidelidade de transmissão cromossômica 4	Restrição ou modificação de DNA
A0A0D2GJ67	proteína 2-nitropropano dioxigenase	Degradação de proteína extracelular
A0A0D2GMU2	proteína da família 3' exoribonuclease	Degradação de RNA
A0A178CB72	componente 2-oxoisovalerato desidrogenase E1 , subunidade alfa	Degradação de proteína extracelular
A0A0D2EWY9	proteína contendo domínio de ligação Hsp90	Resposta a choque térmico
A0A0D2FHQ7	proteína regulada meioticamente	Ciclo celular
A0A0D2DHS4	subunidade complexa promotora de anáfase Apc5	Ciclo celular
A0A0D2GGA1	Proteína do gene 157 regulada de forma meiótica	Ciclo celular
A0A0D2E5E4	Nuclease S1	Degradação de RNA
A0A0D2HN51	Nuclease S1	Degradação de RNA
A0A0D2GZC8	Nuclease PA3	Degradação de RNA
<b>SÍNTESE E PROCESSAMENTO PROTEICO</b>		
A0A0D2H2I0	proteína ribossomal 30S	Proteína Ribossomal
A0A0D2GT70	37S proteína ribossomal S9, mitocondrial	Proteína Ribossomal
A0A0D2GQC7	40S proteína ribossomal S18	Proteína Ribossomal
A0A0D2DBZ0	40S proteína ribossomal S19	Proteína Ribossomal
A0A0D2GRP5	40S proteína ribossomal S20	Proteína Ribossomal
A0A0D2GKY6	40S proteína ribossomal S22	Proteína Ribossomal
A0A0D2GAQ8	40S proteína ribossomal S7	Proteína Ribossomal
A0A0D2EIU8	54S proteína ribossomal L3, mitocondrial	Proteína Ribossomal
A0A0D2GX43	60S proteína ribossomal L10a	Proteína Ribossomal
A0A0D2GSP2	60S proteína ribossomal L17	Proteína Ribossomal
A0A0D2EKT2	60S proteína ribossomal L20-B	Proteína Ribossomal
A0A0D2EWM9	60S proteína ribossomal L21-A	Proteína Ribossomal
A0A0D2DB14	60S proteína ribossomal L27a	Proteína Ribossomal
A0A0D2FFV1	60S proteína ribossomal L29	Proteína Ribossomal
A0A0D2DCQ7	60S proteína ribossomal L2-B	Proteína Ribossomal
A0A0D2GYM1	60S proteína ribossomal L44	Proteína Ribossomal
A0A0D2GJ99	18S rRNA proteína de biogenesi RCL1	Biogenese Ribossomal
A0A0D2HEX2	20S proteassoma subunidade beta 7	Complexo de montagem proteica
A0A0D2EQB5	26S protease subunidade regulatoria 6B	Complexo de montagem proteica
A0A0D2GT65	26S proteassoma subunidade regulatoria rpn11	Complexo de montagem proteica
A0A0D2GQN2	26S proteassoma subunidade regulatoria rpn12	Complexo de montagem proteica
<b>PROCESSAMENTO DE BIOMELÉCULAS</b>		

A0A0D2GN15	dominio de proteina alfa beta hidrolase	Alongamento de ácidos graxos
A0A0D2G0E1	dominio contendo Alfa beta hidrolase 3	Alongamento de ácidos graxos
A0A0D2GBU0	alfa / beta-hidrolase	Alongamento de ácidos graxos
A0A0D2EMJ2	familia alfa/beta hidrolase	Alongamento de ácidos graxos
A0A178C832	alfa/beta hidrolase	Alongamento de ácidos graxos
A0A0D2DML5	alfa/beta hidrolase	Alongamento de ácidos graxos
A0A0D2F1P5	alfa/beta hidrolase	Alongamento de ácidos graxos
<b>NÃO CLASSIFICADAS</b>		
A0A0D2GP74	Alfa amilase, proteina contendo dominio catalitico	-
A0A0D2DMU1	dioxigenase dependente de Alfa-cetoglutarato alkB 6	-
A0A0D2GR26	taurina dioxigenase dependente de Alfa-cetoglutarato	-
A0A0D2GTI6	familia de proteina BET3	-
A0A0D2F354	bromodominio associado dominio de proteina	-
A0A0D2H259	BTB/POZ contendo dominio de proteina	-
A0A0D2G8H8	BTB/POZ contendo dominio de proteina	-
A0A0D2GKI6	familia ligante de carboidrato	-
A0A0D2DAX8	dominio contendo proteina CBS	-
A0A0D2GZC9	Proteína 25 contendo domínio espiralado	-
A0A0D2G7J0	sintetase de alanil-tRNA	-
A0A0D2DV72	aminotransferase, classes I e II	-
A0A0D2GXD4	repetição de anquirina contendo proteína	-
A0A0D2HP89	repetição de anquirina contendo proteína	-
A0A0D2DKE2	Proteína quinase atípica / ABC1	-
A0A0D2GSY6	aubergina	-
A0A0D2GF75	proteína secretada associada à biotrofia 2	-
A0A0D2DIC3	Proteína de ligação ao DNA associada ao bromodominio	-
A0A0D2GRL8	Proteínas contendo domínio BTB / POZ	-
A0A0D2HCU2	Domínio de ligação de FAD contendo proteína	-
A0A0D2F7D6	Regulador de permease de nitrogênio 3	-
A0A0D2GG65	Proteína do domínio PHP	-
A0A0D2F0J6	proteína de desenvolvimento sexual	-
A0A0D2EJX0	Esferulina-1A	-
A0A0D2G4Y2	Proteína contendo domínio WSC	-
A0A0D2HDR2	Endopiofosfatase	-

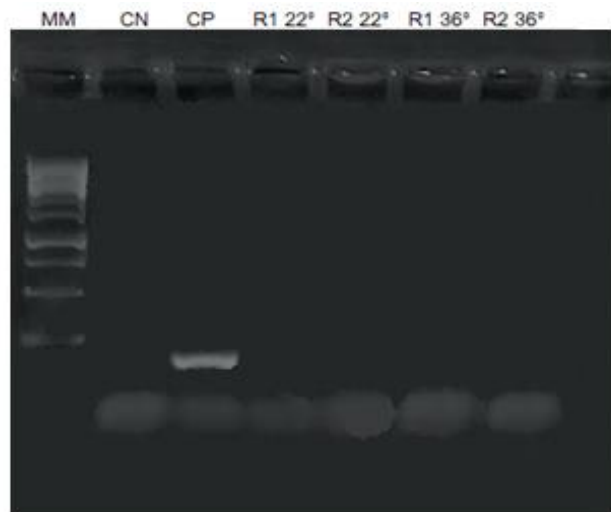
A0A0D2E3H3	gama-glutamyltransferase	-
A0A0D2FBD3	domínio dissulfeto-isomerase de proteínas	-
A0A0D2GGI1	monooxigenase	-
A0A0D2ET79	Proteína contendo domínio DnaJ	-
A0A0D2GBU6	Proteína contendo domínio SET parcial	-
A0A0D2GHM5	família arf / Sar, outros	-
A0A0D2GNL9	proteína de triagem de proteína vacuolar 62	-
A0A0D2H5Q6	espidroina-2-like	-
A0A0D2H7L2	família da glicosil hidrolase 10	-
A0A0D2GJB8	proteína semelhante à biossíntese de fenazina	-
A0A0D2GNH7	agmatinase	-
A0A0D2G625	amidofosforibosiltransferase	-
A0A0D2G9C8	proteína de montagem de ferro-enxofre 1	-
A0A0D2GY27	arilsulfatase	-
A0A0D2EUB4	transglicosilase de mureína	-
A0A0D2GTC2	Proteína de ligação a FK506 2	-
A0A0D2EKJ1	Proteína contendo o domínio de ligação à celulose fúngica	-
A0A0D2GKE3	hidroxiureosporino sintase (CrtC)	-
A0A0D2GVT8	endo-arabinase	-
A0A0D2FHC6	proteína putativa associada à triagem de proteína vacuolar TDA6	-
A0A0D2FAM8	Ferroxidoreductase Fet3	-
A0A0D2GZZ3	oxalato descarboxilase	-
A0A0D2GJK9	Proteína contendo domínio de ligação ao zinco citidina e desoxicitidilato desaminase	-
A0A0D2EPS9	alfa-1,3-manosiltransferase CMT1	-
A0A0D2EMN8	Proteína contendo o domínio de ligação FAD	-
A0A0D2HF96	IRE proteína quinase	-
A0A0D2EJG9	Proteína de ligação a fosfatidiletanolamina	-
A0A0D2HGU9	Proteína contendo um domínio proteico rico em glicina	-
A0A0D2DDU9	Domínio WSC contendo proteína	-
A0A0D2HMI8	Proteína contendo domínio semelhante à tiorredoxina	-
A0A0D2EZC7	Proteína comum contendo o domínio central	-
A0A0D2HN24	dipeptidase putativa	-
A0A0D2EJT3	Ligação de quitina Proteína contendo o domínio da Peritrofina-A	-
A0A0D2GZR1	Tripeptidil-peptidase sed2	-
A0A0D2FCI9	esfingomielina fosfodiesterase	-
A0A0D2H3G4	proteína da família amidase putativa	-
A0A0D2DWD9	Proteína contendo o domínio SET	-

- 1 Número de informação geral no banco de dados Uniprot
- 2 Anotação de nome da proteína
- 3 Nome de categoria funcional de acordo com o MIPS Functional Catalogue

### 5.1.2 Obtenção dos extratos proteicos extracelulares

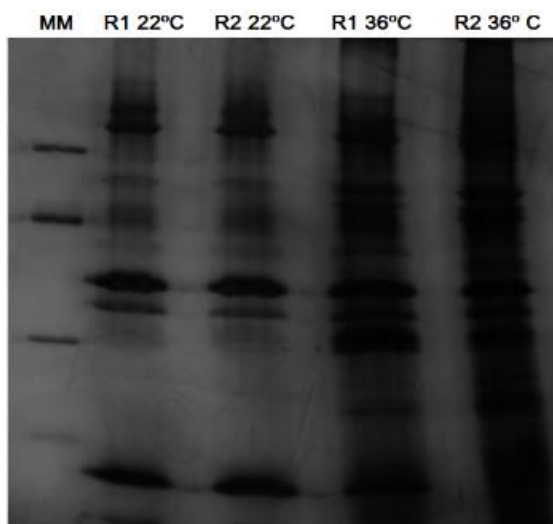
Para obtenção dos extratos proteicos extracelulares, foram realizados testes utilizando o meio Batata Dextrose, nesses testes o fungo foi incubado durante diferentes tempos. Os tempos de incubação testados foram de 24, 36, 48 e 72 horas, afim de determinarmos qual o tempo de incubação ótimo para obtermos sobrenadantes com a maior quantidade de proteínas extracelulares dissolvidas. Sendo então todos os sobrenadantes testados utilizando géis SDS-PAGE, foi definido que o melhor tempo de incubação que apresentava o resultado com maior quantidade de proteínas dissolvidas era o tempo de 72 horas (**Figura 9**).

Após o cultivo do fungo em meio líquido Batata Dextrose por 15 dias, foi realizada a troca do meio por 72 h para obtenção dos extratos de proteínas secretadas do isolado *CBS 271.37*. Para que fosse garantida a validade do método de extração que foi utilizado para obtenção da amostra para estudos de secretoma, faz-se necessário que a obtenção de extratos ocorra com a ausência de proteínas intracelulares provenientes de lise celular. Objetivando isto, o processo de extração das proteínas secretadas foi conduzido embasado conforme descrito previamente por Weber (2012) porém com a utilização de adaptações necessárias de acordo com o modelo fúngico com que trabalhamos. Foram descritos previamente a realização de experimentos de validação do método de extração partindo da premissa de que os extratos estariam livres da presença de DNA oriundo de lise celular, indicando que as células fúngicas estariam integras levando a crer então que os extratos extracelulares estavam livres de contaminação por proteínas intracelulares. Sendo assim foi realizada a técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), utilizando os extratos secretados em cada condição. Oligonucleotídeos para o gene da proteína estrutural tubulina (WEBER et al., 2012) foram utilizados nos ensaios de detecção de DNA (**Figura 8**). A presença de DNA genômico nos sobrenadantes de cultura não foi identificada, indicando que a ausência de contaminação dos extratos secretados com proteínas intracelulares demonstrando a integridade celular do fungo, validando então o método de extração.

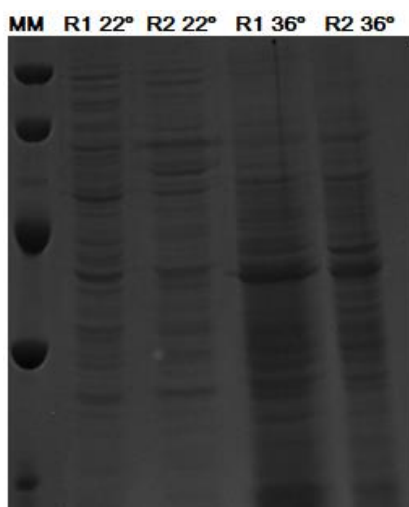


**Figura 7: Detecção de DNA celular em extratos extracelulares de *F. pedrosoi* por PCR. Gel de PCR para validação do método de extração de proteínas intracelulares.** CN indica o poço em que estão controle negativo. CP está indicando o poço do controle positivo. R1 22° e R2 22° indicam os poços em que estão os extratos produzidos a 22° C. R1 36° e R2 36° estão indicando os poços em que estão os extratos produzidos a 36° C. O padrão de massa molecular é indicado a esquerda do gel.

Com o objetivo de avaliar a qualidade dos extratos obtidos, bem como visualizar e comparar os perfis proteicos entre as condições estudadas, as amostras foram submetidas a eletroforese unidimensional SDS-PAGE (**Figura 9**). Após os extratos proteicos extracelulares do isolado *CBS 271.37* serem submetidos à eletroforese unidimensional (SDS-PAGE), estes foram corados utilizando metodologia de coloração por nitrato de prata. Da mesma forma os extratos proteicos intracelulares foram avaliados por meio de eletroforese em gel SDS-PAGE, entretanto foram corados utilizando metodologia de coloração por corante azul de Comassie, demonstrando perfis proteicos limpos e com bandas bem definidas que aparecem conservadas nos diferentes tipos de condições de temperatura avaliadas, além de apresentarem também bandas que são únicas em cada condição estudada (**Figura 10**).



**Figura 8: Perfil eletroforético dos extratos extracelulares de *F. pedrosoi*.** Nas linhas indicadas por R1 22° C e R2 22° C estão os perfis das replicatas dos extratos proteicos secretados obtidos de CBS 271.37 à temperatura de 22° C. Já nas filas indicadas por R1 36° C e R2 36° C estão os perfis das replicatas dos extratos proteicos secretados obtidos de CBS 271.37 à temperatura de 36° C utilizando 1D-PAGE [12 % (p/v) de SDS-PAGE] corado por nitrato de prata. O padrão de massa molecular é indicado a esquerda do gel.



**Figura 9: Proteínas detectadas no proteoma intracelular de *Fonsecaea pedrosoi*, por análise em gel SDS-PAGE.** As filas indicadas por R1 22° C e R2 22° C estão os perfis das replicatas dos extratos proteicos secretados obtidos de CBS 271.37 à temperatura de 22° C. Já nas filas indicadas por R1 36° C e R2 36° C estão os perfis das replicatas dos extratos proteicos secretados obtidos de CBS 271.37 à temperatura de 36° C utilizando 1D-PAGE [12 % (p/v) de SDS-PAGE] corado por corante azul de Comassie. O padrão de massa molecular é indicado a esquerda do gel.

### 5.1.3 Análises por NanoUPLC-MS<sup>E</sup>

Os extratos proteicos secretados do isolado *CBS 271.37* foram submetidos à Cromatografia Líquida de Ultrapformance acoplada à Espectrometria de Massas (UPLC-MS<sup>E</sup>). Foram identificadas 43 proteínas entre as amostras dos extratos de secretoma testadas. Destas 23 e 6 foram preferencialmente expressas a 22° C (**Tabela 2**). Por outro lado, 20 proteínas foram mais secretadas exclusivamente na condição de 36° C e 2 preferencialmente secretadas na mesma condição referida (**Tabela 3**). Nos extratos intracelulares foram identificadas 107 proteínas dentre as condições testadas. Dessas, 62 proteínas foram induzidas na condição de 36° C 45 proteínas/isoformas foram reprimidas na condição de 36° C e foram induzidas na condição de 22° C (**Tabela 5**).

Com a utilização de ferramentas de bioinformática foi possível realizar a predição de proteínas que podem ser secretadas por vias clássicas e vias alternativas de forma a possibilitar a comparação mais completa dos dados experimentais com os obtidos *in silico*. Após realizada a predição *in silico* das proteínas secretadas, pode-se comparar as proteínas preditas com as identificadas por espectrometria, demonstrando uma interessante correlação em que foram preditas algumas proteínas de maneira bastante similar com as identificadas em espectrometria, corroborando assim os resultados. Por outro lado, entretanto, a maioria das proteínas que foram preditas de serem secretadas, foram classificadas como proteínas hipotéticas conservadas, demonstrando assim a necessidade de se realizar mais estudos proteômicos utilizando esse modelo. ESTA PARTE DEVE SER CONSIDERAVELMENTE REDUZIDA E VOCÊ DEVE MOSTRAR OS NÚMEROS. QUANTAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NO SECRETOMA QUEU FORAM ENCONTRADAS NAS PREDITAS?

### 5.1.4 Análise das Proteínas extracelulares identificadas

Neste estudo foram identificadas 43 proteínas nos extratos extracelulares, sendo que desse total 17 e 18 foram exclusivamente expressas nas condições de 22° C e 36 °C respectivamente e 6 e 2 foram preferencialmente expressas nas condições de 22° C e 36 °C respectivamente. As proteínas identificadas neste estudo estão relacionadas a diversas funções biológicas como, metabolismo, processos energéticos, síntese proteica, defesa celular, secreção e captação de ferro, corroborando com achados anteriores diversos outros micro-organismos (GIL-

BONA et al., 2015; HOLBROOK et al., 2011; VALLEJO et al., 2012; WEBER et al., 2012).

As análises realizadas por softwares para este trabalho identificaram proteínas que são homologas de proteínas de choque térmico já descritas bem como também identificou algumas proteínas homologas de proteínas responsivas ao estresse oxidativo (catalase-peroxidase e Fe-Mn family superoxide dismutase) sugerindo que seu aparecimento no secretoma pode estar relacionado diretamente com a patogenicidade, devido a atuação dessas moléculas na proteção de organismos durante fases ou em ambientes de estresse oxidativo proporcionando ou facilitando a metabolização de radicais livres (HWANG et al., 2002; WYSONG et al., 1998). Devido ao ambiente de estresse oxidativo encontrado no hospedeiro, os fungos que apresentam mecanismos de resposta a agentes oxidantes apresentam uma maior capacidade de patogenicidade e disseminação, sendo mais efetivos durante a infecção (SAIJO et al., 2010).

Foram identificadas ainda diversas proteínas relacionadas ao metabolismo de carbono e produção de energia, tais como proteínas da via glicolítica e do ciclo do ácido tricarboxílico, que quando secretadas podem apresentar diferentes funções atuando talvez como proteínas moonlighting. Essas proteínas além de desempenharem seus papéis clássicos, no meio intracelular, atuando em vias de produção de energia e metabolismo de cadeias carbônicas, assim interagindo em vias energéticas importantes, porém se secretadas podem também desempenhar alguma função no meio extracelular (NOGUEIRA et al., 2010).

Foram identificadas ainda proteínas preferencialmente expressas nas duas condições de temperatura avaliadas, sendo algumas dessas proteínas foram anotadas como proteínas hipotéticas conservadas, pois não foram identificadas outras sequências proteicas homologas a elas utilizando Blastp nesse estudo. Em 22° C foram identificadas as proteínas glucano-1,3-beta-glicosidase e a glicosídeo hidrolase que podem estar relacionadas com metabolismo de compostos para formação de parede e degradação de glicosídeos respectivamente, sendo que em condições ambientais tais processos estão relacionados com papéis de estruturação fúngica, com a defesa celular e a aquisição de nutrientes, por outro lado durante a fase de infecção esses compostos podem estar envolvidos mais especificamente

com a defesa celular e ainda com a patogenicidade do fungo (LENARDON *et al.*, 2007). Já a 36° C foi identificada a proteína preferencialmente expressa 1,3-beta-glucanosiltransferase que também está relacionada com o metabolismo de compostos da parede celular, podendo atuar em conjunto com outras moléculas para intensificar a virulência e patogenicidade fúngica, sugerindo sua contribuição em proporcionar a diferenciação de hifas e conídios em células escleróticas, assim contribuindo para a virulência, considerando com isso o aumento da espessura da parede celular, bem como a formação de células muriformes resistentes as respostas imunológicas do hospedeiro, principalmente ao ataque de células fagocitárias, levando ao estabelecimento da infecção (KARUPPAYIL *et al.*, 1996; LENARDON *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2004; NIMRICHTER *et al.*, 2004; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017; SILVA; EKIZLERIAN, 1985; SUZUKI; TAKEDA, 1977).

#### **5.1.5 Análise das Proteínas intracelulares identificadas**

Nos extratos de proteínas intracelulares foram identificadas 107 proteínas/isoformas, sendo que desse conjunto 62 proteínas foram preferencialmente expressas à 36 °C indicando que estavam sendo induzidas nessa condição, por outro lado as outras 45 proteínas não foram expressas, indicando que essas proteínas poderiam estar sendo reprimidas nessa mesma condição de temperatura. Essas proteínas intracelulares também estão relacionadas com diversas funções biológicas importantes, tais como metabolismo, processos energéticos, síntese proteica, defesa celular, processamento de DNA e ciclo Celular, tendo sido visto previamente na literatura, demonstradas em outros fungos (GILBONA *et al.*, 2015; TESEI *et al.*, 2015; HOLBROOK *et al.*, 2011; VALLEJO *et al.*, 2012; WEBER *et al.*, 2012).

Grande parte dessas proteínas intracelulares identificadas na condição de 36° C, podem estar relacionadas com processos metabólicos e energéticos, evidenciando a ativação de vias importantes como a glicólise ou a gliconeogênese como principais produtoras de fontes de carbono, sendo que essa habilidade reflete em um importante papel metabólico na patogenicidade, principalmente durante a fase de infecção onde no hospedeiro o patógeno encontra um ambiente com escassez de nutrientes (ROUMELIOTI *et al.*, 2010).

Também foram identificadas proteínas de choque térmico, que apresentam um papel protetor para a célula, durante a adaptação ao ambiente na fase de infecção, o que promove a sobrevivência do fungo durante as interações patógeno-hospedeiro (TAMAYO et al., 2013). Bem como proteínas relacionadas com a defesa contra espécies oxidativas, levando a crer que essas proteínas podem estar relacionadas com a via que atua na proteção da célula contra espécies reativas de oxigênio (ROS) em fungos durante o estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), levando a regulação da produção das taxas NADPH que se devem ao consumo de NADPH pelos mecanismos de defesa que são mais ativos durante o estresse oxidativo encontrado pelo patógeno na fase de infecção e as enzimas envolvidas nesse mecanismo são mais eficazes em um ambiente reduzido o que é promovido pelas altas taxas de NADPH (GROSSKLAUS et al., 2013).

Ainda algumas outras proteínas que foram identificadas, podem estar provavelmente relacionadas a virulência possivelmente em frações vesiculares, tais como as enzimas relacionadas com a síntese da parede, urease, lacase, protease ácida, proteínas de choque térmico, antioxidantes e outras proteínas, tais como, superóxido dismutase e tioredoxina (ALBUQUERQUE et al., 2008).

**Tabela 2: Proteínas extracelulares preferencialmente expressas à 22° C.**

N°. de Acesso <sup>1</sup>	Nome da Proteína <sup>2</sup>	Categoria MIPS <sup>3</sup>	Fold Change <sup>4</sup>
A0A0D2GDP9	ribonuclease T2	ciclo de monofosfato de ribulose	-
A0A0D2HC52	desidrogenase de álcool arílico	Metabolismo dos compostos C e carboidratos	-
A0A0D2HLN7	carboxipeptidase D	metabolismo de aminoácidos	-
A0A0D2GDZ9	superfamília MA peptidase	metabolismo de aminoácidos	-
A0A0D2DC03	proteína quinase serina / treonina	metabolismo de aminoácidos	-
A0A0D2GX98	glucano 1,3-beta-glucosidase	Metabolismo dos compostos C e carboidratos	0,4
A0A0D2GKL2	hidrolase de glicosídeo	metabolismo de glicosídeos	0,8
A0A0D2F317	proteína fosfoglycerate mutase-like	glicólise e gliconeogênese	-
A0A0D2GZZ3	oxalato descarboxilase	metabolismo de derivados de	-

intermediários da via de TCA e glioxilato			
A0A0D2GS90	Epimerase dependente de NAD / desidratase	transporte de elétrons e conservação de energia associada à membrana	-
A0A0D2GS90	Epimerase dependente de NAD / desidratase	transporte de elétrons e conservação de energia associada à membrana	-
A0A0D2G8H5	Subunidade reguladora de proteassoma 26S N3	montagem de complexos proteicos	-
A0A0D2HN04	Proteína hipotética conservada	-	-
A0A0D2H3D8	Proteína hipotética conservada	-	-
A0A0D2GTA8	Proteína contendo domínio DUF1713	-	-
A0A0D2GT85	Proteína hipotética conservada	-	0,4
A0A0D2GU62	Proteína hipotética conservada	-	0,4
A0A0D2FA27	Proteína de parede celular ancorada à GPI	-	-
A0A0D2D9N4	Proteína hipotética conservada	-	0,9
A0A0D2H1K2	Proteína hipotética conservada	-	-
A0A0D2GGE5	proteína de repetição de tetratricopeptídeo	transporte de peptídeos	-
A0A0D2H5B2	Tetratricopeptide-like helical	transporte de peptídeos	-
A0A0D2GHM2	heme peroxidase	reação de peroxidase	-

1 Número de informação geral no banco de dados Uniprot

2 Anotação de nome da proteína

3 Nome de categoria funcional de acordo com o MIPS Functional Catalogue

4 Número representando o valor de expressão da proteína

**Tabela 3: Proteínas secretadas exclusivamente a 36° C e secretadas preferencialmente à 36° C.**

<b>Nº. de Acesso<sup>1</sup></b>	<b>Nome da Proteína<sup>2</sup></b>	<b>Categoria MIPS<sup>3</sup></b>	<b>Fold Change<sup>4</sup></b>
<b>A0A0D2DZQ6</b>	S-formilglutaciona hidrolase	reação de conjugação da glutaciona	-
<b>A0A0D2HDB3</b>	catalase-peroxidase	reação de peroxidase	-
<b>A0A0D2DW00</b>	proteína 17 da família da hidrolase do glicosídeo	metabolismo de glicosídeos	-
<b>A0A0D2GY51</b>	Família de Fe-Mn superóxido dismutase	metabolismo de superóxido	-
<b>A0A0D2EYT5</b>	nucleosídeo difosfato quinase	Metabolismo nucleotídeo / nucleosídeo / nucleobase	-
<b>A0A0D2GQK8</b>	1,3-beta-glicosiltransferase gel4	metabolismo peptidoglicano	2,6
<b>A0A0D2F1F6</b>	enolase	glicólise e gliconeogênese	-
<b>A0A0D2GHM4</b>	6-fosfogluconato desidrogenase, descarboxilante	via de fosfato de pentose	-
<b>A0A0D2FEY5</b>	isomerase de glicose-6-fosfato	glicólise e gliconeogênese	-
<b>A0A0D2DXF0</b>	delta-1-pirrolina-5-carboxilato desidrogenase mitocondrial	oxidação de ácidos graxos	-
<b>A0A0D2H9W2</b>	degradação do éter terc-butílico etílico	metabolismo isoprenóide	-
<b>A0A0D2GU51</b>	proteína semelhante à hsp10	resposta ao choque térmico	-
<b>A0A0D2GX43</b>	Proteína ribossômica 60S L10a	proteínas ribossômicas	-
<b>A0A0D2HMB9</b>	Proteína ribossômica 60S L35	proteínas ribossômicas	-
<b>A0A0D2GVF2</b>	Proteína ribossômica ácida 60S P1	proteínas ribossômicas	-
<b>A0A0D2GQC7</b>	Proteína ribossômica 40S S18	proteínas ribossômicas	-
<b>A0A0D2E6X5</b>	dipeptidil-peptidase III	Sistema de secreção de proteínas do tipo III	-
<b>A0A0D2GUI8</b>	Proteína da família ThiJ / Pfpl	-	-
<b>A0A0D2EW52</b>	Proteína hipotética conservada	-	1,06
<b>A0A0D2GJI8</b>	Enzima conversora de endotelina	-	-

1 Número de informação geral no banco de dados Uniprot

2 Anotação de nome da proteína

3 Nome de categoria funcional de acordo com o MIPS Functional Catalogue

4 Número representando o valor de expressão da proteína

**Tabela 4: Proteínas Intracelulares Induzidas a 36° C.**

<b>Nº de Acesso<sup>1</sup></b>	<b>Nome da Proteína<sup>2</sup></b>	<b>Score</b>	<b>Categoria MIPS<sup>3</sup></b>
A0A0D2GZA8	fosfoglicomutase	2973,72	Metabolismo dos compostos C e carboidratos
A0A0D2E2B8	aldeído desidrogenase (NAD +)	808	Metabolismo dos compostos C e carboidratos
A0A0D2EJU1	álcool desidrogenase 1	2400,81	fermentação alcoólica
A0A0D2FBT9	oxidorreductase putativa de ligação ao FAD	3797,78	metabolismo de tetraterpenos (carotenóides)
A0A0D2H4G3	homogentisato 1,2-dioxigenase	1304,99	metabolismo da tirosina
A0A0D2GNV6	S- (hidroximetil) glutathiona desidrogenase	810,44	oxidação de ácidos graxos
A0A0D2GWB2	óxido nítrico dioxigenase	1172,72	oxidação de ácidos graxos
A0A0D2FEW1	uricase	1053,68	metabolismo de nucleotídeo de purina / nucleosídeo / nucleobase
A0A0D2H5M9	aldeído desidrogenase	1104,02	fermentação alcoólica
A0A0D2FEZ9	carboximetilenobutenolidas e	6958,88	metabolismo aromático
A0A0D2GR02	peptidil-prolil cis-trans isomerase D	2253,53	metabolismo da prolina
A0A0D2H5G4	di-hidroxiacetona quinase	2381,66	metabolismo lipídico, ácido graxo e isoprenóide
A0A0D2GD43	aspartato aminotransferase	1181,6	metabolismo da família aspartato
A0A0D2F190	O-acetilhomoserine (tiol) - lyase	901,48	metabolismo da metionina
A0A0D2H184	peptidil-prolil cis-trans isomerase	6615,76	metabolismo da prolina
A0A0D2GPB2	farnesil pirofosfato sintase	942,09	metabolismo secundário
A0A0D2HBR3	3-hidroxi-isobutiril-CoA hidrolase mitocondrial	1025,15	metabolismo da família do piruvato
A0A0D2GXF7	fumarilacetoacetase	957,48	metabolismo da tirosina
A0A0D2E1D5	Subunidade beta da ATP sintase, mitocondrial	1124,9	geração de energia (por exemplo, ATP sintase)
A0A0D2HPL2	acetil-CoA C-acetiltransferase	1418,53	ciclo redutor do TCA
A0A0D2GVX3	Subunidade 2 da sintase de citrato de ATP	2788,78	via do ácido tricarbóxico
A0A0D2HE43	2-metilcitrato sintase, mitocondrial	4267,71	geração de energia (por exemplo, ATP sintase)
A0A0D2DFJ7	fosfocetolase 1	1969,01	via de fosfato de pentose
A0A0D2GHM4	6-fosfogluconato desidrogenase, descarboxilante	1779,34	via de fosfato de pentose
A0A0D2GZU3	oxirreductase	1002,96	respiração aeróbica
A0A0D2H2X1	isocitrato desidrogenase, dependente de NAD	1438,5	via do ácido tricarbóxico
A0A0D2GZE9	triosefosfato isomerase	1623,22	glicólise e gliconeogênese
A0A0D2GYA1	citocromo c	3706,26	conservação de energia
A0A0D2DJY3	malato desidrogenase, dependente de NAD	11200,62	via do ácido tricarbóxico
A0A0D2GYT1	frutose-bisfosfato aldolase 1	5543,19	glicólise e gliconeogênese
A0A0D2DY12	fosfoglicerato quinase	6905,08	glicólise e gliconeogênese

<b>A0A0D2G4E3</b>	Fator de alongamento 1-gama 2	10417,85	alongamento de tradução
<b>A0A0D2DXP8</b>	fator de alongamento 1-beta	1653,96	alongamento de tradução
<b>A0A0D2EZ66</b>	Proteína ribossômica 60S L4-B	1714,69	proteínas ribossômicas
<b>A0A0D2HLQ9</b>	Proteína ribossômica 40S S5	4894,65	proteínas ribossômicas
<b>A0A0D2EMX3</b>	proteína ribossômica L28e	2300,07	proteínas ribossômicas
<b>A0A0D2DM09</b>	fator de alongamento 2	1383,06	alongamento de tradução
<b>A0A0D2GPH8</b>	Proteína ribossômica 40S S11	3858,78	proteínas ribossômicas
<b>A0A0D2G9K3</b>	proteína de montagem do nucleossoma 1-like 1	574,62	montagem de complexos proteicos
<b>A0A0D2GTZ1</b>	proteína de controle de divisão celular 48	1779,47	ciclo celular mitótico e controle do ciclo celular
<b>A0A0D2HJZ3</b>	phosphoglycolate phosphatase	5725,12	transdução de sinal mediada por enzima
<b>A0A0D2GEJ6</b>	Amina oxidase de cobre 1	1392,17	cofator complexo / co-substrato / ligação de vitaminas
<b>A0A0D2E018</b>	proteína de stress geral CsbD	22575,59	resposta ao estresse
<b>A0A0D2GPW2</b>	proteína semelhante à hsp70	1126,98	resposta ao choque térmico
<b>A0A0D2GM40</b>	proteína semelhante à hsp72	2500,71	resposta ao choque térmico
<b>A0A0D2GXA8</b>	proteína semelhante à hsp90	3063,22	resposta ao choque térmico
<b>A0A0D2EIN7</b>	proteína semelhante à hsp88	1292,32	resposta ao choque térmico
<b>A0A0D2GU51</b>	proteína semelhante à hsp10	27833,18	resposta ao choque térmico
<b>A0A0D2DNK4</b>	proteína hsp60-like	5084,52	resposta ao choque térmico
<b>A0A0D2E2C8</b>	peroxidase	5102,64	reação de peroxidase
<b>A0A0D2G8Z9</b>	Superóxido dismutase [Mn], mitocondrial	13315,75	metabolismo de superóxido
<b>A0A0D2HDB3</b>	catalase-peroxidase	2604,62	reação de catalase
<b>A0A0D2E6D9</b>	proteína hipotética conservada	4027,62	-
<b>A0A0D2EU45</b>	proteína hipotética conservada	2539,21	-
<b>A0A0D2DXA5</b>	proteína hipotética conservada	3880,52	-
<b>A0A0D2HD57</b>	proteína hipotética conservada	21135,26	-
<b>A0A0D2GXU9</b>	proteína hipotética conservada	3872,85	-
<b>A0A0D2DIQ0</b>	Proteína TOXD	1232,25	-
<b>A0A0D2GCF7</b>	proteína contendo domínio metiltransferase	856,39	-
<b>A0A0D2HNS2</b>	transcetolase	2551,5	-
<b>A0A0D2GUI8</b>	Proteína tipo endopeptidase Pfpl	8570,73	-

1 Número de informação geral no banco de dados Uniprot

2 Anotação de nome da proteína

3 Nome de categoria funcional de acordo com o MIPS Functional Catalogue

**Tabela 5: Proteínas Intracelulares Reprimidas a 36° C.**

<b>Nº de Acesso<sup>1</sup></b>	<b>Nome da Proteína<sup>2</sup></b>	<b>Score</b>	<b>Categoria MIPS<sup>3</sup></b>
A0A0D2H6H4	hidroxilglutaciona hidrolase	6457,11	reação de conjugação da glutaciona
A0A0D2DZQ6	S-formilglutaciona hidrolase	2003,48	reação de conjugação da glutaciona
A0A0D2H8E4	Aldeído desidrogenase	3141,38	fermentação alcoólica
A0A0D2GSE8	5-metiltetra-hidropteroil-triglutamato-homocisteína S-metiltransferase	1936,09	metabolismo da metionina / cisteína
A0A0D2GU81	manitol-1-fosfato 5-desidrogenase	9761,92	Metabolismo dos compostos C e carboidratos
A0A0D2DHZ5	trihidroxinaftaleno redutase	2306,43	metabolismo aromático
A0A0D2GJE5	3-oxoacil- [proteína portadora de acilo] redutase	21847,98	metabolismo do ácido graxo
A0A0D2H4M3	glutamil aminopeptidase	990,86	metabolismo de aminoácidos
A0A0D2HH47	sintase de argininosuccinato	1415,43	metabolismo da arginina
A0A0D2GFL4	proteína de biossíntese de pigmentos conídios Ayl1	1410,18	metabolismo das melaninas
A0A0D2H4Z9	fosfatase alcalina	843,81	metabolismo de fosfato
A0A0D2HEQ5	Fosfomanomutase	2758,7	Metabolismo dos compostos C e carboidratos
A0A0D2EUS3	domínio dissulfeto-isomerase de proteínas	1613,93	metabolismo de enxofre, nitrogênio e selênio
A0A0D2HJZ7	nitroreductase putativa HBN1	7320,99	metabolismo de nitrogênio
A0A0D2EYT5	nucleosídeo difosfato quinase	29262,19	Metabolismo nucleotídeo / nucleosídeo / nucleobase
A0A0D2GBE9	Manitol desidrogenase dependente de NADP	11721,05	transporte de elétrons e conservação de energia associada à membrana
A0A0D2FEY5	isomerase de glicose-6-fosfato	6672,71	glicólise e gliconeogênese
A0A0D2DD51	2-metilcitrato desidratase	3663,86	via do ácido tricarboxílico
A0A0D2DXF0	delta-1-pirrolina-5-carboxilato desidrogenase mitocondrial	674,33	-
A0A0D2F3I7	proteína fosfoglicerato mutase-like	6753,77	glicólise e gliconeogênese
A0A0D2GBZ6	transaldolase	13784,13	via de fosfato de pentose
A0A0D2DFI1	proteína reguladora suaPrG1	2294,81	respiração aeróbica
A0A0D2F1F6	enolase	12612,52	glicólise e gliconeogênese
A0A0D2DL47	carboxiquinase fosfoenolpiruvato [ATP]	2773,77	glicólise e gliconeogênese
A0A0D2F5D8	desidrogenase do gliceraldeído-3-fosfato	4697,92	via das pentoses-fosfato
A0A0D2F0Z4	NADPH2 desidrogenase	973,86	transporte de elétrons e conservação de energia associada à membrana
A0A0D2G1L6	piruvato descarboxilase	1423,71	via do ácido tricarboxílico
A0A0D2H0K8	beta-glucosidase	1339,1	parede celular
A0A0D2E6X5	dipeptidil-peptidase III	1042,65	degradação de proteínas citoplasmáticas e nucleares
A0A0D2E0D3	pirofosfatase inorgânica	6387,74	resistência a agentes químicos inorgânicos
A0A0D2EKG0	protease vacuolar A	5816,58	degradação proteica vacuolar

<b>A0A0D2GCW8</b>	Proteína ribossômica ubiquitina-60S L40	3270,24	proteínas ribossômicas
<b>A0A0D2GS68</b>	proteína ribossômica ubiquitina-40S S27a	3862,55	proteínas ribossômicas
<b>A0A0D2EKT2</b>	Proteína ribossômica 60S L20-B	1135,97	proteínas ribossômicas
<b>A0A0D2G2F3</b>	fosfohidrolase dependente de metal	1067,59	ligação de metais pesados (Cu, Fe, Zn)
<b>A0A0D2DC61</b>	módulo de ligação a carboidratos família 48 proteína	916,9	junção de fenda formando família de proteínas
<b>A0A0D2HKL7</b>	proteína hipotética conservada	12196,43	-
<b>A0A0D2GQQ0</b>	ubiquitina	3834,4	modificação por ubiquitinação, desubiquitinação
<b>A0A0D2G1P7</b>	14-3-3 proteína da família	2005,7	-
<b>A0A0D2E704</b>	proteína hipotética conservada	4589,68	-
<b>A0A0D2GYP1</b>	Proteína wos2	11543,68	-
<b>A0A0D2GP13</b>	proteína hipotética conservada	1163,11	-
<b>A0A0D2DRA3</b>	proteína hipotética conservada	1455,71	-
<b>A0A0D2HHH1</b>	proteína hipotética conservada	1209,32	-
<b>A0A0D2HCB0</b>	proteína hipotética conservada	1493,58	-

1 Número de informação geral no banco de dados Uniprot

2 Anotação de nome da proteína

3 Nome de categoria funcional de acordo com o MIPS Functional Catalogue

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a utilização de metodologias específicas e de alta eficiência foi possível realizar um estudo elaborado mapeando o proteoma intracelular e o secretoma de organismos, como *F. pedrosoi*, esses conjuntos proteicos participam ou estão associados à sobrevivência e patogenicidade fúngica nos tecidos do hospedeiro. Associando metodologias específicas com estudos *in silico* utilizando ferramentas de bioinformática realizamos uma abordagem mais completa para a avaliação de proteínas.

Com o objetivo de realizar uma análise proteômica abrangente do fungo patogênico humano *Fonsecaea pedrosoi*, foram identificadas e caracterizadas moléculas que estão presentes no secretoma e proteoma intracelular nas condições de temperatura de 22° C e 36° C. Este estudo focou em avaliar principalmente o secretoma durante a incubação em temperaturas diferentes buscando moléculas que se utilizando de rotas de secreção clássicas ou alternativas, são secretadas e podem vir a contribuir para a indução da virulência e patogenicidade, bem como captação de nutrientes, resistência e outras vantagens conferidas ao fungo proporcionando maior sucesso durante a infecção. Grande parte das proteínas identificadas neste estudo corroboram com a literatura, uma vez que já foram descritas em outros secretomas fúngicos e ainda, muitas delas já foram associadas a virulência fúngica.

Os resultados obtidos indicam que a maioria das proteínas identificadas se utilizam de vias secretórias alternativas. Dentre as proteínas identificadas no proteoma intracelular e no secretoma deste fungo podemos destacar proteínas envolvidas em diversos processos biológicos, tais quais, adesão à MEC, relacionadas ao estresse térmico e oxidativo, proteínas que podem apresentar capacidades imunogênicas e ainda as relacionadas à defesa, entre outras funções. Com esse estudo podemos identificar moléculas relacionadas com o proteoma que podem estar envolvidas no estabelecimento da infecção e sobrevivência fúngica, levando ao sucesso da infecção.

No entanto, estudos adicionais se fazem necessários para confirmar os resultados obtidos e ainda compará-los à outras formas e condições de infecção. Com o desenvolvimento desse trabalho trouxemos a primeira descrição abrangente

do proteoma do fungo *F. pedrosoi*, sendo assim acreditamos que tenha sido acrescentado informações pertinentes sobre a patogênese de *F. pedrosoi* bem como sobre os mecanismos de secreção utilizados pelo patógeno para estabelecer a infecção. Outros estudos ainda se fazem necessários para ampliação dos dados visando identificar um número maior de diferenças entre o perfil de secreção proteica em diferentes condições que simulem a interação com o hospedeiro, bem como a realização de estudos funcionais das proteínas identificadas, a fim de inferir com maiores propriedades o real papel destas moléculas na infecção.

## 7 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Estudos funcionais mais aprofundados das moléculas encontradas visando a elucidação de novos papéis e a importância das proteínas secretadas durante a infecção.
- Determinação de alvos para realização de ensaios de silenciamento gênico ou ainda construção de mutantes que possibilitem avaliar o potencial de patogenicidade e virulência deste alvo selecionado.
- Avaliar a influência das proteínas secretadas durante a infecção, bem como suas funções como adesinas, realizando experimentos *in vivo* (camundongos) e *ex vivo* (macrófagos), que possam ser desenvolvidos usando frações do secretoma ou proteínas purificadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albuquerque PC, Nakayasu ES, Rodrigues ML, Frases S, Casadevall A, et al. (2008) Vesicular transport in *Histoplasma capsulatum*: an effective mechanism for trans-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes. *Cell Microbiol* 10: 1695–1710.

ALVIANO, D. S.; KENLIPP, L. F.; LOPES, A. H.; TRAVASSOS, L. R.; MEYER-FERNANDES, J. R.; RODRIGUES, M. L. ALVIANO, C. S. (2003). Differentiation of *Fonsecaea pedrosoi* mycelial forms into sclerotic cells in induced by platelet-activating factor. *Res. Microbiology*, v. 154, p. 689-695.

ALVIANO, D. S.; FRAZEN, J. A.; TRAVASSOS, L.R.; HOLANDINO, C.; ROZENTAL, S.; EJZEMBEG, R.; ALVIANO, C. S.; RODRIGUES, L. M. (2009). Melanin from *Fonsecaea pedrosoi* induces production of human antifungal antibodies and enhances the antimicrobial efficacy of Phagocytes. *Infection and Immunity*. v. 72, p. 229-237.

ANTELMANN, H. et al. Sep (2001) A proteomic view on genome-based signal peptide predictions. *Genome Res*, v. 11, n. 9, p. 1484-502.

BOCCA, L. M.; BRITO, S. M. P. P.; FIGUEIREDO, F.; TOSTA, C. E. (2006). Inhibition of nitric oxide production by macrophages in cromoblastomycosis: a role for *Fonsecaea pedrosoi* melanin. *Mycopathologia*. v. 161, p. 195-203.

Bonin-Debs AL, Boche I, Gille H, Brinkmann U (2004) Development of secreted proteins as biotherapeutic agents. *Expert Opin Biol Ther* 4: 551–558.

Bouws, H.; Beier, H.; Gross, H. (2008). Fungal secretomes – Nature’s toolbox for white biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80: 381-388.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254.

Brandt, ME and Warnock, DW (2003). Epidemiology, clinical manifestations, and therapy of infections caused by dematiaceous fungi. *J Chemother* 15 Suppl 2: 3647.

Caccia, D., Dugo, M., Callari, M., & Bongarzone, I. (2013). Bioinformatics tools for secretome analysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1834(11), 2442-2453.

Choi J, Park J, Kim D, Jung K, Kang S, et al. (2010) Fungal secretome database: integrated platform for annotation of fungal secretomes. *BMC Genomics* 11: 105.

CONESA, A. et al. (2001). The secretion pathway in filamentous fungi: a biotechnological view. *Fungal Genet Biol*, v. 33, n. 3, p. 155-71.

ESTERRE, P.; QUEIROZ-TELLES, F. (2006). Management of chromoblastomycosis: novel perspectives. *Current Opinion in Infectious Diseases*. v. 19, p. 148-152.

Ghannoum, M. A. (2000). Potential Role of Phospholipases in Virulence and Fungal Pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(1), 122–143.

Gómez-Mendoza, D. P. (2009). Variações do secretoma de *Trichoderma harzianum* em resposta a diferentes fontes de carbono. Dissertação de mestrado. Universidade de Brasília. Brasília, Brasil.

Holbrook ED, Edwards JA, Youseff BH, Rappleye CA (2011) Definition of the extracellular proteome of pathogenic-phase *Histoplasma capsulatum*. *J Proteome Res* 10: 1929–1943.

HOOG, G. S, ATILLI-ANGELIS, D.; VICENTE, V. A.; VAN DEN END, H. A.; QUEIROZTELLES, F. (2004). Molecular ecology and pathogenic potential of *Fonsecaea* species. *Med. Mycol.* v. 42, p. 405-416.

KRUSZEWSKA, J.S., PERLIŃSKA-LENART, U., GÓRKA-NIEĆ, W., ORŁOWSKI, J., ZEMBEK, P., & PALAMARCZYK, G. 2008. Alterations in Protein Secretion Caused by Metabolic Engineering of Glycosylation Pathways in Fungi. *Acta Biochimica Polonica*. 55(3): 1-10

Lippincott-Schwartz, J., Roberts, T. H., & Hirschberg, K. (2000). Secretory protein trafficking and organelle dynamics in living cells 1. *Annual review of cell and developmental biology*, 16(1), 557-589.

- Martínez, R. L., & Tovar, L. J. M. (2007). Chromoblastomycosis. *Clinics in dermatology*, 25(2), 188-194.
- McGinnis, MR (1983). Chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis: new concepts, diagnosis, and mycology. *J Am Acad Dermatol* 8(1): 116.
- MOMIN, A. Y.; RAGHUVANSHI, SR.; LANJEWAR, DN. (2008). Cutaneous chromoblastomycosis. *Bombay Hospital Journal*, v. 50, n. 2.
- NAJAFZADEH, M. J. ; J. SUN4, V. VICENTE, L. XI, A. H. G. GERRITS VAN DEN ENDE & G. S. DE HOOG. (2009). *Fonsecaea nubica*, a new species of agent of human chromoblastomycosis revealed using molecular data. , *Medical Mycology*.
- Nayyar, C., Gulati, N., & Sherwal, B. L. (2016). A rare case of phaeohyphomycosis caused by *Fonsecaea pedrosoi* in a child with nephrotic syndrome. *Indian Journal of Nephrology*, 26(3), 220–222.
- Nombela C, Gil C, Chaffin WL (2006) Non-conventional protein secretion in yeast. *Trends Microbiol* 14: 15–21.
- Palmeira, V. F., Kneipp, L. F., Rozental, S., Alviano, C. S., & Santos, A. L. (2008). Beneficial effects of HIV peptidase inhibitors on *Fonsecaea pedrosoi*: promising compounds to arrest key fungal biological processes and virulence.
- Peberdy, J. F. (1994). Protein secretion in filamentous fungi—trying to understand a highly productive black box. *Trends in biotechnology*, 12(2), 50-57.
- PRUDOVSKY, I. et al. 2003 The non-classical export routes: FGF1 and IL-1alpha point the way. *J Cell Sci*, v. 116, n. Pt 24, p. 4871-81.
- QUEIROZ-TELLES, F.; ESTERRE, P.; PEREZ-BLANCO, VITALE, R. G. SALGADO, C. G. BONITAZ, A. (2009). Chromoblastomycosis: an overview of clinical manifestation, diagnosis and treatment. *Medical Mycology*. p. 1-13.
- Ranganathan, S.; Garg,G. (2009). Secretome: clues into pathogen infection and clinical applications. *Genome Med*. 1(11), p.113.
- RASUL, E. S.; HAZARIKA, N. K.; SHARMA, A.; BORUA, P.C.; SEM, S.S. (2007). Cromoblastomycosis. *Japi*. v. 55.

- Ravalason, H.; Grisel, S.; Chevret, D.; Favel, A.; Berrin, J. G.; Sigoillot, J. C.; *et al.* (2012). *Fusarium verticillioides* secretome as a source of auxiliary enzymes to enhance saccharification of wheat straw. *Bioresour. Technol.* 114:589–96.
- Restrepo, A., & Jimenez, B. E. (1980). Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase in a chemically defined culture medium. *Journal of Clinical Microbiology*, 12(2), 279.
- RIBEIRO, E. L.; SOARES, A. J.; FERREIRA, W. M.; CARDOSO, C. G.; NAVES, P. L. F.; DIAS, S.M. S. (2006). Chromoblastomycosis: present disease in Brazilian population reality. *RBAC*. v. 38 (3), p. 189-192.
- Rodrigues ML, Nakayasu ES, Oliveira DL, Nimrichter L, Nosanchuk JD, *et al.* (2008) Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryot Cell* 7: 58–67.
- ROUMELIOTI, K.; VANGELATOS, I.; SOPHIANOPOULOU, V. A cryptic role of a glycolytic-gluconeogenic enzyme (aldolase) in amino acid transporter turnover in *Aspergillus nidulans*. *Fungal genetics and biology: FG & B*, v. 47, n. 3, p. 254–67, mar. 2010.
- Salgado CG. 2010. Fungal versus host interactions in chromoblastomycosis: what we have learned from animal models and what is yet to be solved. *Virulence* 1:3–5.
- SALLESE, M.; GIANNOTTA, M.; LUINI, A. (2009). Coordination of the secretory compartments via inter-organelle signalling. *Semin Cell Dev Biol*, v. 20, n. 7, p. 801-9.
- SÁ-NUNES, A.; MEDEIROS, A. I.; FACCIOLI, L. H.; Interleukin-5 mediates peritoneal eosinophilia induced by the F1 cell wall fraction of *Histoplasma Capsulatum*. *Brazilian Journal Medical biological Reseach*. v. 37, p. 343-346, 2004.
- SANTOS, S.; L.; A.; PALMEIRA, F.; V.; ROZENTAL, S.; KNEIPP, F.; L.; NIMRICHTER, L.; ALVIANO, S.; D.; RODRIGUES, L.; M.; ALVIANO, S.; C.; Biology and pathogenesis of *Fonsecaea pedrosoi*, the major etiologic agent of chromoblastomycosis. *FEMS Microbiol Rev*. v.31, p. 570-591, 2007.
- SPANG, A. The life cycle of a transport vesicle. (2008). *Cell Mol Life Sci*, v. 65, n. 18, p. 2781-9.

Silva CL, Ekizlerian SM. 1985. Granulomatous reactions induced by lipids extracted from *Fonsecaea pedrosoi*, *Fonsecaea compactum*, *Cladosporium carrionii* and *Phialophora verrucosum*. J Gen Microbiol 131: 187–194.

SILVA, J. P.; SOUSA, W.; ROZENTAL, S. (1998-1999). Cromoblastomycosis: a retrospective study of 325 cases on Amazonic Region (Brazil). Mycopathologia. v. 143 (3), p. 171-175.

SILVA, J. P.; ALVIANO, D. N.; ALVIANO, C. S.; SOUZA, W.; TRAVASSOS, L. R.; DINIZ, J. A. P.; ROZENTAL, S. (2002). Comparison of *Fonsecaea pedrosoi* sclerotic cells obtained in vivo and in vitro: ultrastructure and antigenicity. FEMS Immunology Medical Microbiology. v. 33 (1), p. 63-69.

Silva, A. J.; Gómez-Mendoza, D. P.; Junqueira, M.; Domont, G. B.; Ximenes, E. F. F.; Sousa, M. V.; Ricart, C. A. (2012). Blue native-PAGE analysis of *Trichoderma harzianum* secretome reveals cellulases and hemicellulases working as multienzymatic complexes. Proteomics. 12(17): 2729-2738.

Tjalsma, H.; Bolhuis; Jongbloed, J. D. H.; Brons, S.; Van Diji, J. (2000). Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64(3): 515-547.

Tjalsma H, Antelmann H, Jongbloed JD, Braun PG, Darmon E, et al. (2004) Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: separating the “secrets” of the secretome. Microbiol Mol Biol Rev 68: 207–233.

TAMAYO, D. et al. Involvement of the 90 kDa heat shock protein during adaptation of *Paracoccidioides brasiliensis* to different environmental conditions. Fungal genetics and biology, v. 51, p. 34–41, fev. 2013

TANG, W. K. (2001) Cromoblastomycosis. Hong Kong Dermatology & Venereology Bulletin.

Tesei, D., Marzban, G., Marchetti-Deschmann, M., Tafer, H., Arcalis, E., & Sterflinger, K. (2015). Proteome of tolerance fine-tuning in the human pathogen black yeast *Exophiala dermatitidis*. *Journal of proteomics*, 128, 39-57.

Tsang, A.; Butler, G.; Powlowski, J.; Panisko, E. A.; Baker, S. E. (2009). Analytical and computational approaches to define the *Aspergillus niger* secretome. *Fungal Genet. Biol.* 46:S153–60.

VALKONEN, M. Functional studies of the secretory pathway of filamentous fungi. The effect of unfolded protein response on protein production. 2003. 114p + app. 68p Faculty of Science Department of Biosciences Division of Plant Physiology, University of Helsinki, Helsinki, Finland.

Vallejo MC, Nakayasu ES, Matsuo AL, Sobreira TJ, Longo LV, et al. (2012) Vesicle and vesicle-free extracellular proteome of *Paracoccidioides brasiliensis*: comparative analysis with other pathogenic fungi. *J Proteome Res* 11: 1676– 1685.

VICENTE, V. A.; ANGELLIS, D. A.; QUEIRÓZ-TELLES FILHO, F.; PIZZIRANI, K.; APARECIDA, A. (2001). Isolation of Herpotrichiellaceae fungi from the environment. *Braz. J. Microbiol.* v. 32 (1), p. 47-51.

VICENTE, V. A.; ANGELLIS, D. A.; PIE, M. R.; QUEIRÓZ-TELLES F.; CRUZ, L. M.; NAJAFZADEH, G. H.; HOOG de, G. S.; ZHAO, J.; PIZZIRANI-KLEINER, A. Environment isolation of Black yeast-like fungi involved in human infection. *Studies in Mycology.* v. 61. p. 137-144, 2008.]

Wartenberg, D., Lapp, K., Jacobsen, I. D., Dahse, H. M., Kniemeyer, O., Heinekamp, T., & Brakhage, A. A. (2011). Secretome analysis of *Aspergillus fumigatus* reveals Asp-hemolysin as a major secreted protein. *International Journal of Medical Microbiology*, 301(7), 602-611.

Weber SS, Parente AFA, Borges CL, Parente JA, Bailão AM, et al. (2012) Analysis of the Secretomes of *Paracoccidioides* Mycelia and Yeast Cells. *PLoS ONE* 7(12): e52470. doi:10.1371/journal.pone.0052470