

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



ILMD

INSTITUTO LEÔNIDAS  
& MARIA DEANE  
Fiocruz Amazônia

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ

INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE – ILMD

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA INTERAÇÃO PATÓGENO  
HOSPEDEIRO (PPGBIO – INTERAÇÃO)

Análise proteômica dos secretomas dos fungos *Trichoderma harzianum*  
e *Fusarium solani*

Juliana Cardoso Leal

MANAUS – AM  
2019

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ  
INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE – ILMD  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA INTERAÇÃO PATÓGENO  
HOSPEDEIRO (PPGBIO – INTERAÇÃO)

JULIANA CARDOSO LEAL

Análise proteômica dos secretomas dos fungos *Trichoderma harzianum*  
e *Fusarium solani*

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro, como requisito parcial e obrigatório para a obtenção do título de Mestre em Ciências, com área de concentração em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro.

Orientadora: Dra. Priscila Ferreira de Aquino

\*Bolsista: CAPES e FIOCRUZ

MANAUS – AM  
2019

## FICHA CATALOGRÁFICA

L435a

Leal, Juliana Cardoso.

Análise proteômica dos secretomas dos fungos *Trichoderma harzianum* e *Fusarium solani* / Juliana Cardoso Leal. – Manaus: Instituto Leônidas e Maria Deane, 2019.

111 f.

Dissertação (Mestrado em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro) – Instituto Leônidas e Maria Deane, 2019.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Priscila Ferreira de Aquino.

1. Proteômica 2. Fungos ambientais I. Título

CDU 632.95 (043.3)

CDD 616.96901

22. ed.

JULIANA CARDOSO LEAL

**Análise proteômica dos secretomas dos fungos *Trichoderma harzianum*  
e *Fusarium solani*.**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro, como requisito parcial e obrigatório para a obtenção do título de Mestre em Ciências, com área de concentração em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro.

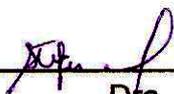
Aprovada em: 27/02/2019

**BANCA EXAMINADORA**



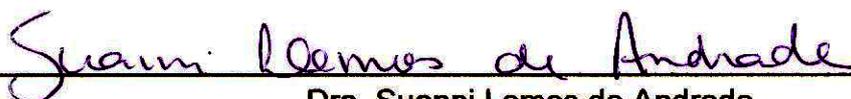
---

Dra. Priscila Ferreira de Aquino – Orientadora  
Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD/FIOCRUZ



---

Dra. Stefanie Costa Pinto Lopes  
Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD/FIOCRUZ



---

Dra. Suanni Lemos de Andrade  
Universidade do Estado do Amazonas

**“Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima”.**

**(Louis Pasteur)**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me guiado e me sustentado até aqui, sem Ele nada disso seria possível.

Aos meus pais, Kátia Leal e Gleyferson Leal, por terem dado o seu melhor na minha criação e terem dado tudo de si para que eu conseguisse ter êxito nos meus estudos e chegasse até aqui, sou eternamente grata.

Ao meu esposo, Samuel Lacerda, que participou efetivamente de muitas etapas e decisões da minha vida e esteve ao meu lado me dando força quando eu achava que não conseguiria.

À minha orientadora, Dra. Priscila Aquino, que foi um presente divino para mim, sendo chave fundamental para o meu crescimento profissional, obrigada pelos ensinamentos, amizade e por sempre acreditar no meu potencial.

Ao meu grupo de pesquisa: Kemily Nunes, Luana Leão, Cláudia Araújo, Sofia Cavalcante, Jéssica Kelly, Paulo Alexandre, Genésio Pontes e Marissa dos Anjos, por todo apoio no laboratório e por todas as opiniões dadas para o meu crescimento e melhoramento do meu projeto, vocês tornaram meus dias mais leves.

A todos da turma do PPG-BIOINTERAÇÃO que juntos conseguimos vencer cada disciplina e desafios que nos foram dados, em especial a minha amiga Karina Pessoa que esteve comigo desde o início.

Aos professores doutores do PPG-BIOINTERAÇÃO que me trouxeram mais conhecimento durante cada disciplina ofertada.

A todos os envolvidos da Unidade proteômica do departamento de bioquímica da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), em especial ao Dr. Gilberto Domont, Dr. Fábio Nogueira e à MSc. Renata Santos pela parceria e orientações quanto à análise proteômica.

À minha orientadora do estágio à docência, Tatiane Amabile, por todo ensinamento que me foi proporcionado dentro da faculdade Estácio.

À Fundação Oswaldo Cruz, ao Instituto Leônidas e Maria Deane e ao Programa de Pós-Graduação Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro (PPG-BIOINTERAÇÃO).

À Fiotec e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, pela concessão da bolsa de estudos, que me auxiliou durante o meu período do mestrado.

Por fim, a todos que participaram direta ou indiretamente para a concretização desse trabalho, meu muito obrigada!

## RESUMO

Os fungos são encontrados em diversos ecossistemas, agem como agentes decompositores e podem ser sapróbios, patógenos ou ambos. *Fusarium solani* e *Trichoderma harzianum* são fungos comumente encontrados no solo e adaptados à temperatura ambiente (~28°C). No entanto, relatos na literatura demonstram a capacidade patogênica desses fungos, causando infecções em humanos. Nesse contexto, fatores de virulência podem estar associados à patogênese dessas doenças, auxiliando na adaptação desses microrganismos ao hospedeiro. Alguns exemplos desses fatores incluem o crescimento na temperatura corporal (~37°C) e a secreção de enzimas hidrolíticas. Dessa forma, a proteômica pode auxiliar na elucidação de proteínas que estejam envolvidas no processo de infecção causada por esses fungos. Este trabalho teve como objetivo investigar o perfil proteico dos secretomas dos fungos *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) e *Fusarium solani* (CFAM 1313), através de ferramentas proteômicas para analisar os processos moleculares e suas características patogênicas. Os fungos estudados, isolados da água de consumo de uma comunidade amazônica, foram reativados da Coleção de Fungos da Amazônia (CFAM). As características morfológicas desses microrganismos foram avaliadas por sete dias nas temperaturas de 28°C e 37°C. Posteriormente, ensaios qualitativos em meio de cultura com substratos específicos para proteases, fosfolipases e ureases foram realizados a 37°C. O perfil proteico do secretoma tanto a 28°C quanto a 37°C foi analisado por meio da eletroforese unidimensional e da proteômica *shotgun*. Macroscopicamente, *Fusarium solani* (CFAM 1313) não apresentou diferença aparente em ambas as temperaturas, ao contrário de *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) que apresentou uma alteração da coloração dos conídios a 37°C. Por outro lado, microscopicamente, *Fusarium solani* (CFAM 1313) foi o único que demonstrou mudanças entre as temperaturas. Adicionalmente, *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) obteve melhor crescimento em 37°C, enquanto *Fusarium solani* (CFAM 1313) em 28°C. Nos ensaios qualitativos, ambos os fungos se mostraram positivos para produção de proteases, fosfolipases e ureases. Além disso, quanto à produção proteica ambos obtiveram melhor rendimento a 28°C em comparação com 37°C. A eletroforese unidimensional revelou um perfil diferencial entre as temperaturas de cada cultura fúngica e por meio da proteômica *shotgun* foram identificadas proteínas que podem ser associadas à patogenicidade na temperatura de 37°C, e relacionadas à atividades ambientais em 28°C. Portanto, tais resultados demonstram o potencial de adaptação desses fungos, especialmente à temperatura corporal, produzindo proteínas, como, por exemplo, proteases aspárticas, lisofosfolipase ou carboxipeptidase. Tais proteínas participam de processos que podem ser prejudiciais ao organismo humano, como evasão do sistema imunológico ou invasão e adesão celular; sugerindo assim, perfis de patogenicidade de ambos os fungos e consequente risco à saúde da comunidade de onde foram isolados.

**Palavras-chave:** Fungos ambientais, Proteômica *shotgun*, Fatores de patogenicidade.

## ABSTRACT

Fungi are found in various ecosystems, they act as decomposing agents and can be saprophytes, pathogens or both. *Fusarium solani* and *Trichoderma harzianum* are commonly found in soil and adapted to room temperature ( $\approx 28^{\circ}\text{C}$ ). However, reports in the literature demonstrate the pathogenic capacity of these fungi, causing infections in humans. In this context, virulence factors can be associated with the pathogenesis of these diseases, helping in the adaptation of these microorganisms to the host. Some examples of these factors include growth at body temperature ( $\approx 37^{\circ}\text{C}$ ) and secretion of hydrolytic enzymes. So, the proteomics can help in the elucidation of proteins that are involved in the process of infection caused by these fungi. The objective of this work was to investigate the protein profiles (secretome) of *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) and *Fusarium solani* (CFAM 1313), using proteomic tools to improve the knowledge about the molecular processes and their potential pathogenic characteristics. To this, the fungi studied, isolated from the drinking water of an Amazonian community, were reactivated from the Amazonian Fungi Collection (CFAM). The morphological characteristics of these microorganisms were evaluated for seven days at temperatures  $28^{\circ}\text{C}$  and  $37^{\circ}\text{C}$ . Subsequently, qualitative assays in culture media with specific substrates for proteases, phospholipases and ureases were performed at  $37^{\circ}\text{C}$ . The protein profiles of the secretome both at  $28^{\circ}\text{C}$  and  $37^{\circ}\text{C}$  were analyzed by unidimensional electrophoresis and shotgun proteomics. Macroscopically, *Fusarium solani* (CFAM 1313) showed no apparent difference at both temperatures, unlike *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) which showed a change in the color of conidia at  $37^{\circ}\text{C}$ . On the other hand, microscopically, *Fusarium solani* (CFAM 1313) was the only one that showed alterations between temperatures. Additionally, *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) obtained better growth at  $37^{\circ}\text{C}$ , while *Fusarium solani* (CFAM 1313) at  $28^{\circ}\text{C}$ . In the qualitative assays, both fungi proved to be positive for production of proteases, phospholipases, and ureases. Besides, for protein production, both obtained better yield at  $28^{\circ}\text{C}$  compared to  $37^{\circ}\text{C}$ . One-dimensional gel electrophoresis revealed a differential profile between the temperatures of each fungal culture and by shotgun proteomics, proteins were identified that can be associated with pathogenicity at  $37^{\circ}\text{C}$  and related to environmental activities at  $28^{\circ}\text{C}$ . Therefore, such results demonstrate the adaptation potential of these fungi, especially at body temperature, producing proteins, such as aspartic proteases, lysophospholipase or carboxypeptidase. These proteins participate in processes that can be harmful to the human organism, as immune system evasion or cell invasion and adhesion, thus suggesting pathogenicity profiles of both fungi and consequent health risk of community from which they were isolated.

**Keywords:** Environmental fungi, Proteomic shotgun, Pathogenicity factors.

## ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>2-DE</b>	Eletroforese bidimensional
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>CID</b>	Dissociação induzida por colisão (do inglês: <i>collision-induced dissociation</i> )
<b>CFAM</b>	Coleção de Fungos da Amazônia
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>DDA</b>	Aquisição dependente de dados (do inglês: <i>data dependent acquisition</i> )
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>ESI</b>	Ionização por Eletrospray (do inglês: <i>Electrospray Ionization</i> )
<b>FT-ICR</b>	Ressonância ciclotrônica de íons por transformada de Fourier (do inglês: <i>Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance</i> )
<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	Íon Bicarbonato
<b>HIV</b>	Vírus da Imunodeficiência Humana
<b>Hsp</b>	Proteínas de Choque Térmico (do inglês: <i>heat shock protein</i> )
<b>IAA</b>	Iodoacetamida
<b>I.D.</b>	Diâmetro interno (do inglês: <i>Internal Diameter</i> )
<b>IgA</b>	Imunoglobulina A
<b>IgE</b>	Imunoglobulina E
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>kDA</b>	Kilodaltons
<b>LTD</b>	<i>Linear Trap Quadrupole</i>
<b>M</b>	Molar
<b>m/z</b>	Razão massa/carga
<b>MALDI</b>	Dessorção/ionização a laser auxiliada por matriz (do inglês: <i>matrix assisted laser desorption/ionization</i> )
<b>MEC</b>	Membrana em Éster de Celulose

<b>MS/MS</b>	Espectrometria de massas sequencial (do inglês: <i>Tandem Mass Spectrometry</i> )
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo
<b>nLC</b>	Nano-cromatografia líquida (do inglês: <i>nano-Liquid Chromatography</i> )
<b>NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub></b>	Bicarbonato de amônio
<b>NSAF</b>	Fator de abundância espectral normalizado (do inglês: <i>normalized spectral abundance factor</i> )
<b>PSM</b>	Correspondências espectro-peptídeo (do inglês: <i>Peptide Spectrum Match</i> )
<b>p/v</b>	Razão peso/volume
<b>PVDF</b>	Membrana de Fluoreto de polivinilideno
<b>Pz</b>	Atividade enzimática
<b>Rpm</b>	Rotação por minuto
<b>Rcf</b>	Força Centrífuga Relativa (do inglês: <i>Relative Centrifugal Force</i> )
<b>Saps</b>	Proteases aspárticas secretadas
<b>SisGen</b>	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio
<b>TCA</b>	Ácido Tricloroacético
<b>TCC</b>	Complexo de ataque à membrana
<b>TEMED</b>	Tetrametiletilenodiamina
<b>TFA</b>	Ácido Trifluoroacético
<b>Th2</b>	<i>T helper 2</i>
<b>TOF</b>	Tempo de voo (do inglês: <i>Time of Flight</i> )
<b>Tris-HCl</b>	Tris(hidroximetil)aminometano – ácido clorídrico (do inglês: <i>Tris (hydroxymethyl) aminomethane - Hydrochloric acid</i> )
<b>UFRJ</b>	Universidade Federal do Rio de Janeiro

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Reação da enzima urease hidrolisando a ureia, resultando em amônia e ácido carbônico (adaptado de MORA & ARIOLI, 2014). .....29
- Figura 2.** Representação esquemática da ação de enzimas hidrolíticas secretadas por fungos para estabelecer a infecção. (A) Ação das fosfolipases no processo de invasão e adesão celular, atuando especificamente nos fosfolipídios presentes na membrana plasmática. (B) Atividade enzimática das ureases hidrolisando a ureia e resultando na liberação de amônia, a fim de modular o pH desfavorável para o desenvolvimento fúngico, ocasionando a lesão tecidual. (C) Proteases atuando tanto em proteínas da matriz extracelular para invasão tecidual quanto em imunoglobulinas e componentes do sistema complemento para evasão imune do fungo. .... 31
- Figura 3.** Esquema ilustrativo de um espectrômetro de massas. ....34
- Figura 4.** Esquema ilustrativo da análise por *Shotgun proteomics* .....35
- Figura 5.** Visualização macromorfológica do crescimento dos fungos *Fusarium solani* (CFAM 1313) e *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) nas temperaturas de 28°C e 37°C. ....49
- Figura 6.** Culturas de *Fusarium solani* (CFAM 1313) crescidas ao longo de 7 dias nas temperaturas de 28°C e 37°C .....50
- Figura 7.** Comparação do crescimento entre as culturas de *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) nas temperaturas de 28°C e 37°C .....51
- Figura 8.** Visualização microscópica expressa pelo fungo *Fusarium solani* (CFAM 1313) a 28°C e 37°C com aumento de 40X. As setas vermelhas indicam a influência da temperatura na esporulação do fungo. Microscópio utilizado: *Leica Microsystems* (DM 1000) ..... 52
- Figura 9.** Visualização microscópica de *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) entre as temperaturas de 28°C e 37°C com aumento de 40X. Microscópio utilizado: *Leica Microsystems* (DM 1000) ..... 52
- Figura 10.** Visualização da positividade quanto à produção de protease para cada fungo na temperatura de 37°C. (A) Halo e colônia de *Trichoderma harzianum* (CFAM

1308) com 3 cm de diâmetro, (B) Halo e colônia de *Fusarium solani* (CFAM 1313) com 1,5 cm de diâmetro ..... 53

**Figura 11.** Visualização da atividade enzimática de fosfolipases pelo fungo *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) na temperatura de 37°C, demonstrando positividade nos tempos entre 72 e 192 horas..... 54

**Figura 12.** Visualização da atividade enzimática de fosfolipases no tempo de 168 horas para *Fusarium solani* (CFAM 1313) na temperatura de 37°C..... 54

**Figura 13.** Visualização da produção de urease pelos fungos estudados na temperatura de 37°C. (A) Controle, (B) *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) e (C) *Fusarium solani* (CFAM 1313) ..... 56

**Figura 14.** Visualização da filtração do meio fermentado (A); do secretoma fúngico obtido no estudo (B); da amostra resultante da concentração e dessalinização (C) e do precipitado proteico ressuspendido em RapiGest® (D) ..... 59

**Figura 15.** Eletroforese unidimensional demonstrando as diferenças do perfil proteico das amostras de *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) submetidas às temperaturas de 28°C e 37°C. Legenda: R1 – Réplica 1; R2 – Réplica 2. Retângulos vermelhos mostrando bandas proteicas diferenciais entre as temperaturas ..... 63

**Figura 16.** Eletroforese unidimensional demonstrando as diferenças do perfil proteico das amostras de *Fusarium solani* (CFAM 1313) submetidas às temperaturas de 28°C e 37°C. Legenda: R1 – Réplica 1; R2 – Réplica 2. Retângulos vermelhos mostrando bandas proteicas diferenciais entre as temperaturas .....64

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Produção de proteases pelos fungos *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) e *Fusarium solani* (CFAM 1313) na temperatura de 37°C. Dados representados pela média de cada tempo e seus respectivos desvios padrão. Letras diferentes indicam valores significativamente distintos ( $p$ -valor  $\leq 0,05$ ), conforme determinado pela ANOVA com o teste de Tukey..... 57
- Gráfico 2.** Proteínas totais produzidas pelos fungos *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) e *Fusarium solani* (CFAM 1313) na temperatura de 37°C. Dados representados pela média de cada tempo e seus respectivos desvios padrão. Letras diferentes indicam valores significativamente distintos ( $p$ -valor  $\leq 0,05$ ), conforme determinado pela ANOVA com o teste de Tukey..... 58
- Gráfico 3.** Rendimento proteico demonstrado pelas médias da concentração de proteínas de *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) e *Fusarium solani* (CFAM 1313) nas temperaturas de 28°C e 37°C, com desvio padrão. ....61
- Gráfico 4.** Cromatogramas de uma réplica técnica de *Fusarium solani* (CFAM 1313) a 37°C (preto) e 28°C (vermelho) de uma corrida cromatográfica de 120 minutos..... 65
- Gráfico 5.** Cromatogramas de uma réplica técnica de *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) a 37°C (preto) e 28°C (vermelho) de uma corrida cromatográfica de 120 minutos.....66
- Gráfico 6.** Distribuição das classes de proteínas identificadas no secretoma do fungo *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308), independente da temperatura submetida, demonstrada em porcentagem ..... 67
- Gráfico 7.** Distribuição das classes de proteínas identificadas no secretoma do fungo *Fusarium solani* (CFAM 1313), independente da temperatura submetida, demonstrada em porcentagem..... 68

<b>Gráfico 8.</b> Resultado da análise no <i>Gene Ontology</i> de <i>Trichoderma harzianum</i> (CFAM 1308), demonstrando as funções das proteínas identificadas em porcentagem no secretoma do fungo .....	69
<b>Gráfico 9.</b> Resultado da análise no <i>Gene Ontology</i> de <i>Fusarium solani</i> (CFAM 1313), demonstrando as funções das proteínas identificadas em porcentagem no secretoma deste microrganismo. ....	70
<b>Gráfico 10.</b> Diagrama de Venn de <i>Trichoderma harzianum</i> (CFAM 1308) comparando as proteínas identificadas unicamente a 37°C (verde), 28°C (amarelo), e ainda as compartilhadas entre as temperaturas (verde claro). ....	72
<b>Gráfico 11.</b> Diagrama de Venn de <i>Fusarium solani</i> (CFAM 1313) comparando as proteínas identificadas unicamente a 37°C (verde), 28°C (amarelo), e ainda as compartilhadas entre as temperaturas (verde claro).....	73
<b>Gráfico 12.</b> Proteínas mais abundantes expressas por <i>Trichoderma harzianum</i> (CFAM 1308) nas temperaturas de 28°C e 37°C.....	74
<b>Gráfico 13.</b> Proteínas mais abundantes expressas por <i>Fusarium solani</i> (CFAM 1313) nas temperaturas de 28°C e 37°C.....	74
<b>Gráfico 14.</b> Distribuição diferencial de proteínas abundantes no secretoma de <i>Trichoderma harzianum</i> (CFAM 1308) nas temperaturas de 28°C e 37°C.....	75
<b>Gráfico 15.</b> Distribuição diferencial de proteínas abundantes no secretoma de <i>Fusarium solani</i> (CFAM 1313) nas temperaturas de 28°C e 37°C.....	76

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Dados da atividade enzimática de fosfolipases na temperatura de 37°C tanto de *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) quanto de *Fusarium solani* (CFAM 1313).  
..... 55
- Tabela 2.** Leitura da concentração de proteínas pelo ensaio fluorimétrico Qubit 3.0® de cada réplica de *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) e *Fusarium solani* (CFAM 1313) ..... 60
- Tabela 3.** Lista de proteínas identificadas no secretoma de *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) em ordem alfabética ..... 103
- Tabela 4.** Lista de proteínas identificadas no secretoma de *Fusarium solani* (CFAM 1313) em ordem alfabética ..... 109

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 Fungos.....	21
2.1.1 Gênero <i>Fusarium</i> spp. ....	21
2.1.2 Gênero <i>Trichoderma</i> spp. ....	23
2.2 Patogenia por fungos .....	25
2.2.1 Enzimas hidrolíticas e a virulência microbiana.....	27
2.2.2 Tolerância à temperatura humana como fator de virulência	31
2.3 Proteômica.....	32
2.3.1 Espectrometria de massas.....	33
2.3.2 Proteômica <i>shotgun</i> .....	34
2.3.3 Proteômica aplicada à micologia .....	36
3. OBJETIVOS .....	40
3.1 Geral .....	40
3.2 Específicos .....	40
4. METODOLOGIA .....	41
4.1 Cultivo fúngico .....	41
4.2 Ensaio qualitativos relacionados à patogenicidade .....	41
4.2.1 Protease .....	41
4.2.2 Fosfolipase .....	42
4.2.3 Urease .....	42
4.3 Quantificação de proteases e proteínas totais .....	42
4.4 Análise estatística .....	43
4.5 Obtenção do secretoma fúngico .....	44
4.6 Concentração, dessalinização das amostras e precipitação proteica	44
4.7 Extração e quantificação de proteínas .....	44

4.8 Eletroforese unidimensional .....	45
4.9 Coloração com Coomassie R-250 .....	45
4.10 Digestão proteica em solução .....	45
4.11 Dessalinização, concentração e quantificação de peptídeos .....	46
4.12 Análise por cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas sequencial (LC-MS/MS) .....	46
4.13 Análise de dados .....	47
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
5.1 Cultivo fúngico .....	49
5.2 Ensaio qualitativos relacionados à patogenicidade .....	53
5.2.1 Protease .....	53
5.2.2 Fosfolipase .....	54
5.2.3 Urease .....	55
5.3 Quantificação de proteases e proteínas totais .....	56
5.4 Análise estatística .....	58
5.5 Estudo proteômico .....	59
5.5.1 Obtenção dos secretomas fúngicos, concentração, dessalinização e precipitação das amostras .....	59
5.5.2 Análise da extração de proteínas .....	59
5.5.3 Eletroforese unidimensional .....	61
5.5.4 Análise diferencial dos cromatogramas .....	64
5.5.5 Identificação proteica .....	
5.5.6 Análise diferencial dos secretomas.....	72
5.5.7 Proteínas identificadas a 37°C relacionadas à patogênese.	77
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>82</b>

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	84
8. ANEXOS .....	103
8.1 Tabelas de proteínas identificadas nos secretomas dos fungos...	103
8.2 Cadastro SisGen .....	111

## 1. INTRODUÇÃO

Os fungos são organismos que desempenham um papel importante em diversos ecossistemas atuando como agentes decompositores e podem ser sapróbios, patógenos ou ambos (OLIVEIRA, 2009). Alguns organismos do Reino *Fungi* (i.e., fungos filamentosos e leveduras) são encontrados no meio ambiente ou participam da microbiota normal do ser humano, contudo, em certo momento são capazes de passar de sapróbios a patogênicos. Essa adaptação pode desencadear diversas doenças, principalmente, em pacientes imunocomprometidos (HUFFNAGLE & NOVERR, 2013).

*Trichoderma* e *Fusarium* são exemplos de fungos sapróbios com grande capacidade de adaptação (DELABONA et al., 2015). Caracterizam-se por serem ubíquos, embora sejam encontrados predominante no solo. Como são organismos tipicamente da natureza, se desenvolvem em temperatura ambiental e, na maioria das vezes, se nutrem com fonte de carbono a partir de matéria orgânica inanimada (CORABI-ADELL, 2005; MONTEIRO, 2012; LABORDE, 2014). Porém, há relatos na literatura da atuação patógena desses fungos em humanos (LEITE, 2012).

Sabe-se que existem mecanismos de adaptação os quais os fungos possuem para conseguirem se instalar e ocasionar doença ao ser humano. Alguns exemplos são: a produção de proteases, fosfolipases, ureases, adesinas e a capacidade de desenvolvimento a 37°C (FERRÃO-GONZALES et al., 2013). Esses mecanismos podem estar envolvidos tanto na defesa quanto na instalação dos microrganismos em seu hospedeiro. As proteases extracelulares são importantes por contribuir na degradação de proteínas envolvidas na integridade do tecido e imunidade do organismo. Já as fosfolipases e adesinas atuam, respectivamente, na invasão/adesão dos tecidos pela degradação de lipídios da membrana celular e aderência do microrganismo na célula. Enquanto que as ureases estão envolvidas, principalmente, na elevação do pH desfavorável e na lesão celular do hospedeiro (PESSOA et al., 2012; ANDREOLA et al., 2015).

Para explorar esses fatores, a proteômica surge como uma área que pode auxiliar na melhor compreensão da adaptação patogênica desses fungos. Dessa forma, a abordagem *Shotgun proteomics* permite a inferência de proteínas a partir de seus peptídeos e, conseqüente, pode possibilitar a descoberta de proteínas envolvidas nos processos e metabolismos dos fungos.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Fungos

A diversidade fúngica consiste em um grupo heterogêneo de microrganismos, podendo ser encontrado em diversos ambientes como a água, plantas, animais, estrume, alimentos, matéria orgânica em decomposição, ser humano e solo (OLIVEIRA, 2009).

Os organismos que compõem o reino *Fungi* são basicamente divididos pela capacidade de apresentar a forma filamentosa ou leveduriforme (KOOLEN, 2011). Estes são constituídos de uma parede celular rígida, possuem filamentos denominados de hifas, cujo conjunto destas (micélio) compõe a estrutura do fungo. Além disso, são eucariontes, heterotróficos, realizam um importante papel como decompositores nos mais variados ecossistemas, e podem ser sapróbios ou patógenos (OLIVEIRA, 2009; KOOLEN, 2011).

Os fungos têm uma nutrição bem diversificada, podendo utilizar substâncias simples, como por exemplo, fontes de carbono a partir de matéria orgânica inanimada para o seu desenvolvimento; como também podem nutrir-se de maneira mais complexas, sendo parasitas de hospedeiros vivos. São microrganismos bastante toleráveis, ao ponto de conseguir se desenvolver em condições ambientais extremas, como lugares com escassez de água ou alta pressão osmótica, por exemplo (LIU et al., 2015). Adicionalmente, estes produzem metabólitos, secretam proteínas e enzimas de interesse industrial e médico, podendo ser alvo de estudos em diversas áreas do conhecimento (KLITGAARD et al., 2014; MALACHOVÁ et al., 2014).

No Brasil, a região Amazônica destaca-se por apresentar uma grande biodiversidade, especialmente genética, a qual reflete em determinadas funções que esses microrganismos possam ter para sustentar o biosistema. Relatos na literatura mostram a importância e a necessidade de pesquisas sobre fungos nessa região, constituindo um universo relevante a ser explorado (LODGE, 1997; OLIVEIRA, 2009).

#### 2.1.1 Gênero *Fusarium* spp.

O gênero *Fusarium* spp. possui uma vasta distribuição em diversos ecossistemas, sendo encontrado predominantemente no solo ou junto a várias espécies de vegetais. Sua sobrevivência pode ser na forma saprofítica durante longos

períodos, se nutrindo de matéria orgânica presente no solo (MARTINS, 2005; MÜLLER, 2017).

As espécies do gênero *Fusarium* são caracterizadas por serem capazes de se disseminarem de forma rápida, causando assim grandes prejuízos em diversas culturas; sendo as sementes dos vegetais um dos principais veículos da propagação de doenças nas plantas. Logo, é essencial a identificação a nível de espécie para que as alternativas de controle biológico sejam direcionadas da melhor forma (MACIEL, 2016; WALKER et al., 2016).

Dentre as espécies existentes de maior importância, pode-se citar o *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, sendo o agente que provoca o mal-do-panamá em bananeiras; o *Fusarium oxysporum* f.sp. *glycines* responsável pela doença murcho-do-fusário em soja; o *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* e *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* também causadores de murcho de *fusarium*, porém em feijão e tomateiro, respectivamente. Além dessas espécies, o *Fusarium solani* também apresenta grande importância por causar a deterioração de fusário em *Citrus* sp., do caule em café e a podridão-radicular-vermelha em soja (LAZAROTTO, 2013).

Apesar de serem considerados fungos fitopatógenos, pode-se observar na literatura infecções humanas causadas por esse gênero, sendo denominadas fusariose. Um exemplo disso é demonstrado por MUHAMMED et al. (2013) num estudo realizado no Hospital Geral de Massachusetts, onde foram apontados 26 casos de fusariose, dentre elas a fusariose disseminada, fusariose cutânea e fusariose pulmonar, sendo a cutânea a mais ocorrente.

Ainda que a apresentação clínica da fusariose seja mais comum em pacientes imunocomprometidos, infecções como sinusite, pneumonia, tromboflebite, fungemia com ou sem envolvimento de órgãos, endoftalmite, artrite séptica, osteomielite ceratite e onicomicose podem se manifestar em indivíduos imunocompetentes, sendo essas duas últimas as mais frequentes (NUCCI & ANAISSIE, 2007; NUCCI & ANAISSIE; 2012)

A fim de buscar infecções causadas pelo gênero *Fusarium* spp., MUHAMMED et al (2013) realizou também uma revisão literária encontrando as mesmas fusariose citadas em seu estudo (fusariose disseminada, cutânea e pulmonar) como também outras formas de infecções desse gênero fúngico, como por exemplo, na cavidade nasal, peritonite e hepáticas, onde a espécie mais comumente isolada dessas infecções foi o *Fusarium solani*.

O fungo *Fusarium solani* é uma das espécies do gênero mais virulentas já descritas. Um estudo avaliou a virulência de 4 espécies de *Fusarium* em murinos imunocompetentes, sendo que *Fusarium solani* foi responsável pelo óbito de todos os animais testados com ele (MAYAYO et al., 1999; NUCCI & ANAISSIE, 2007). Em contrapartida, o resultado com as outras 3 espécies estudadas incluindo *Fusarium oxysporum*, *Fusarium verticillioides* e *Fusarium proliferatum* foi de 100% de sobrevivência dos animais infectados com tais fungos (MAYAYO et al., 1999; NUCCI & ANAISSIE, 2007).

Dessa forma, esses fungos possuem uma importância tanto como fitopatógeno quanto como patógenos para humanos, necessitando assim de maiores investigações sobre as espécies que acometem possíveis doenças ao homem (MEHL & EPSTEIN, 2007; MUHAMMED et al, 2013).

### **2.1.2 Gênero *Trichoderma* spp.**

O gênero de fungos filamentosos *Trichoderma* foi primeiramente descrito por Persoon em 1794 e hoje compreende um grupo de mais de 100 espécies identificadas por ferramentas de análise morfológica e molecular (SPECHT et al., 2014; LEONG et al., 2015; SEIDL et al., 2015; TAKAHASHI-NAKAGUCHI et al., 2015; YANG et al., 2015).

*Trichoderma* spp. são anamórficos e estão entre os fungos mais comumente distribuídos na natureza, sendo encontrados em ecossistemas que variam de tundra a tropicais, e a sua presença em diferentes substratos pode influenciar tanto na sua fisiologia quanto no desenvolvimento (RAMADA et al., 2016; DI COLOGNA, 2017; RODRIGUES et al., 2014).

Tais fungos respondem rapidamente às variações externas ambientais como a fonte de carbono e a temperatura, podendo regular seu crescimento, produção de conídios (esporos assexuados) e síntese de biomoléculas em geral (DI COLOGNA, 2017). As condições ótimas para propagação e esporulação variam entre as espécies, mas a maioria delas é classificada como mesófila, se desenvolvendo bem em pH entre 5,5 e 7,5, em temperatura entre 25° e 30°C e em agitação em torno de 150 rpm para o cultivo em meio líquido (SINGH et al., 2014).

A esporulação assexuada, ou conidiogênese, desse gênero é relacionada à sobrevivência e dispersão, as quais são guiadas por sinais como pH, lesões no micélio e presença de nutrientes. Esse processo é feito por vias relacionadas à

proteína quinase A dependente de AMP cíclico (cAMP-PKA), à proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) e às cascatas de sinalização mediadas pela proteína G (DI COLOGNA, 2017).

A capacidade desses organismos se desenvolverem nos mais variados *habitats* tem resultado na produção e descoberta de um grande número de enzimas, as quais têm sido bastante estudadas, devido à aplicabilidade em bioindústrias como a têxtil, de papel, de alimento e de bebidas, entre outras (GIRARD et al., 2013; DI COLOGNA, 2017). Além disso, análises genômicas do gênero *Trichoderma* têm demonstrado também sua capacidade em antagonizar, parasitar e matar fungos fitopatogênicos; promovendo assim, informações úteis na compreensão de interações de *Trichoderma* spp. com outros organismos tais como animais e plantas (RODRIGUES et al, 2014).

No entanto, já existem relatos na literatura que demonstram infecções causadas por esse gênero, sendo considerados patógenos humanos raros, porém, emergentes. Alguns exemplos são: sinusite invasiva alérgica e aguda, ceratite, otite externa, infecções cutâneas e subcutâneas, peritonite, pulmonares, endocardite e abscesso cerebral, em casos mais graves (SANDOVAL-DENIS et al, 2014). Em adição, pacientes diagnosticados com qualquer tipo de infecção causada por *Trichoderma* possuem um mal prognóstico, com uma média de 10 mortes entre 25 casos. Espécies como *Trichoderma citrinoviride*, *Trichoderma longibrachiatum* e *Trichoderma harzianum* já foram descritas como agentes de infecções humanas, sendo detectadas por meio de técnicas moleculares (KANTARCIOĞLU et al., 2009).

Apesar do maior número de casos serem diagnosticados com a presença de *Trichoderma longibrachiatum*, relatos envolvendo *Trichoderma harzianum* descrevem pacientes que evoluíram a óbito devido infecções ocasionadas por essa espécie (KANTARCIOĞLU et al., 2009). Segundo a literatura, o primeiro caso clínico com *Trichoderma harzianum* foi em um paciente imunocomprometido de 82 anos, que mesmo tratado com cetoconazol e flucitosina, teve um desfecho fatal (GUISERIX et al, 1996). Outro caso fatal foi relatado por ser uma infecção sistêmica tendo como agente *Trichoderma harzianum* (strain CBS 102174) que foi identificado em abscesso cerebral e pulmonar do paciente (GUARRO et al., 1999; SANDOVAL-DENIS et al., 2014).

Portanto, observa-se uma certa gravidade nas infecções causadas por fungos, como do gênero *Trichoderma*, em pacientes com algum grau de comprometimento

imune. Além disso, as oportunidades de um diagnóstico correto e precoce de infecções fúngicas invasivas são reduzidas, uma vez que os sintomas costumam ser atípicos e pouco específicos. Em tais circunstâncias, são indicadas técnicas mais complexas para detectar o agente, que muitas vezes possui resistência a uma gama de antifúngicos levando o paciente a óbito (KANTARCIOĞLU et al., 2009; SANDOVAL-DENIS et al., 2014).

## **2.2 Patogenia por fungos**

A maioria das espécies fúngicas se desenvolvem em temperaturas em torno de 25°C a 30°C, sendo que algumas demonstram características patógenas/opportunistas, podendo se propagar em temperaturas mais elevadas, o que possibilita o estabelecimento de infecções em seres humanos (MCCOTTER et al., 2016; VALLABHANENI et al., 2016).

Os locais anatômicos mais frequentemente acometidos em humanos são os olhos, unhas, cabelo e, especialmente, a pele, atingindo cerca de um quarto da população mundial (LOO, 2006, BALDIN et al., 2015). Além disso, a micologia tem aumentado de relevância para a área da saúde nos últimos anos, uma vez que as micoses têm evoluído de quadros rotineiros e previsíveis para situações clínicas mais complexas e muitas vezes de alto risco (NIELSEN & HEITMAN, 2007, BALDIN et al., 2015).

As doenças infecciosas causadas por fungos também contribuem consideravelmente para a morbidade e mortalidade humana (BALDIN et al., 2015). Apesar do número crescente de indivíduos que correm risco de desenvolver ou já apresentam alguma doença fúngica, essas infecções continuam sendo negligenciadas internacionalmente pelo sistema público e privado de saúde (GIACOMAZZI et al., 2016).

No Brasil, um país com uma população superior a 200 milhões de pessoas, nenhuma dessas infecções estão listadas como doenças oficialmente notificáveis. Tal situação dificulta a obtenção de dados epidemiológicos e oculta a real incidência de infecções fúngicas superficiais e/ou invasivas no país (GIACOMAZZI et al., 2016).

Estima-se que no Brasil mais de 3,8 milhões de pessoas sofrem com infecções graves causadas por fungos e ao redor do mundo em torno de 1,5 milhões de pessoas evoluem a óbito a cada ano por causa de micoses invasivas (GIACOMAZZI et al., 2016; BALDIN et al., 2015).

Alguns exemplos de doenças em humanos ocasionadas por fungos são: aspergilose, candidíase, coccidioidomicose, criptococose, histoplasmose, micetomas, esporotricose e paracoccidioidomicose. Adicionalmente, infecções causadas pelos gêneros *Aspergillus*, *Candida*, *Penicillium*, *Cryptococcus*, *Trichoderma*, *Histoplasma*, *Fusarium* e *Pneumocystis* têm se tornado mais frequentes (LOO, 2006; NIELSEN & HEITMAN, 2007).

Uma das principais explicações da patogenicidade desses fungos estaria associada à evolução dos fatores de virulência desses organismos, para permitir sua resistência à defesa e ao estresse do ambiente hospedeiro. Alguns desses determinantes de virulência incluem: transformações morfológicas, comutação genética induzida por processos metabólicos em resposta ao ambiente de acolhimento, produção de adesinas de superfície que se ligam às membranas celulares e componentes da parede celular que resistem à fagocitose, além de secretarem uma gama de enzimas que degradam os substratos hospedeiros (ARVANITIS et al., 2014).

Além disso, diversos microrganismos patogênicos/opportunistas usam o mecanismo de secreção de proteínas não somente para obter energia, mas também, para manifestarem suas características patogênicas e sobreviverem nas condições desfavoráveis em que o hospedeiro proporciona. De forma que, tais proteínas secretadas e a maquinaria utilizada na síntese dessas podem ser definidos como secretoma (MCCOTTER et al., 2016).

O secretoma compreende em torno de 30% do proteoma total do microrganismo, sendo que sua composição se modifica de acordo com as respostas aos estímulos do ambiente em que ele se encontra. Por essa razão, o secretoma de um fungo pode ser caracterizado de acordo com o seu comportamento; assim, sendo sapróbio, desenvolverá atividades fundamentais para sua sobrevivência na natureza, já se for patogênico, desempenhará mecanismos que o permitam propagar-se em um hospedeiro (HU et al., 2014; GILBERT et al., 2015).

Logo, analisar o secretoma de fungos se torna interessante, uma vez que a verificação das proteínas presentes no mesmo auxilia na melhor compreensão do comportamento fúngico em determinada condição submetida, quanto a possíveis características sapróbias ou patogênicas (GIRARD et al., 2013).

### **2.2.1 Enzimas hidrolíticas e a virulência microbiana**

As proteínas extracelulares secretadas por fungos, como fosfolipases, proteases e ureases têm um papel fundamental no sucesso da colonização e desenvolvimento das infecções causadas por esses agentes (FIGUEIREDO-CARVALHO et al, 2017). Para isso, algumas enzimas hidrolíticas participam de processos necessários para a instalação do microrganismo, incluindo adesão e invasão celular, capacidade de evasão do sistema imunológico e modulação de pH do ambiente hospedeiro (SARDI et al., 2015).

Enzimas, como as fosfolipases, têm um importante papel na virulência dos microrganismos e sua principal função está ligada à hidrólise de fosfolipídios (ALVES et al., 2017).

Os fosfolipídios, organizados em uma bicamada, constitui o tecido primordial da membrana celular, fornecendo barreira e estabilidade para a célula (REECE et al. 2011; OPENSTAX COLLEGE, 2013). As fosfolipases são enzimas que catalisam as ligações éster presentes nos fosfolipídios da membrana, sendo divididas em classes A, B, C e D (BUDZYŃSKA et al., 2014; DEEPA et al, 2015; BARMAN et al., 2018).

As Fosfolipases A são responsáveis por clivar os ésteres carboxílicos nas posições sn-1 (fosfolipase A1) ou sn-2 (fosfolipase A2) da estrutura do glicerol. As Fosfolipases B são consideradas enzimas multifuncionais com uma ampla especificidade de substrato possuindo três atividades catalíticas diferentes, incluindo uma atividade hidrolítica da ligação éster nas posições sn-1 e sn-2 dos glicerofosfolipídios; uma atividade lisofosfolipídica que resulta na liberação de ácidos graxos; e uma atividade transacilase para a síntese de fosfolipídios dos lisofosfolipídios. Já as fosfolipase C e D são fosfodiesterases, sendo que a C é responsável pela hidrólise de uma ligação glicerofosfato que liga o grupo da extremidade polar a um esqueleto de glicerol, resultando em diacilglicerol e trifosfato de inositol; e ainda a D catalisa a hidrólise de um grupo da extremidade polar, liberando grupos polares não fosforilados e o ácido fosfatídico (HAAS & STANLEY, 2007; BARMAN et al., 2018).

Processos como invasão e aderência celular são fundamentais para o sucesso da instalação do microrganismo no ambiente hospedeiro. A invasão consiste na infiltração e lesão da membrana externa da célula, sendo mediada, provavelmente, por mecanismos físicos e/ou enzimáticos (GHANNOUM, 2000)

Devido as fosfolipases hidrolisarem um dos principais constituintes químicos da membrana celular, os fosfolipídios, elas têm uma alta probabilidade de participarem do processo de clivagem membranar durante a invasão microbiana na célula hospedeira (GERALDINO et al, 2016). Estudos com microrganismos sugerindo a participação dessas enzimas na penetração, dano e clivagem celular já foram relatados para *Toxoplasma gondii*, *Entamoeba histolytica* e *Candida albicans*, por exemplo (SCHALLER et al, 2005).

Além disso, o processo de adesão celular também é um fenômeno biológico primordial para a patogênese microbiana. Devido à clivagem dos fosfolipídios membranares, sugere-se que as fosfolipases alterem características superficiais das células, auxiliando na aderência (NAVES et al., 2013). Contudo, os mecanismos exatos para o sucesso da aderência celular dos fungos ainda não são completamente esclarecidos, principalmente quando se trata da função das fosfolipases nesse processo. Porém, vale frisar que estudos relacionando essas enzimas com o processo de adesão celular já foram descritos (MANE et al., 2011; RICHARDSON, 2018)

Semelhantemente as fosfolipases, as proteases são enzimas que auxiliam os microrganismos a se estabelecerem em um hospedeiro. Isso porque são capazes de hidrolisar proteínas importantes tanto da matriz extracelular quanto do sistema imunológico, tendo relação com os processos de invasão/aderência celular e evasão imune (HARTMANN et al, 2016).

Após o primeiro contato do microrganismo com o hospedeiro, diversas vias regulatórias do sistema imune interagem para evitar/eliminar a infecção e reestabelecer a homeostase (MARSHALL et al., 2017).

No caso de infecções fúngicas, especificamente nas vias aéreas, as partículas do microrganismo são eliminadas pela ação do sistema complemento e pelas proteínas surfactantes, otimizando a fagocitose. No entanto, as proteases fúngicas são capazes de inibir essas defesas, interagindo com componentes do sistema complemento (YIKE, 2011).

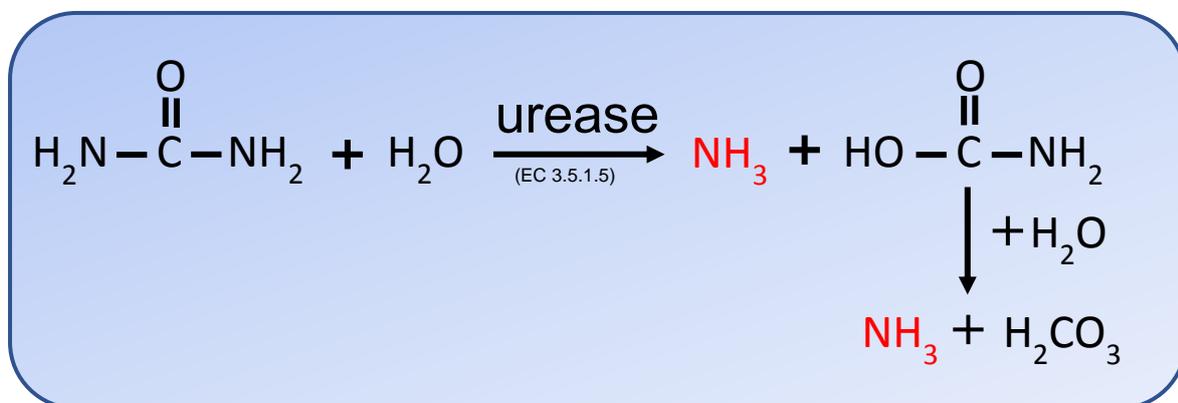
YIKE (2011) descreve relatos a respeito da evasão imune fúngica através da produção de proteases aspárticas secretadas (Saps) por *Candida* spp., onde uma das funções, dentro da patogênese, está ligada à degradação de componentes específicos do sistema complemento hospedeiro como C3b, C4b e C5, e na impossibilidade de formação do complexo de ataque à membrana (TCC). Além disso,

as Saps também podem atingir outros substratos como albumina, imunoglobulina e proteínas da matriz extracelular, atuando nos processos não só de evasão imune, mas também na invasão tecidual (SILVA-ROCHA et al, 2015).

Outro exemplo que auxilia no desenvolvimento das infecções fúngicas são as proteases alcalinas. BEHNSEN et al. (2010) e RAMBACH et al. (2010) descreveram, respectivamente, a participação de protease alcalina de *Aspergillus fumigatus* na degradação de componentes do sistema complemento e na redução de receptores de CR3 em aspergilose cerebral, tornando a doença mais letal.

Os microrganismos também podem sintetizar e secretar ureases, permitindo a utilização da ureia como fonte de nitrogênio e, em determinados casos, colaboram como fator de virulência para infecções em humanos. Diversos fungos produzem essas enzimas, incluindo *Cryptococcus neoformans*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii* e espécies de *Trichosporon* e *Aspergillus* (FEDER et al, 2015).

A ureia, substrato das ureases, está presente em várias localidades do organismo humano, incluindo sistema nervoso central, soro sanguíneo, tecido adiposo subcutâneo e fluido de revestimento epitelial. Alguns microrganismos, incluindo fungos e bactérias, produzem ureases hidrolisadoras de ureia, cuja reação resulta em amônia e ácido carbâmico, sendo este último clivado espontaneamente em ácido carbônico e gerando uma molécula adicional de amônia (Figura 1). Essas moléculas estão em equilíbrio, porém em circunstâncias fisiológicas, o efeito líquido dessas reações resulta na elevação do pH local (MOBLEY et al., 2011; MORA & ARIOLI, 2014).



**Figura 1.** Reação da enzima urease hidrolisando a ureia, resultando em amônia e ácido carbônico (adaptado de MORA & ARIOLI, 2014).

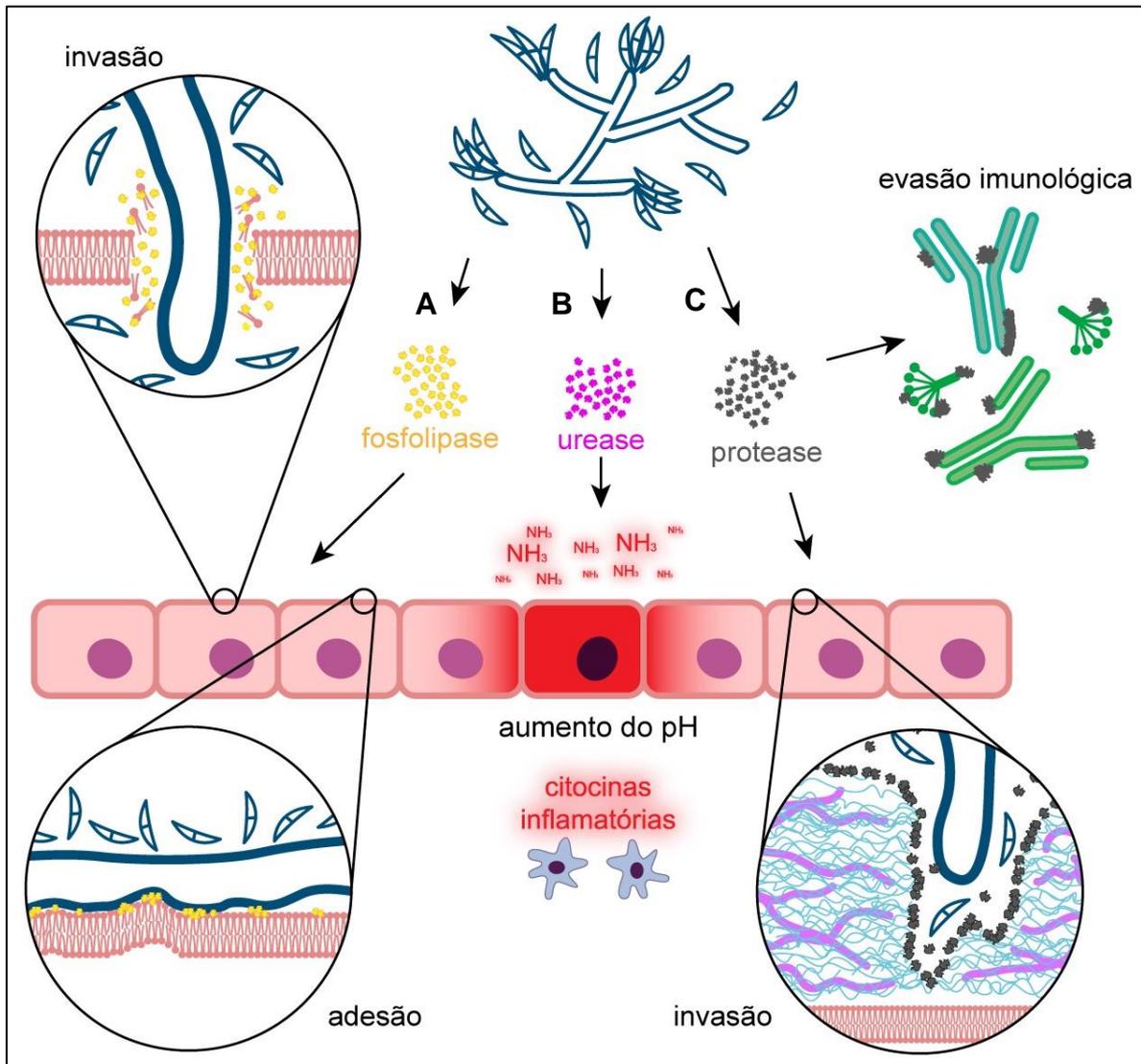
Em algumas doenças, essa modulação do pH no ambiente hospedeiro é fundamental para a sobrevivência do agente infeccioso. Em casos como infecções ocasionadas por *Helicobacter pylori*, as ureases atuam para tornar o ambiente gastroduodenal mais alcalino e propício para sua instalação e desenvolvimento, progredindo com futuras lesões ao hospedeiro (UBERTI, 2010; RUTHERFORD, 2014).

Além disso, estudos com fungos como *Cryptococcus neoformans* e *Coccidioides posadasii* propõem que variações de pH ocasionadas por ureases também estão relacionadas à evasão do sistema imunológico e que o dano causado pela amônia em células hospedeiras promove a doença sistêmica (RUTHERFORD, 2014).

OSTERHOLZER et al. (2009) observaram que camundongos infectados com *Cryptococcus neoformans*, produtores de ureases, demonstravam resposta imune do tipo T *helper* 2 (Th2), apresentando níveis mais altos de Imunoglobulina E (IgE) sérica, citocinas Th2 e macrófagos alternativamente ativados em comparação com camundongos controles infectados com uma cepa negativa para urease. Com isso, uma resposta do hospedeiro Th2 também pode fornecer ao patógeno uma molécula de ureia adicional proveniente do hospedeiro, uma vez que os macrófagos alternadamente ativados convertem a arginina em ornitina e ureia; resultando em mais dano tecidual para o hospedeiro (GORDON, 2003, MAY et al, 2016).

Em adição, outras funções dessa enzima já foram descritas como ativação de plaquetas, atividade pró-inflamatória e ativação de neutrófilos, que contribuem potencialmente para a patogênese (FEDER et al, 2015).

Sendo assim, o conjunto de enzimas hidrolíticas secretadas por um microrganismo é essencial para o sucesso de sua instalação, colonização e desenvolvimento da infecção (Figura 2). Por essa razão, estudá-las auxilia na compreensão da interação patógeno-hospedeiro, o que pode ser benéfico tanto para futuros diagnósticos quanto para possíveis tratamentos de doenças causadas por estes organismos (GHANNOUM, 2000; RUTHERFORD, 2014).



**Figura 2.** Representação esquemática da ação de enzimas hidrolíticas secretadas por fungos para estabelecer a infecção. **(A)** Ação das fosfolipases no processo de invasão e adesão celular, atuando especificamente nos fosfolípidios presentes na membrana plasmática. **(B)** Atividade enzimática das ureases hidrolisando a ureia e resultando na liberação de amônia, a fim de modular o pH desfavorável para o desenvolvimento fúngico, ocasionando a lesão tecidual. **(C)** Proteases atuando tanto em proteínas da matriz extracelular para invasão tecidual quanto em imunoglobulinas e componentes do sistema complemento para evasão imune do fungo.

### 2.2.2 Tolerância à temperatura humana como fator de virulência

Dentre as milhares de espécies de fungos catalogadas, apenas um pequeno número é patógeno para humanos, comparado com infecções fúngicas em plantas, insetos e anfíbios. Isso porque a endotermia dos seres humanos é um fator crucial para a maioria dos fungos não conseguirem desenvolver características patogênicas no indivíduo (ROBERT & CASADEVALL, 2009, KIBBLER et al, 2017).

Porém, infecções causadas por espécies de alguns gêneros como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Trichoderma* (fungos comumente encontrados no solo) têm se mostrado mais frequentes nos últimos anos. Isso pois a quantidade de indivíduos imunocomprometidos têm aumentado significativamente, devido alguns fatores como, por exemplo: o aumento de transplante de órgãos, pessoas com câncer e/ou com o vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (KAUFFMAN et al., 2014; DOS SANTOS et al., 2016; VALLABHANENI et al., 2016; DENNING & CHAKRABARTI., 2017).

Tal característica sugere que esses fungos, mesmo tendo desenvolvimento ótimo em condições ambientais, possuem características que mostram resistência a endotermia dos seres humanos (PEDROSO, 2008; POESTER et al, 2015). Com isso, eles possuem a capacidade de se desenvolverem em temperaturas mais elevadas, como é o caso da temperatura corpórea de um indivíduo (~37°C), podendo apresentar mecanismos de adaptação capazes de causar infecções (BEYHAN et al, 2013; RICHARD et al, 2014; YANG et al, 2017).

Com relação a esses mecanismos, a expressão da classe de proteínas de choque térmico (*Hsp*) tem sido relatada. Essas proteínas auxiliam a célula, que foi submetida a uma temperatura mais elevada, a sintetizar e maturar proteínas que irão substituir aquelas que foram danificadas pelo estresse ocasionado. Também tem como função auxiliar na identificação de proteínas degradadas irreversivelmente, encaminhando-as para um sistema proteolítico adequado e ajudando assim a eliminar proteínas que não são mais úteis à célula. Além disso, tem um papel importante na inibição da apoptose e no processo de viabilidade celular naquele ambiente hostil que o microrganismo se encontra (CASTRO et al, 2014).

### **2.3 Proteômica**

A proteômica por definição é um conjunto de técnicas utilizadas para estudar o proteoma de um determinado organismo, verificando como ele se comporta as mudanças temporais e/ou as diversas condições que é submetido. Enquanto que o proteoma pode ser entendido como um conjunto de proteínas que são expressas por uma célula, órgão, tecido ou até mesmo fluidos biológicos. Essas proteínas que compõe o proteoma de um organismo são essenciais para a vida, participando em quase todos os processos celulares e moleculares (AQUINO, 2012; ALMEIDA et al., 2017).

De forma geral, essa abordagem permite identificar e acompanhar a expressão de proteínas específicas quando o organismo é submetido à determinada condição, analisar interações entre proteínas de um complexo biológico e verificar modificações pós-traducionais. Neste sentido, possibilita a observação de possíveis padrões proteicos abundantes e/ou distintos que podem ter relação a fatores ecossistêmicos ou, até mesmo, patogênicos (EMIDIO et al., 2016).

No entanto, estudar o proteoma de um organismo tem os seus desafios, uma vez que o mesmo possui uma grande flexibilidade, podendo ser modificado de acordo com a condição em que é submetido. Devido isso, as ferramentas proteômicas têm sido cada vez mais aprimoradas, pois com tais análises podem surgir informações interessantes e complementares à análise genômica (NOGUEIRA & DOMONT, 2014).

Existem várias ferramentas que auxiliam no esclarecimento das proteínas expressas por um organismo. Dentre elas pode-se citar as técnicas de separação proteica e/ou peptídica, como: a cromatografia líquida e a eletroforese unidimensional ou bidimensional, que auxiliam na diminuição da complexidade de determinada amostra; e as de elucidação e identificação tais como: a espectrometria de massas e a bioinformática, que em conjunto possibilitam a inferência e quantificação de proteínas presentes na amostra (CHIARADIA et al., 2008; DI COLOGNA, 2017).

### **2.3.1 Espectrometria de massas**

A espectrometria de massas é uma ferramenta analítica que tem sido bastante utilizada em estudos de larga escala, possuindo a capacidade de gerar íons em fase gasosa, estabelecendo uma posterior separação de acordo com a razão massa/carga ( $m/z$ ) de cada íon; o que possibilita uma identificação tanto qualitativa quanto quantitativa. O equipamento empregado para essa análise é o espectrômetro de massas, que apresenta uma alta sensibilidade, resolução, precisão e acurácia. De maneira geral, é dividido em uma fonte de ionização, analisador de massas e detector de íons, sendo auxiliado também por um instrumento computacional para adquirir os dados resultantes da análise (Figura 3) (CANTÚ et al., 2008; YATES et al., 2009).

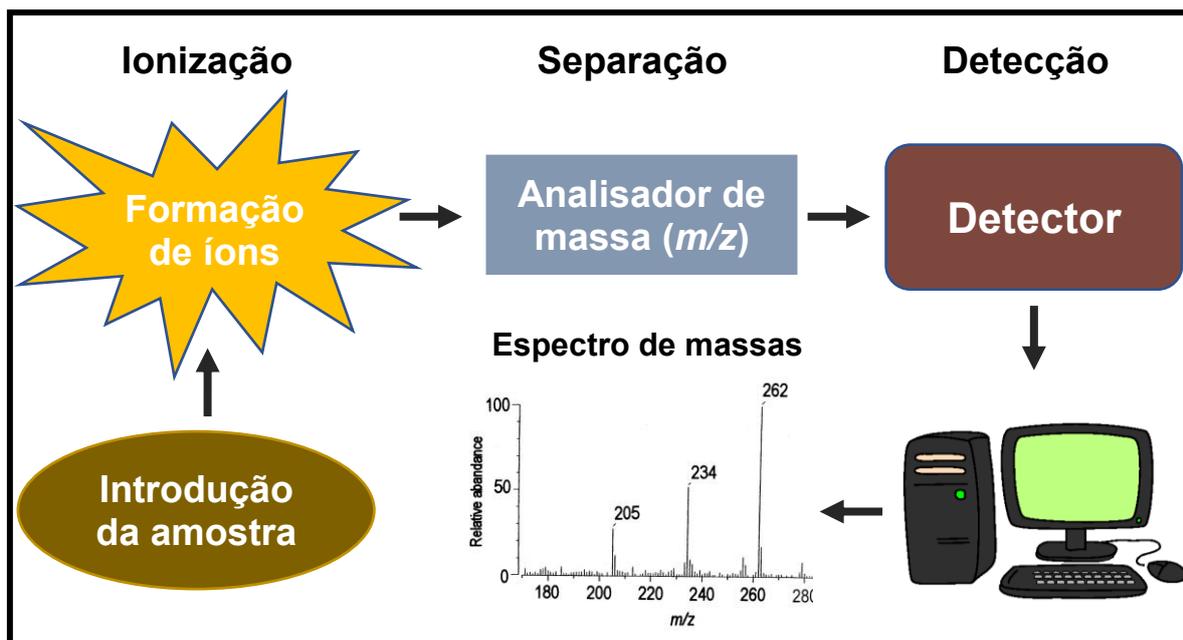


Figura 3. Esquema ilustrativo de um espectrômetro de massas.

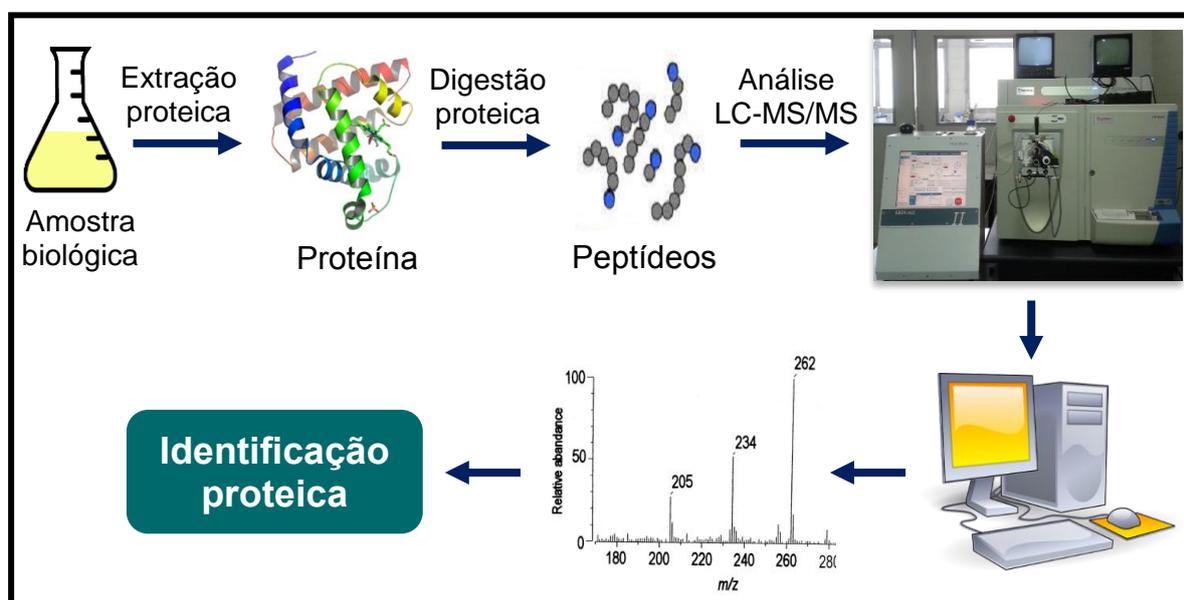
Dentre as fontes de ionizações mais empregadas para o estudo de biomoléculas, tem-se o MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*) e o *Electrospray* (ESI), que realizam a ionização da amostra de maneira branda, conseguindo preservar a integridade da estrutura polipeptídica (TANAKA et al., 1988; FENN et al., 1989). Já os analisadores de massas têm como função separar os íons pelas suas razões massa/carga. Alguns exemplos dos mais utilizados para essas análises são: o quadrupolo, *ion-trap*, tempo de voo (TOF-*time-of-flight*), orbitrap e o FT-ICR (*Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*), sendo que podem ser usados de forma independente ou em conjunto entre si (equipamentos híbridos), para fazer uso das vantagens de cada analisador. Posteriormente, todas as informações obtidas são encaminhadas ao detector, onde o sinal da corrente de íons presente na amostra é detectado, amplificado e transmitido para o sistema de processamento de dados. O tipo de detector depende do analisador, mas geralmente os mais empregados são os fotomultiplicadores (ARDREY 2003; MELANI, 2016).

### 2.3.2 Proteômica *shotgun*

Com o avanço das diversas técnicas, três abordagens principais se destacam para o estudo de proteínas, as quais são: *top-down*, *middle-down* e *bottom-up* (SALVATO, 2010; PETRAS et al., 2015).

A abordagem *top-down* consiste na análise da amostra a partir das proteínas intactas, sendo estas inseridas no espectrômetro de massas sem nenhum processo de clivagem durante o preparo de amostra. Em contrapartida, a *middle-down* realiza a identificação das proteínas por meio de seus peptídeos, onde estes possuem uma cadeia de aminoácidos longa. Adicionalmente, tem-se a abordagem *bottom-up*, a qual infere as proteínas de determinada amostra também por meio dos peptídeos resultantes de uma digestão proteolítica, contudo, esses peptídeos apresentam uma cadeia de aminoácidos mais curta (GILLET et al., 2016; MELANI, 2016).

A abordagem *bottom-up*, especificamente a *shotgun proteomics*, é realizada por meio da extração de proteínas de um sistema biológico complexo, as quais são digeridas por enzimas como a tripsina (mais comumente utilizada), e resultam em peptídeos. Técnicas cromatográficas podem ser empregadas para o fracionamento de acordo com as propriedades físico-químicas desses peptídeos e então, serem analisados no espectrômetro de massas. Os dados provenientes dessa análise são submetidos a ferramentas proteômicas computacionais que fazem a identificação e quantificação dos peptídeos e, conseqüentemente, das proteínas presentes nas amostras (Figura 4) (CARVALHO et al., 2010; ZHANG et al. 2013; DONNARUMMA & MURRAY, 2016).



**Figura 4.** Esquema ilustrativo da análise por *Shotgun proteomics*.

De forma geral, a abordagem *shotgun proteomics* tem sido bastante utilizada em estudos de larga escala, demonstrando resultados satisfatórios e tornando-se um caminho para esclarecer o conteúdo proteico expresso por organismo, sendo ele

humano, animal, vegetal ou até mesmo microbiológico (ZHANG et al., 2013; RAUNIYAR & YATES, 2014).

### 2.3.3 Proteômica aplicada à micologia

A proteômica pode ser aplicada em diversas áreas, inclusive aos estudos com fungos. Grande parte das pesquisas com esses microrganismos estão voltadas para a elucidação do proteoma total, incluindo o esclarecimento de proteínas extracelulares presentes nos secretomas de fungos. Isso porque os processos biológicos executados por tais organismos, seja relacionado ao parasitismo, saprofitismo ou interação com algum hospedeiro, estão diretamente ligados às habilidades de secretar proteínas e enzimas para o ambiente extracelular (DI COLOGNA, 2017; OLIVEIRA & ROCHA, 2017).

Nesse contexto, realizar análises proteômicas para tentar elucidar mais detalhadamente os secretomas de fungos pode revelar aplicações nas áreas clínica, agrícola, biotecnológica e/ou industrial. Estudos proteômicos com o gênero *Trichoderma* e *Fusarium* estão concentrados principalmente na área agrícola e biotecnológica (YANG et al, 2009; HERMOSA et al., 2010; YANG et al., 2013; JI et al, 2013). Algumas espécies de *Trichoderma* têm sido estudadas como agente de biocontrole; um exemplo disso é o estudo de Yang et al. (2009) que demonstrou esse potencial de *Trichoderma harzianum* ETS 323 frente ao fungo fitopatogênico *Botrytis cinérea*, utilizando ferramentas proteômicas. Tal estudo revelou proteínas relacionadas à degradação da parede celular fúngica que estão diretamente relacionadas ao mecanismo de biocontrole frente a fungos fitopatógenos, incluindo endoquitinases,  $\beta$ -1,3-glucanases,  $\beta$ -1,6-glucanases, quitinases e proteases (YANG et al, 2009).

Adicionalmente, as ferramentas proteômicas também têm auxiliado em estudos com o gênero *Fusarium*, principalmente na melhor elucidação de sua interação com plantas, pois algumas de suas espécies são fitopatogênicas (YANG et al., 2013; JI et al., 2013). O estudo de JI et al. (2013) revelou, por meio da proteômica *shotgun*, proteínas presentes no secretoma do fungo fitopatogênico *Fusarium graminearum*. Proteínas estas que ainda não foram caracterizadas, mas que tem função relacionada ao processo de hidrólise de xilana, celulose e hemicelulose, indicando grande potencial na degradação de componentes da célula vegetal,

incluindo a parede celular; podendo assim, desempenhar papéis extracelulares importantes durante a infecção causada por esse fungo nas plantas (JI et al, 2013).

A proteômica também está presente em estudos na área da micologia médica, onde tem mostrado resultados promissores no entendimento entre a interação dos fungos com o seu hospedeiro durante o processo infeccioso (CHAMBERGO & VALENCIA, 2016; KIM, 2016, PIGOSSO, 2016). Um exemplo disso foi o estudo de PIGOSSO (2016) que fez uma análise transcriptômica e proteômica de *Paracoccidioides brasiliensis* após 6 horas de infecção em células pulmonares de murinos. Seus resultados revelaram que o microrganismo, no início da infecção, remodela o seu metabolismo de carbono, utilizando preferencialmente lipídios, para sobreviver no interior do hospedeiro. Além disso, também observaram a secreção de uma serina proteinase no tecido pulmonar após 6 h de infecção, provavelmente permitindo a invasão tecidual para sua instalação no pulmão (PIGOSSO, 2016).

Inicialmente, análises do perfil proteico de secretomas fúngicos eram realizadas apenas em eletroforese bidimensional (2-DE), com a assimilação dos *spots* resultantes a certas proteínas, de acordo com os pontos isoelétricos e massas moleculares mediante o uso de *software* específicos (DI COLOGNA, 2017). Exemplos de trabalhos utilizando essa técnica, tem-se o DE GODOY et al. (2014) e CORREA (2009), os quais avaliaram o perfil proteico do secretoma dos fungos *Conidiobolus lamprauges* e *Cryptococcus gattii*, respectivamente, em diferentes temperaturas. Nesses estudos foram possíveis verificar mudanças entre os perfis, sugerindo que tais fungos produzem proteínas específicas que auxiliam na instalação no hospedeiro humano (CORREA, 2009; DE GODOY et al, 2014).

No entanto, a análise por eletroforese 2-DE possui algumas limitações, principalmente relacionadas à reprodutibilidade e quantificação; sendo atualmente complementada ou substituída com ferramentas mais sensíveis, acuradas e quantificáveis, como a espectrometria de massas (JAISWAL et al, 2015). Uma pesquisa realizada por SCHNEIDER et al (2012) demonstrou, por meio da espectrometria de massas, proteínas presentes no secretoma de *Paracoccidioides brasiliensis*, um fungo causador da micose sistêmica Paracoccidioidomicose. Tais proteínas incluem enzimas antioxidantes, proteínas de choque térmico, relacionadas ao metabolismo energético, de sinalização celular e adesinas que estão relacionadas ao processo de nutrição, desintoxicação do ambiente celular, evasão do sistema imunológico do hospedeiro e virulência desse fungo (SCHNEIDER et al, 2012).

Outro estudo aplicando a espectrometria de massas, mais especificamente a *shotgun proteomics*, é o de RODRIGUES et al. (2014) mostrando a presença de proteínas com atividades imunológicas e patogênicas nas vesículas extracelulares dos patógenos humanos *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum* e *Paracoccidioides brasiliensis*; interferindo assim, na atividade de células efectoras imunes do hospedeiro e aumentando a patogênese fúngica.

Além disso, também por meio de técnicas proteômicas, FERNANDEZ-ARENAS et al. (2007) demonstraram alterações proteicas nas células de levedura de *Candida albicans* devido ao confronto de macrófagos. Eles revelaram que a abundância de chaperonas e proteínas desintoxicantes relacionadas ao estresse, aumentou com a interação com macrófagos, indicando um potencial para evasão imune promovida pela *Candida albicans* (FERNANDEZ-ARENAS et al., 2007).

Portanto, de forma geral, o presente trabalho pode ser justificado pelos seguintes fatores:

- ❖ Os fungos dos gêneros *Trichoderma* spp. e *Fusarium* spp. são considerados fungos sapróbios, no entanto existem relatos de casos de infecções humanas causadas por eles.

- ❖ Nos últimos anos, a micologia tem aumentado de relevância para a área da saúde, uma vez que as micoses têm evoluído de quadros rotineiros e previsíveis para situações clínicas mais complexas e muitas vezes de alto risco (BALDIN et al., 2015).

- ❖ As espécies estudadas neste trabalho - *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) e *Fusarium solani* (CFAM 1313) - isoladas da água de consumo da comunidade Lago do Limão, no município de Iranduba (Amazonas), demonstraram em um estudo anterior (LIMA et al. 2017) a capacidade de crescimento a temperatura de 37°C; sugerindo assim, uma possível adaptação de caráter oportunista para humanos e que pode ser prejudicial aos habitantes daquela comunidade.

- ❖ A proteômica aplicada a fungos, em especial na área médica, tem se tornado uma ferramenta interessante para contribuir no melhor entendimento de algumas infecções em humanos, bem como os possíveis fatores de virulência.

- ❖ No Amazonas, estudos envolvendo a caracterização em larga escala de biomoléculas, como as proteínas, utilizando novas técnicas de análise e relacionados ao potencial patogênico ou biotecnológico dos microrganismos são pioneiros;

necessitando ser alavancados na Região, principalmente frente à grande biodiversidade existente.

❖ Além disso, o estudo do secretoma desses microrganismos pode ajudar também no entendimento a nível molecular sobre a capacidade desses fungos de se consolidarem no hospedeiro, causando alguma doença; o que pode auxiliar tanto para futuros diagnósticos quanto para possíveis tratamentos da doença (OLIVEIRA & ROCHA, 2017).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

- Investigar o perfil proteico dos fungos *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) e *Fusarium solani* (CFAM 1313), através de ferramentas proteômicas para analisar os processos moleculares e suas características patogênicas.

#### 3.2 Específicos

- Analisar mudanças morfofisiológicas dos fungos quando cultivados a 28°C e 37°C;
- Verificar fatores de virulência em *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) e *Fusarium solani* (CFAM 1313);
- Determinar o tempo de maior produção proteica dos fungos para a análise proteômica;
- Analisar e comparar o secretoma de *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) e *Fusarium solani* (CFAM 1313) quando submetidos às temperaturas de 28°C e 37°C;
- Buscar proteínas que possam estar associadas à patogenicidade desses fungos.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Cultivo fúngico

As espécies fúngicas estudadas nesse trabalho foram: *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) e *Fusarium solani* (CFAM 1313), cuja atividade de acesso ao Patrimônio Genético foi cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), sob número de cadastro A93C32F. Tais culturas são provenientes da água de consumo da comunidade Lago do Limão situada em Iranduba (52,4 km de Manaus), no Amazonas; e também estão depositadas na coleção de fungos da Amazônia (CFAM) do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD). Essas culturas fúngicas foram reativadas em meio de cultura extrato de malte (peptona, dextrose, extrato de malte, ágar e água destilada) e autenticadas de acordo com as suas características morfofisiológicas. É importante frisar que tais microrganismos também já haviam sido identificados por técnicas moleculares (LIMA et al, 2017).

Posteriormente, os fungos foram submetidos a uma avaliação macroscópica, por meio da observação da macrocolônia em placa de Petri ( $\varnothing=90\text{mm}\times 15\text{mm}$ ); sendo feita também uma análise comparativa de crescimento das colônias ao longo de 7 dias, frente às temperaturas de 28°C e 37°C. Por conseguinte, os fungos foram analisados microscopicamente, através de lâminas provenientes da técnica de microcultivo, utilizando o microscópio *Leica Microsystems* (DM 1000) tanto na temperatura de 28°C quanto na de 37°C, a fim de verificar as diferenças demonstradas por cada colônia quando submetidas a essas condições.

### 4.2 Ensaios qualitativos relacionados a patogenicidade

#### 4.2.1 Protease

O meio de cultura utilizado para esse ensaio foi o ágar leite, suplementado com gelatina a 5% (gelatina em pó, leite desnatado, ágar e água destilada) (TEIXEIRA et al, 2011). Nesse ensaio, os fungos foram repicados em um ponto central em duas placas de Petri ( $\varnothing=90\text{mm}\times 15\text{mm}$ ) distintas, sendo submetidos a 37°C por 72 horas. A positividade do teste é visualizada por meio de um halo translúcido formado ao redor da colônia fúngica.

#### 4.2.2 Fosfolipase

O meio de cultura utilizado para esse ensaio foi o ágar gema de ovo (dextrose, peptona, cloreto de sódio, cloreto de cálcio, ágar, emulsão de gema de ovo e água destilada). Para esse teste, o secretoma coletado de cada fungo a cada 24 horas foi utilizado para a detecção da produção de fosfolipases. Foram feitos 3 poços com diâmetro de 9 mm em cada placa de Petri contendo o meio de cultura, e foi adicionada em cada poço uma alíquota de 100µL do referido secretoma para ambos os fungos; sendo as placas armazenadas a 37°C por 72 horas. A positividade do teste ocorre mediante a visualização de um halo formado ao redor do poço com o secretoma fúngico e a atividade da enzima foi obtida pela seguinte fórmula:

$$Pz = \frac{\text{diâmetro da colônia}}{\text{diâmetro da colônia} + \text{zona precipitada}}$$

Onde Pz se refere a atividade enzimática.

Quando o resultado dessa razão é igual a 1, a atividade é negativa; se for entre 0,64 e 0,99 a atividade é positiva e ainda se expressar um número menor ou igual a 0,63, a ação enzimática é considerada fortemente positiva (PRICE et al, 1982).

#### 4.2.3 Urease

O meio de cultura utilizado para esse ensaio foi o ágar Christensen (fosfato monobásico, dextrose, vermelho de fenol, ágar, ureia e água destilada). Este foi preparado em tubos de ensaio e os fungos foram repicados e submetidos a temperatura de 37°C, sendo acompanhados durante 7 dias. A positividade do teste ocorre através da alteração da cor do meio de cultura, devido à mudança no pH de ácido para básico. Tal fato se deve a ureia presente no meio, a qual é degradada pela enzima urease liberada pelo microrganismo tendo como principal resultado a amônia. Esta ao ser formada alcaliniza o pH, que é indicado pelo vermelho de fenol, fazendo com que o meio antes amarelo se torne rosa (LIMA et al, 2017).

### 4.3 Quantificação de proteases e proteínas totais

Inicialmente, foi realizado um inóculo a uma concentração final de  $2,2 \times 10^5$  esporos/mL em erlenmeyers distintos contendo meio de cultura extrato de malte. Para uniformizar essa concentração final de cada fungo, a contagem de esporos foi feita com o auxílio da câmara de Neubauer, empregando o *software* CALIBRA®.

Posteriormente, para a quantificação de protease foi realizada uma suspensão de conídios em água destilada e transferiu-se o equivalente a  $2,2 \times 10^5$  esporos/mL

para os erlenmeyers contendo meio de cultura extrato de malte, sendo o experimento realizado em duplicata biológica. A fermentação submersa ocorreu em 100 mL de meio de cultura sob agitação de 150 rpm, a 37°C, sendo o fungo *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) acompanhado durante 216 horas e o *Fusarium solani* (CFAM 1313) até 168 horas. A quantificação de proteases foi realizada a cada 24 horas, retirando duas alíquotas de cada erlenmeyer, a fim de verificar o melhor tempo de produção proteica de cada fungo.

Para isso, a biomassa foi separada do secretoma mediante uma filtração a vácuo utilizando uma membrana em éster de celulose (MCE) (FilterPro®), com 0,45µm de porosidade. Com o intuito de determinar uma curva de produção de proteases, os secretomas obtidos foram submetidos a uma avaliação quantitativa utilizando a caseína como substrato, em tampão fosfato 0,15 M, conforme descrito por OBATA et al. (1977). Resumidamente, foi adicionado 0,5 mL de cada secretoma em uma solução contendo 1,5 mL de caseína (2,0%) e 1,0 mL de tampão fosfato (0,15 M pH 7,5). Em seguida, a solução enzimática foi incubada a temperatura ambiente por 30 minutos, com ausência de luz. A reação foi paralisada pela adição de 3,0 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 0,4 M em cada amostra. Por fim, as amostras foram centrifugadas à 4 °C por 20 minutos a 4000 rpm e a absorbância foi determinada a 280 nm no espectrofotômetro BioDrop®. A fim de determinar o maior tempo de produção de proteases, utilizou-se a seguinte fórmula para inferir a atividade proteolítica (FLEURI & SATO 2008; DE SOUZA 2015):

$$U/mL = [(X / 0,01) * 1000] / 500$$

Onde X se refere a absorbância lida a 280nm

Já a quantificação de proteínas totais presentes em cada secretoma foi realizada por meio do ensaio fluorimétrico *Qubit*® 3.0 (*Invitrogen*), de acordo com as instruções do fabricante, com as alíquotas obtidas a cada 24 horas, como descrito anteriormente.

#### 4.4 Análise estatística

A determinação do maior tempo de produção proteica dos fungos foi feita mediante a análise estatística utilizando o Programa R® e o programa *GraphPad Prism* 7. Para isso, foi empregada a análise de variância (ANOVA), utilizando o pós teste de Tukey considerando o *p*-valor ≤0,05 (TUKEY, 1949; DE SOUZA et al, 2015), a fim de

verificar a diferença mínima significativa entre os tempos de produção proteica analisados. Vale frisar que nessa análise foi levado em consideração tanto os valores resultantes da quantificação de proteases quanto de proteínas totais.

#### **4.5 Obtenção do secretoma fúngico**

Após a determinação do melhor tempo de produção proteica de cada fungo, foi realizado um novo inóculo com uma concentração final novamente de  $2,2 \times 10^5$  esporos/mL em erlenmeyers distintos, sendo o experimento realizado em triplicata biológica. Posteriormente, os fungos foram submetidos à fermentação submersa nas condições de 150 rpm tanto na temperatura de 37°C quanto na de 28°C. Cada erlenmeyer foi retirado de acordo com o tempo determinado no item 4.4. O micélio fúngico foi separado do secretoma por meio de filtração a vácuo com uma membrana em éster de celulose (MCE) (FilterPro®), com 47 mm de diâmetro e 0,45µm de porosidade. Na sequência, tais secretomas foram submetidos a outra filtragem complementar usando filtros de seringa com membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (Whatman®) com porosidade de 0,22µm.

#### **4.6 Concentração, dessalinização das amostras e precipitação proteica**

Os secretomas resultantes da etapa anterior foram concentrados e dessalinizados utilizando tubos de filtração *Centriprep*® com membranas de celulose de 3,0 kDa, os quais foram submetidos a centrifugações sucessivas por 90 minutos, a 4°C e 3,000 rcf.

As proteínas presentes nas amostras foram precipitadas com ácido tricloroacético diluído em acetona gelada pura, utilizando uma proporção de 1:0,4 (secretoma/solvente) em cada amostra (CORREA, 2009). Posteriormente, foi realizado um vórtex por alguns segundos e as amostras ficaram *overnight* a 4°C. No dia seguinte, foram submetidas à centrifugação a 14000 rpm por 30 minutos a 4°C, descartando-se o sobrenadante. Então, o precipitado formado foi lavado duas vezes com acetona gelada pura, em uma proporção de 1:2 (precipitado/solvente), realizando uma centrifugação a 14000 rpm durante 15 minutos a 4°C em cada lavagem.

#### **4.7 Extração e quantificação de proteínas**

A extração de proteínas foi realizada com 80 µL do reagente *RapiGest*® (Waters) a uma concentração de 0,1% (p/v) preparado com bicarbonato de amônio

(NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) a 50,0 mM para cada amostra. Em seguida, foi feita uma agitação por alguns segundos e uma centrifugação de baixa intensidade (“*spin down*”) em cada amostra. A quantificação de proteínas foi obtida através do ensaio fluorimétrico Qubit® 3.0 (*Invitrogen*), de acordo com as instruções do fabricante.

#### 4.8 Eletroforese unidimensional

Trinta microgramas (30µg) de proteínas de cada amostra foram usados para a eletroforese unidimensional. O volume correspondente a essa quantidade de proteínas foi diluído no tampão de amostra Laemmli [2x] contendo Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, SDS 10%, glicerol 20%, β-mercaptoetanol 10% e azul de bromofenol a 1%. Posteriormente, as amostras foram incubadas em banho seco a 100°C durante 5 minutos. Dez microlitros (10 µL) de marcador molecular com padrões pré-corados (n.º catálogo 161-0363, Biorad®) também foi utilizado. O gel de poliacrilamida foi preparado a 15% (Gel de corrida: 1,15 mL de água destilada, 2,5 mL de 30% acrilamida mix, 1,25 mL de Tris-HCl 1,5 M pH 8.8, 50 µL de 10% SDS, 50 µL de 10% de persulfato de amônio e 2,0 µL de TEMED). Enquanto o gel de empilhamento foi a 5% (1,4 mL de água destilada, 330 µL de 30% acrilamida mix, 250 µL de 1,5M Tris pH 8.8, 20 µL de 10% SDS, 20 µL de 10% de persulfato de amônio e 2,0 µL de TEMED), conforme instruções do fabricante Mini Protean II (SAMBROOK et al., 1989). A eletroforese foi realizada com o tampão de corrida Tris-HCl 0,25 M, glicina 1,92 M e SDS 0,1%, a 80 volts e 15 mA/gel, durante 3 horas.

#### 4.9 Coloração com *Coomassie R-250*

Após as corridas, os géis foram deixados *overnight* em solução fixadora contendo etanol 40%, ácido acético 10% e água destilada. No dia seguinte, estes foram corados durante 3 horas com *Coomassie Brilliant Blue R-250* 0,2%, dissolvido em ácido acético 10%, etanol 40% e água destilada. Posteriormente, foram descorados em solução de ácido acético glacial, etanol e água destilada 1:4:5 (v/v/v). Então, essa solução foi descartada e foi adicionada água destilada para a completa descoloração. Por último, o gel foi escaneado.

#### 4.10 Digestão proteica em solução

Foram utilizados 70 µg de proteínas de cada amostra para a digestão proteica em solução. Estas foram reduzidas com a adição de ditioneitol (DTT) 50mM para uma

concentração final de 10mM, sendo as amostras incubadas a uma temperatura de 60°C por 60 minutos. Após as amostras retornarem a temperatura ambiente, foi adicionada iodoacetamida (IAA) 150 mM por trinta minutos na ausência de luz. Posteriormente, foi acrescentado novamente DTT 50mM, dessa vez para uma concentração de 4,5mM e, então, a enzima tripsina (Promega) na proporção de 1/50 (p/p) de enzima/substrato foi adicionada. As amostras foram incubadas a 37°C por 20 horas. No dia seguinte, a reação foi paralisada com ácido trifluoroacético (TFA) a 10% (v/v) para uma concentração final de 1,0% (v/v), deixando por cinquenta minutos a temperatura ambiente. Por fim, foi realizada uma centrifugação a 14000 rpm, 4°C e por 30 minutos para a remoção do material insolúvel (AQUINO, 2012).

#### **4.11 Dessalinização, concentração e quantificação de peptídeos**

Os peptídeos trípticos de cada amostra foram dessalinizados em mini-colunas preparadas com resina Poros<sup>®</sup> R2 (*Applied Biosystems*). Resumidamente, cada coluna foi hidratada com acetonitrila 100% e equilibrada com ácido fórmico 0,1%. As amostras foram aplicadas à coluna e estas foram lavadas com ácido fórmico 0,1%. A eluição dos peptídeos ocorreu com as soluções de ácido fórmico 0,1% e acetonitrila 50%; e ácido fórmico 0,1% e acetonitrila 70% em dois passos sucessivos. Por fim, os peptídeos foram concentrados em baixa pressão no *Speed Vacuum* (*Thermo Fischer Scientific*), posteriormente foram ressuspensos em ácido fórmico 0,1% e quantificados pelo ensaio fluorimétrico – Qubit 3.0<sup>®</sup> (*Invitrogen*), de acordo com as instruções do fabricante.

#### **4.12 Análise por cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas sequencial (LC-MS/MS)**

Essa análise foi realizada na unidade proteômica do departamento de bioquímica da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Em duplicata técnica, os peptídeos foram submetidos a um sistema de nanocromatografia, *Easy-nLC II* (*Proxeon*). Foi utilizada uma pré-coluna (Dr. Maish – *ReprosilPur C18 Acqua*, esferas de 5 µm, 2cm de comprimento e 100µm de I.D.) e uma coluna (Dr. Maish – *ReprosilPur C18 Acqua*, esferas de 3 µm, 15 cm de comprimento e 75 µm de I.D.). Os solventes A (95% de água/5% acetonitrila/0,1% de ácido fórmico) e B (95% acetonitrila/5% de água/0,1% de ácido fórmico) foram usados em gradiente de 120 minutos (de 5% até 40% de B/ 80 minutos; de 40% até 95% de B/ 25 minutos; se

mantendo em 95% de B/ 15 minutos). À medida que os peptídeos foram fracionados, eles foram diretamente eluídos no espectrômetro de massas LTQ Orbitrap Velos (*Thermo Fischer Scientific*).

A aquisição dos espectros foi realizada no modo *data dependent acquisition* (DDA), alternando automaticamente entre a aquisição do *full scan* (MS1) e MS/MS (MS2), com uma lista de exclusão de 60 s. De maneira geral em todas as análises, foram obtidos os doze íons mais intensos, com carga igual ou superior a 2<sup>+</sup>. Estes foram isolados e fragmentados por dissociação induzida pela colisão por gás (CID), usando uma energia de colisão normalizada de 30. Os parâmetros empregados na operação do espectrômetro de massas foram: voltagem no spray de 1,5 kV, temperatura de 200°C no capilar, resolução de 60,000 na varredura inicial do MS1 e um nível de 65,5% de RF na *S-lens*.

#### **4.13 Análise de dados**

As etapas para análise dos dados proteômicos foram realizadas utilizando o software *PatternLab for proteomics* (PL) versão 4.1 (CARVALHO et al. 2016). As sequências proteicas de *Trichoderma harzianum* e *Fusarium solani* foram obtidas do UniProt no dia 05 de dezembro de 2018 e dia 06 de dezembro de 2018, respectivamente. Foram utilizados dois bancos de referência para *Trichoderma harzianum*, um com 14049 e outro com 11497 entradas proteicas; e um banco de referência para *Fusarium solani* (*Nectria haematococca*) com um total de 15709 sequências proteicas. Posteriormente, o banco de dados para a análise foi preparado do tipo “*target-decoy*”, que fornece estimativas falsas positivas visando um conjunto de identificações confiáveis na análise estatística (ELIAS & GYGI, 2010; AQUINO, 2015); além disso, este incluiu também as sequências de 127 contaminantes comuns a experimentos de espectrometria de massas (AQUINO, 2015). A ferramenta de busca *Comet* foi utilizada para comparar os espectros de massas sequenciais (MS/MS) obtidos experimentalmente com os espectros teóricos gerados a partir do banco de dados; o que resultou nos prováveis candidatos (PSMs) (ENG et al., 2013; CARVALHO et al, 2016). De forma geral, a busca foi limitada a candidatos semi-trípticos, considerando até duas falhas de clivagem no sítio enzimático (*i.e.* o número de possíveis ligações peptídicas não clivadas que correspondem à especificidade da enzima hidrolítica utilizada no experimento, como a tripsina (SIEPEN et al., 2007)); a carbamidometilação da cisteína foi imposta como uma modificação fixa e a oxidação

da metionina como variável. Nesta etapa, para cada espectro analisado, foi considerado uma tolerância de 40 ppm de erro e o *XCorr* foi utilizado como métrica de semelhança primária.

A validação das identificações proteicas foi realizada pelo *Search Engine Processor – SEPro*. De forma simplificada, este agrupa as identificações pelo estado de carga do precursor e os valores estatísticos resultantes do *Comet* (e.g. *XCorr*,  $\Delta CN$ ) para gerar um discriminador Bayesiano a fim de determinar uma função discriminante entre as identificações não-*decoys* e *decoys*. Com isso, a lista final de identificação foi obtida levando em consideração esse discriminador e estabelecendo um *false discovery rate* (FDR) em torno de 1%. Em adição, os resultados foram pós-processados para que fossem aceitas apenas sequências com um mínimo de seis aminoácidos, candidatos prováveis com menos de 10 ppm de erro e uma métrica de semelhança primária mínima de 1,8 a proteínas identificadas com um único espectro.

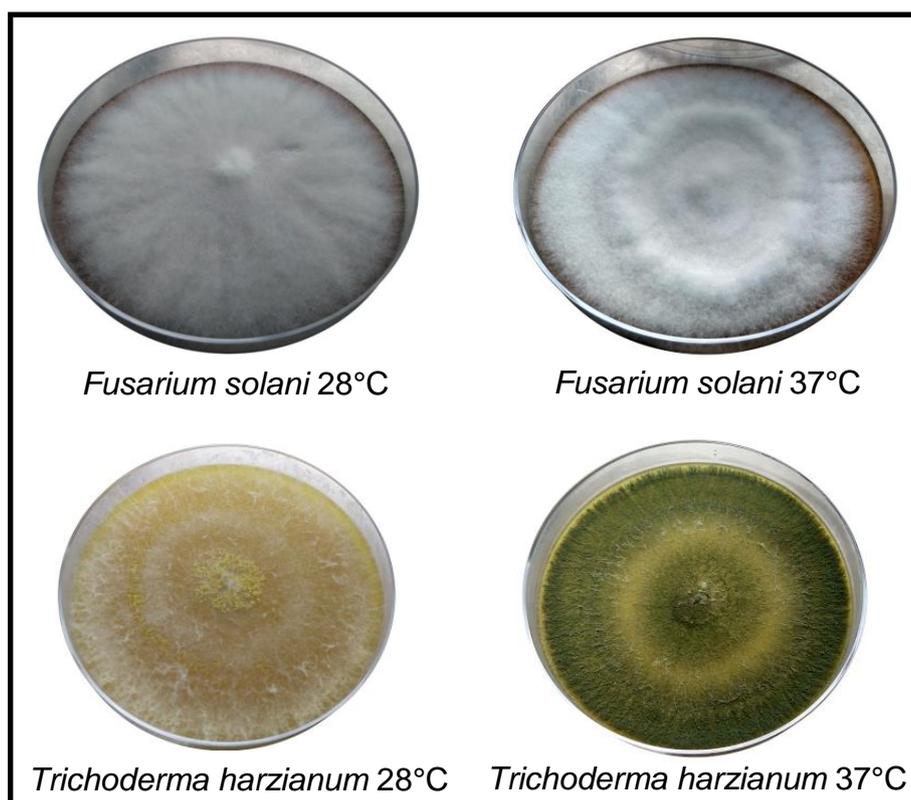
A quantificação de proteínas foi livre de marcação (*label-free*) utilizando os valores de *Spectrum count*, ou seja, o número de espectros MS2 adquiridos e mapeados para uma proteína, para inferir tais abundâncias. Além disso, tais valores foram normalizados utilizando o fator de abundância espectral normalizado (NSAF), o qual baseia-se tanto na quantificação de peptídeos exclusivos como nos compartilhados entre proteínas (CARVALHO et al., 2016).

O módulo do programa *PatternLab* chamado Diagrama de Venn de área proporcional foi usado para identificar as proteínas exclusivamente identificadas em cada temperatura ou compartilhada entre elas para cada fungo (CARVALHO et al., 2016). Esta análise considerou apenas proteínas encontradas em duas réplicas biológicas para *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) e uma réplica para *Fusarium solani* (CFAM 1313). Já para obter informações quanto às funções das proteínas identificadas, o módulo do *Gene Ontology* foi empregado para os dois fungos estudados nesse trabalho.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Cultivo fúngico

Os fungos *Fusarium solani* (CFAM 1313) e *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) foram submetidos a um crescimento a 28°C e 37°C para demonstrar suas diferenças morfológicas, onde os resultados são mostrados na figura 5.

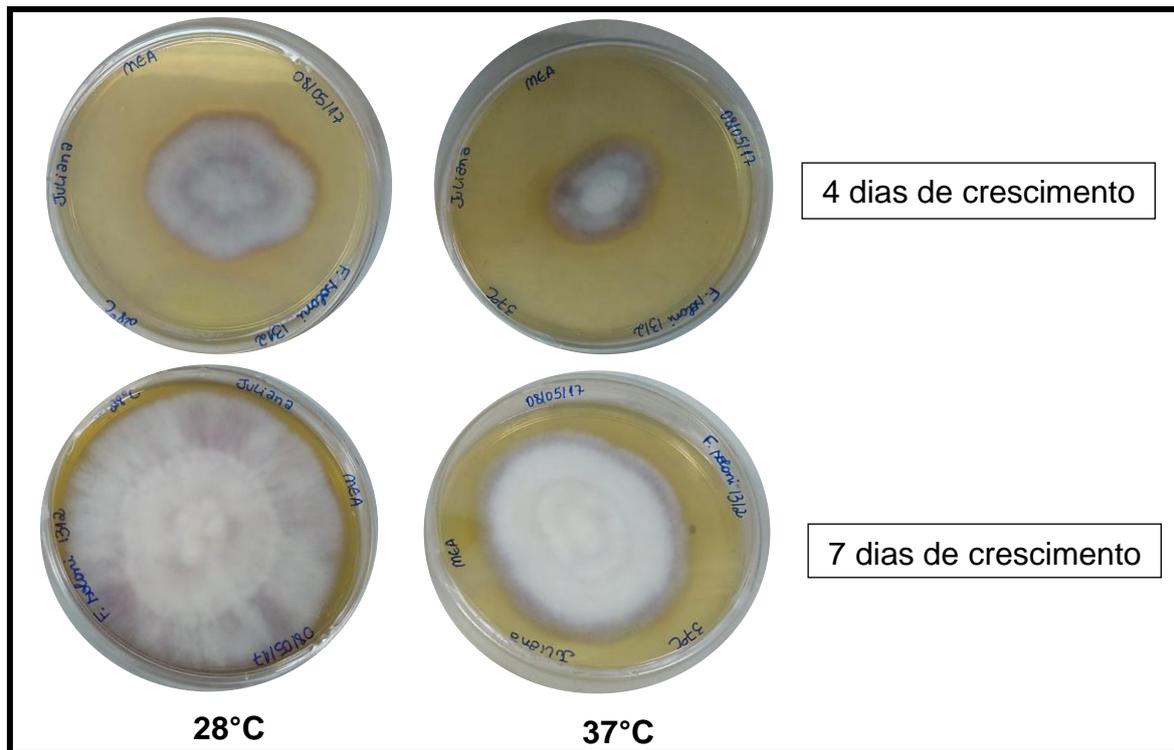


**Figura 5.** Visualização macromorfológica do crescimento dos fungos *Fusarium solani* (CFAM 1313) e *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) nas temperaturas de 28°C e 37°C.

A macroscopia correspondente ao fungo *Fusarium solani* (CFAM 1313) não demonstrou diferenças aparentes quanto à colônia observada em 28°C e 37°C. Em contrapartida, a cultura de *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) demonstrou diferença quanto à coloração, uma vez que na colônia crescida a 37°C expressou a coloração esverdeada dos conídios do fungo, enquanto na cultura a 28°C não foi observado.

Além disso, foi realizado também um comparativo de crescimento para os dois fungos tanto a 28°C quanto a 37°C, a fim de analisar em qual das duas temperaturas o fungo obterá um crescimento micelial mais adaptado durante 7 dias, conforme

visualizado na figura 6 para *Fusarium solani* (CFAM 1313) e na figura 7 para *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308).

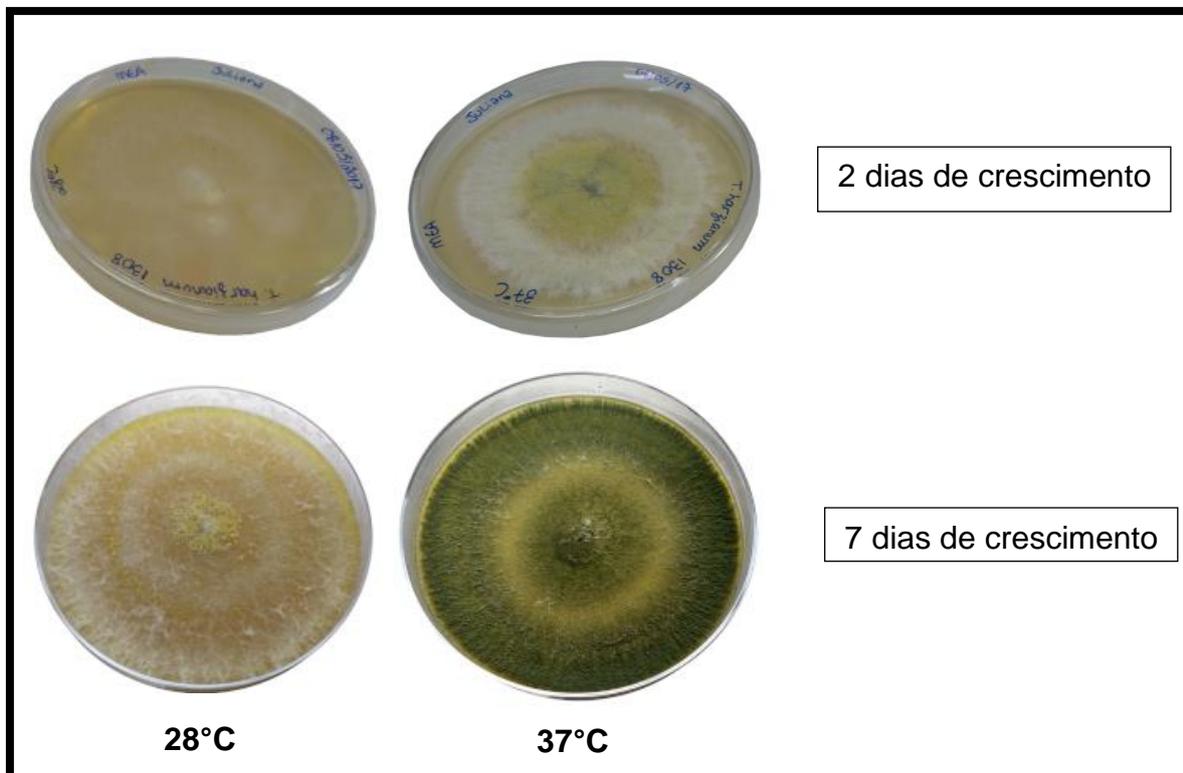


**Figura 6.** Culturas de *Fusarium solani* (CFAM 1313) crescidas ao longo de 7 dias nas temperaturas de 28°C e 37°C.

Em nossos resultados, observou-se um crescimento micelial maior na temperatura de 28°C para *Fusarium solani* (CFAM 1313), o que é coerente com dados mostrados por GUPTA (2010), onde o mesmo aponta que essa é a temperatura ótima de crescimento para essa espécie. De forma complementar, alguns estudos apontam que a temperatura ótima de crescimento para o gênero *Fusarium* spp. pode variar entre 25°C a 30°C (DOOHAN et al, 2003; PINHEIRO et al, 2012). No estudo de DOOHAN et al. (2003) com três espécies do gênero *Fusarium* spp. (*Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* e *Fusarium poae*) verificou-se que nos três casos a temperatura de melhor crescimento foi a 25°C. Em contrapartida, PINHEIRO et al. (2012) estudou *Fusarium oxysporum* f.sp. *Tracheipffhilum*, no qual a temperatura de 30°C foi a mais adequada para a espécie.

Contudo, é importante frisar que segundo os resultados do presente trabalho, a capacidade de adaptação de crescimento a 37°C não é descartada (Figura 6). Além disso, relatos na literatura demonstram a possível tolerância à temperatura corporal humana expressa por fungos do gênero *Fusarium* spp., uma vez que já foram isolados

de infecções como queratite, onicomicose, endoftalmite e até mesmo de paciente com úlcera diabética crônica (PAI et al., 2010).



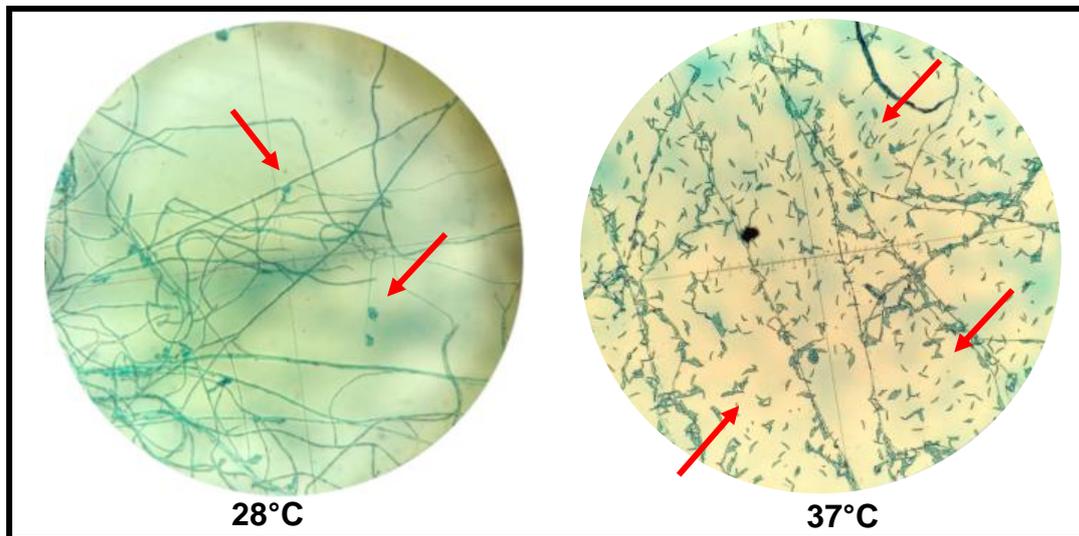
**Figura 7.** Comparação do crescimento entre as culturas de *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) nas temperaturas de 28°C e 37°C.

Com relação ao fungo *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308), observou-se uma melhor adaptação na temperatura de 37°C, o qual com apenas 2 dias de crescimento já apresentava um crescimento micelial mais avançado em comparação com a colônia a 28°C (Figura 7). Estudos apontam que a faixa de temperatura ótima de crescimento para o gênero *Trichoderma* spp. varia de 22°C a 30°C (KOIKE & LUCON, 2003; FIPKE, 2009; SINGH et al., 2014).

Em contrapartida, DRUZHININA et al. (2011) ao estudar a espécie *Trichoderma longibrachiatum*, verificou uma adaptação a alta temperatura por esse fungo, demonstrando a capacidade de crescimento a 37°C; o que é coerente com os resultados encontrados para *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308). Adicionalmente, nossos resultados quanto à característica de crescimento a 37°C de ambos os fungos estudados nesse trabalho também corroboram com LIMA et al. (2017).

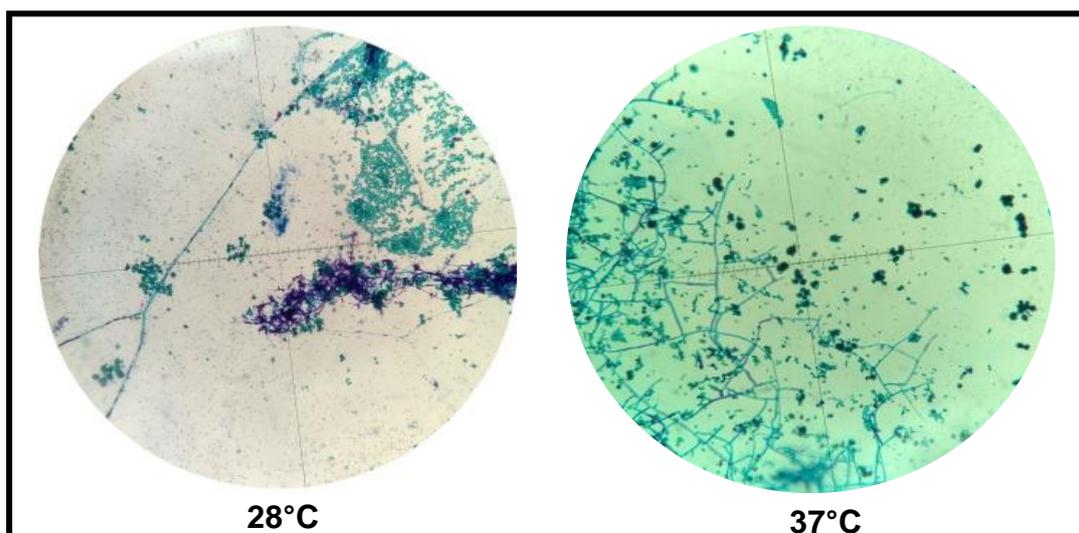
Para verificar as possíveis diferenças microscópicas apresentadas pelos fungos nas duas temperaturas estudadas, foi realizada a técnica de microcultivo. Na figura 8, estão expressos os resultados para *Fusarium solani* (CFAM 1313). Nesta, é

possível observar alterações na esporulação fúngica entre 28°C e 37°C, pois quando o fungo cresce a uma temperatura mais elevada, é maior a quantidade de esporos produzidos. Tais dados estão de acordo com a literatura, onde autores como PINHEIRO et al. (2012) e WINDER (1999) também observaram essa influência da temperatura para a esporulação entre diferentes espécies do gênero *Fusarium* spp. (*Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheipffhilum* e *Fusarium avenaceum*, respectivamente).



**Figura 8.** Visualização microscópica expressa pelo fungo *Fusarium solani* (CFAM 1313) a 28°C e 37°C com aumento de 40X. As setas vermelhas indicam a influência da temperatura na esporulação do fungo. Microscópio utilizado: *Leica Microsystems* (DM 1000).

Já para o fungo *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) foi considerado que não houve diferença aparente entre as lâminas, uma vez que a única modificação foi a disposição visual dos esporos entre as duas temperaturas (Figura 9).



**Figura 9.** Visualização microscópica de *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) entre as temperaturas de 28°C e 37°C com aumento de 40X. Microscópio utilizado: *Leica Microsystems* (DM 1000).

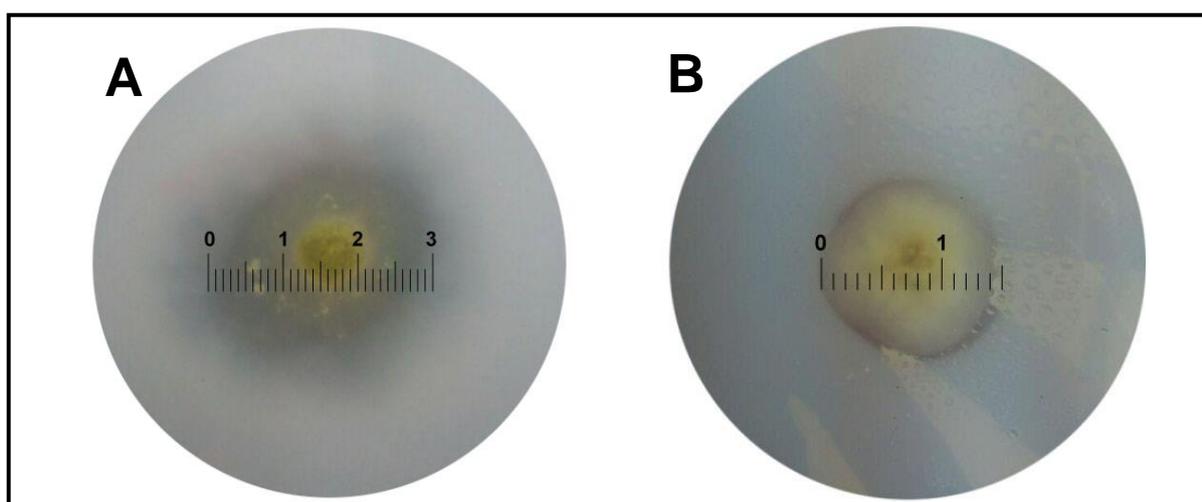
## 5.2 Ensaio qualitativos relacionados a patogenicidade

### 5.2.1 Protease

Esse ensaio avalia a atividade enzimática expressa pelas proteases secretadas pelos microrganismos, na qual a positividade é observada pela presença de um halo translúcido ao redor de cada colônia fúngica. Na figura 10, verifica-se que ambos os fungos estudados apresentaram resultados positivos. Porém, o fungo *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) demonstrou uma atividade proteolítica maior em comparação com *Fusarium solani* (CFAM 1313).

Alguns trabalhos na literatura também têm demonstrado a produção de protease como um fator de virulência em microrganismos patogênicos, dentre eles estão fungos e bactérias. Alguns exemplos são: *Cryptococcus gattii*, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus neoformans*, *Pseudomonas aeruginosas*, *Candida albicans*, *Aspergillus* spp.; além dos mais diversos dermatófitos presentes na natureza (CAMPOS & BARONI, 2010; PERES et al., 2010; FERNANDES, 2010; PESSOA et al., 2012; SILVA, 2013; NAVES, 2013).

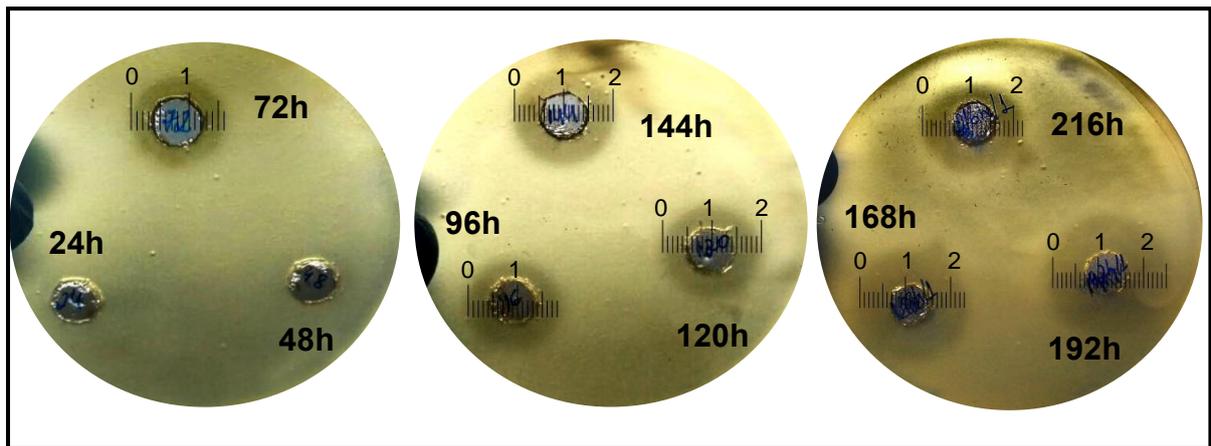
De forma complementar ao trabalho de LIMA et al. (2017), o qual mostrou o potencial de atividade de protease para *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) e *Fusarium solani* (CFAM 1313) na temperatura de 28°C, os dados deste estudo sugerem que mesmo quando essas culturas fúngicas estão presentes em uma temperatura mais elevada (37°C), como a do corpo humano, sua atividade não é inibida.



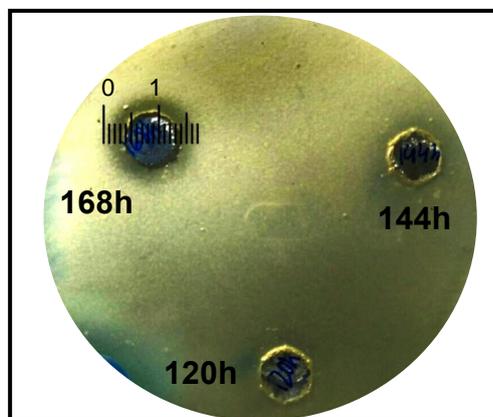
**Figura 10.** Visualização da positividade quanto à produção de protease para cada fungo na temperatura de 37°C. (A) Halo e colônia de *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) com 3 cm de diâmetro, (B) Halo e colônia de *Fusarium solani* (CFAM 1313) com 1,5 cm de diâmetro.

### 5.2.2 Fosfolipase

Para esse ensaio, analisou-se uma alíquota de secretoma fúngico retirado a cada 24 horas. O fungo *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) apresentou positividade a partir de 72 horas de crescimento (Figura 11). Em contrapartida, o fungo *Fusarium solani* (CFAM 1313) demonstrou atividade enzimática de fosfolipases apenas em 168 horas, sendo negativo para os outros tempos analisados (Figura 12).



**Figura 11.** Visualização da atividade enzimática de fosfolipases pelo fungo *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) na temperatura de 37°C, demonstrando positividade nos tempos entre 72 horas e 192 horas.



**Figura 12.** Visualização da atividade enzimática de fosfolipases no tempo de 168 horas para *Fusarium solani* (CFAM 1313) na temperatura de 37°C.

Assim como as proteases, as fosfolipases são também estudadas como fatores de virulência, principalmente em leveduras. Nestas, indícios apontam para a participação dessas enzimas no processo de infecção, atuando na degradação de fosfolipídios das membranas celulares do hospedeiro e conseqüentemente, auxiliando na invasão e aderência celular (HARTMANN et al., 2016). Logo, sugerimos que estas também possam realizar a mesma função quando produzidas por outros

microrganismos, como os fungos filamentosos, contudo outros ensaios *in vitro* ou *in vivo* são necessários para corroborar tal hipótese.

De forma mais específica, a atividade de fosfolipases também foi medida segundo a fórmula descrita por PRICE et al (1982). Na tabela 1, encontra-se os resultados encontrados para ambos os fungos, no qual se verificou que o *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) teve uma atividade mais elevada em relação ao *Fusarium solani* (CFAM 1313), pois expressou produção fortemente positiva de fosfolipases a partir do tempo de 72 horas, enquanto o *Fusarium solani* (CFAM 1313) apenas em 168 horas.

**Tabela 1.** Dados da atividade enzimática de fosfolipases na temperatura de 37°C tanto de *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) quanto de *Fusarium solani* (CFAM 1313).

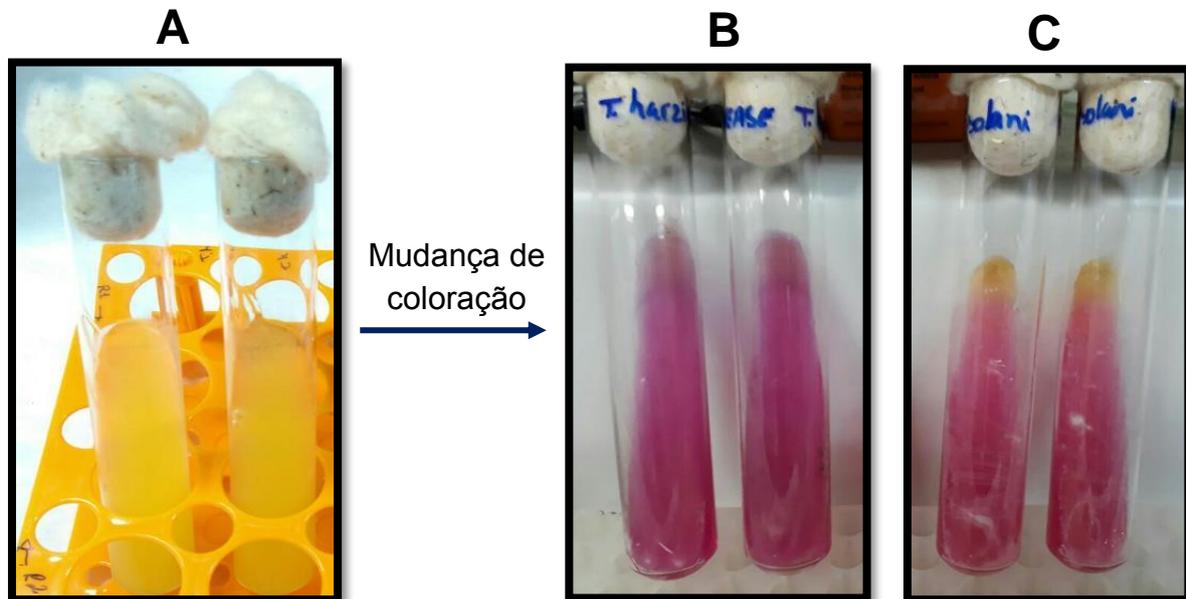
Tempo	Atividade enzimática ( <i>Trichoderma harzianum</i> )	Atividade enzimática ( <i>Fusarium solani</i> )
24 horas	1,00	1,00
48 horas	1,00	1,00
72 horas	0,56	1,00
96 horas	0,50	1,00
120 horas	0,45	1,00
144 horas	0,45	1,00
168 horas	0,39	0,52
192 horas	0,36	----
216 horas	0,41	----

\* Atividade enzimática igual a 1: atividade é negativa; entre 0,64 e 0,99: positiva e menor ou igual a 0,63: fortemente positiva (PRICE et al, 1982).

### 5.2.3 Urease

A urease é uma enzima conhecida por clivar a ureia, alterando o pH do meio celular devido a liberação de amônia. Em nossos resultados, tanto *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) como *Fusarium solani* (CFAM 1313) apresentaram a produção dessa enzima (Figura 13). Em um estudo realizado por UBERTI (2010), demonstrou-se que ureases produzidas por *Helicobacter pylori* estão relacionadas à síntese de citocinas inflamatórias, ativação de fagócitos e podem ser responsáveis pelo desenvolvimento de um microambiente de caráter neutro/levemente alcalino no lúmen do estômago. Neste contexto, essa enzima está associada não somente a

sobrevivência de patógenos em ambientes hostis, mas também pode estar relacionada ao desenvolvimento de lesões celulares/teciduais do seu hospedeiro; sendo considerada, portanto, um fator de virulência em microrganismos (UBERTI, 2010).

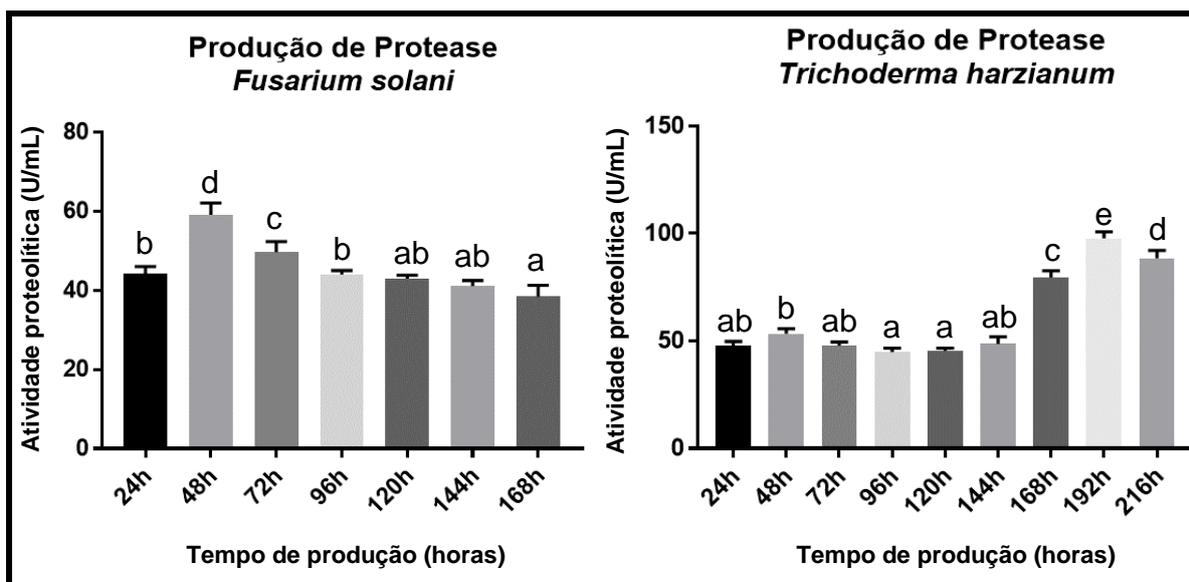


**Figura 13.** Visualização da produção de urease pelos fungos estudados na temperatura de 37°C. (A) Controle, (B) *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) e (C) *Fusarium solani* (CFAM 1313).

Além disso, semelhante ao teste de protease (item 5.2.1), LIMA et al (2017) também realizou o ensaio de urease para *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) e *Fusarium solani* (CFAM 1313) na temperatura de 28°C, encontrando positividade para ambas as espécies. Logo, observa-se que mesmo em uma temperatura mais elevada (37°C), ocorre a atividade dessa enzima sem desnaturação, mostrando-se estável. Logo, sugere-se que tal enzima possa ter uma ampla faixa de atividade entre as temperaturas de 28°C a 37°C para os fungos estudados.

### 5.3 Quantificação de proteases e proteínas totais

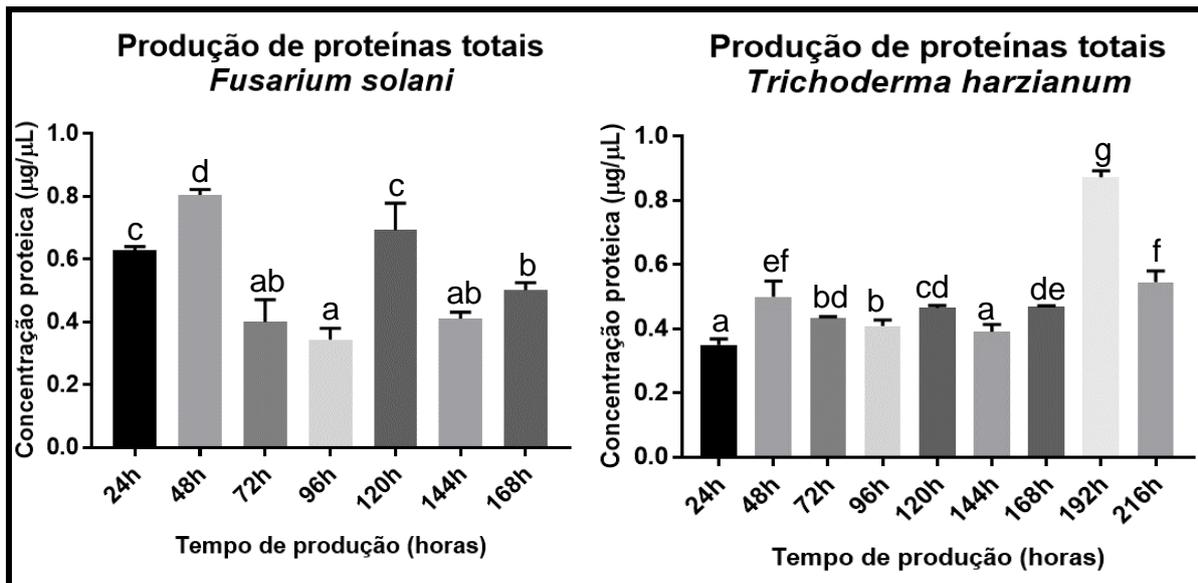
Nessa etapa, verificou-se que o fungo *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) e *Fusarium solani* (CFAM 1313) obtiveram uma produção mínima de proteases no tempo de 96 horas com 44,8 U/mL e 168 horas com 38,5 U/mL, respectivamente. Já em relação a produção máxima para *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) foi no tempo de 192 horas com 97,8 U/mL, enquanto *Fusarium solani* (CFAM 1313) foi a 48 horas com 59,1 U/mL conforme visualizado no gráfico 1.



**Gráfico 1.** Produção de proteases pelos fungos *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) e *Fusarium solani* (CFAM 1313) na temperatura de 37°C. Dados representados pela média de cada tempo e seus respectivos desvios padrão. Letras diferentes indicam valores significativamente distintos ( $p$ -valor  $\leq 0,05$ ), conforme determinado pela ANOVA com o teste de Tukey.

A produção de proteases por microrganismos tem sido relatada na literatura por alguns gêneros de fungos, como: *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium*, *Thermoascus*, *Rhizopus*, *Humicola*, *Thermomyces*, *Fusarium*, entre outros (ANDRADE et al; 2002; BUENO et al, 2009; DE SOUZA et al, 2015; SOUZA, 2015). Adicionalmente, os resultados aqui encontrados são coerentes com SOUZA (2015), no qual foi apontado que a produção de protease em fungos inicia-se no tempo de 48 horas e o tempo máximo de produção varia de acordo com o gênero e espécie fúngica estudada. Exemplos dessa variação tem-se o *Aspergillus foetidus*, que segundo SOUZA (2015), o tempo de melhor produção foi a 168 horas; já para um fungo endofítico isolado do cerrado estudado por WERNECK (2017) foi a 192 horas.

Semelhantemente, o ensaio de proteínas totais demonstrou que *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) obteve produção máxima e mínima nos tempos de 192 horas (0,873  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) e 96 horas (0,344  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), respectivamente. No entanto, para *Fusarium solani* (CFAM 1313) a produção máxima foi em 48 horas (0,806  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) e a mínima foi em 24 horas (0,351  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), como é visto no gráfico 2.



**Gráfico 2.** Proteínas totais produzidas pelos fungos *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) e *Fusarium solani* (CFAM 1313) na temperatura de 37°C. Dados representados pela média de cada tempo e seus respectivos desvios padrão. Letras diferentes indicam valores significativamente distintos ( $p$ -valor $\leq$ 0,05), conforme determinado pela ANOVA com o teste de Tukey.

#### 5.4 Análise estatística

Como demonstrado nos gráficos 1 e 2 no tópico 5.3, a análise de variância (ANOVA) com o teste de Tukey permitiu determinar o tempo máximo de produção proteica para ambos os fungos.

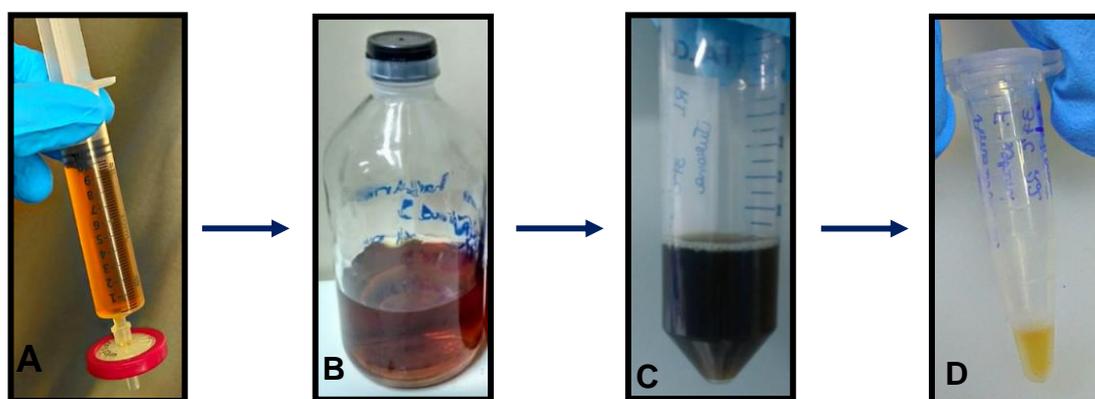
Para *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308), o tempo que divergiu estatisticamente dos demais, tendo maior quantificação em ambos os ensaios, foi 192 horas, representado pela letra “e” (produção de protease) e “g” (proteínas totais). Semelhantemente, para *Fusarium solani* (CFAM 1313) o tempo que divergiu significativamente, com maior quantificação, foi 48 horas, representado pela letra “d” tanto no ensaio de protease quanto de proteínas totais.

Portanto, os tempos de 192 horas para *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) e 48 horas para *Fusarium solani* (CFAM 1313) foram definidos como os tempos de maior produção proteica para a posterior análise proteômica.

## 5.5 Estudo proteômico

### 5.5.1 Obtenção dos secretomas fúngicos, concentração, dessalinização e precipitação das amostras

Para a obtenção das amostras a serem analisadas por proteômica, foi feita a fermentação submersa que, por meio de filtração (Figura 14A), resultou em aproximadamente 90 mL de secretoma recuperado de cada fungo (Figura 14B), que foram concentrados em 15mL, por meio de centrifugações sucessivas (Figura 14C). A precipitação com ácido tricloroacético (TCA) 20% diluído em acetona pura gelada resultou em um precipitado amarelado que foi ressuspensionado em *Rapigest*<sup>®</sup> para extração proteica (Figura 14D).



**Figura 14.** Visualização da filtração do meio fermentado (A) do secretoma fúngico obtido no estudo (B); da amostra resultante da concentração e dessalinização (C) e do precipitado proteico ressuspensionado em *Rapigest*<sup>®</sup> (D).

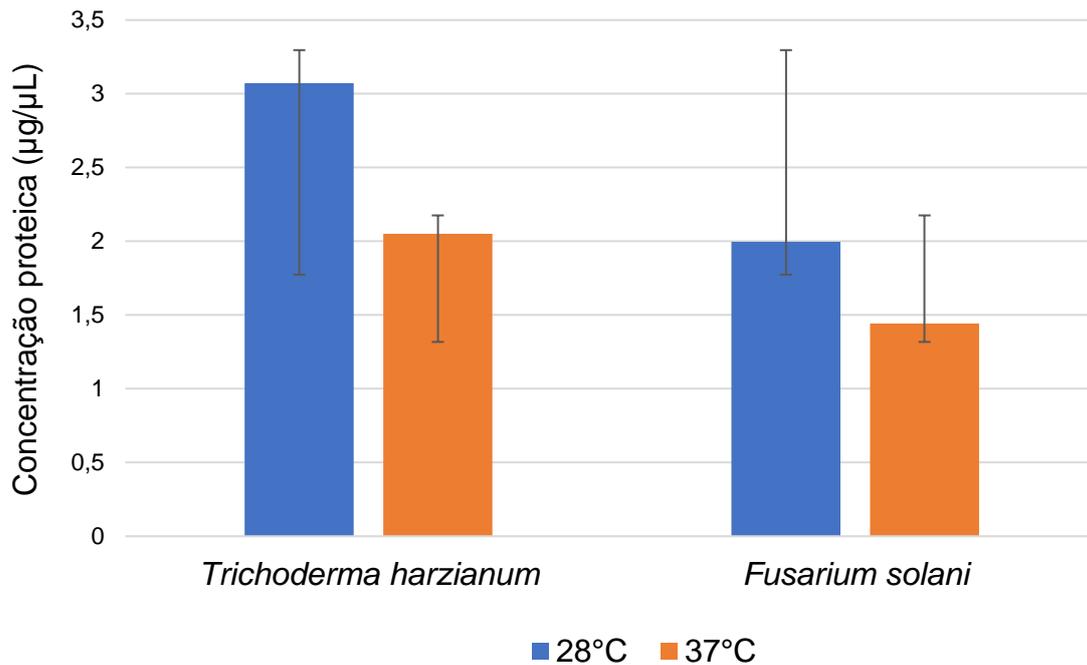
### 5.5.2 Análise da extração de proteínas

Os dados referentes a concentração de proteínas extraídas de cada secretoma pelo ensaio fluorimétrico estão descritos na tabela 2 e podem ser visualizados também no gráfico 3.

**Tabela 2.** Leitura da concentração de proteínas pelo ensaio fluorimétrico Qubit 3.0® de cada réplica de *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) e *Fusarium solani* (CFAM1313).

Amostra fúngica	Concentração proteica (µg/µL)
<i>Fusarium solani</i> 37°C Réplica 1	1,33
<i>Fusarium solani</i> 37°C Réplica 2	1,36
<i>Fusarium solani</i> 37°C Réplica 3	1,64
<i>Fusarium solani</i> 28°C Réplica 1	1,67
<i>Fusarium solani</i> 28°C Réplica 2	2,14
<i>Fusarium solani</i> 28°C Réplica 3	2,18
<i>Trichoderma harzianum</i> 37°C Réplica 1	1,61
<i>Trichoderma harzianum</i> 37°C Réplica 2	2,26
<i>Trichoderma harzianum</i> 37°C Réplica 3	2,28
<i>Trichoderma harzianum</i> 28°C Réplica 1	2,88
<i>Trichoderma harzianum</i> 28°C Réplica 2	2,54
<i>Trichoderma harzianum</i> 28°C Réplica 3	3,80

A triplicata do *Fusarium solani* (CFAM 1313) submetida a 37°C obteve uma concentração proteica variando de 1,33 - 1,64 µg/µL, tendo uma média de 1,44 µg/µL de proteínas, enquanto as amostras submetidas a 28°C obtiveram uma variação de 1,67 – 2,18 µg/µL, com média de 2,00 µg/µL. Já a triplicata do *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) submetida a 37°C obteve uma concentração proteica variando de 1,61 - 2,28 µg/µL, tendo uma média de 2,05 µg/µL, enquanto as amostras submetidas a 28°C resultaram em concentrações variando de 2,54 - 3,80 µg/µL, com média de 3,07 µg/µL. Considerando as médias de ambos os fungos em relação às temperaturas, é possível observar uma maior produção proteica a 28°C tanto para *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) quanto para *Fusarium solani* (CFAM 1313) (Gráfico 3). Tais resultados eram esperados pelo fato de serem fungos ambientais e tal temperatura simula seus *habitats* naturais. Em adição, a temperatura de 37°C pode fornecer ao fungo um ambiente de estresse, exigindo mais de sua maquinaria celular a ponto de produzir apenas proteínas essenciais para sua sobrevivência; o que pode ter influenciado quantitativamente na sua produção proteica em comparação com 28°C.



**Gráfico 3.** Rendimento proteico demonstrado pelas médias da concentração de proteínas de *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) e *Fusarium solani* (CFAM 1313) nas temperaturas de 28°C e 37°C, com desvio padrão.

### 5.5.3 Eletroforese unidimensional

Dentro do estudo proteômico também foi realizada uma eletroforese unidimensional de ambos os fungos, a fim de verificar um perfil proteico inicial de cada espécie estudada quando submetidas à temperatura de 28°C e 37°C. Devido a problemas com quantidade de amostra, tal etapa foi realizada com duas réplicas biológicas de cada.

Tanto o gel do fungo *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) quanto de *Fusarium solani* (CFAM 1313) obtiveram resultados que demonstram bandas proteicas bem distribuídas ao longo do gel tanto a 28°C quanto a 37°C (Figura 15 e 16). No entanto, uma diferença notável entre as temperaturas foi observada para ambos os fungos, pois o perfil de 37°C apresenta bandas entre 37 – 50 kDa, o que não é possível visualizar a 28°C. Nossos resultados da *shotgun proteomics* demonstram proteínas com essa faixa de pesos moleculares encontradas a 37°C, como, por exemplo, a proteinase T de 40 kDa e a carboxipeptidase de 60 kDa expressas por *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308), e uma proteína denominada como peptídeo hidrolase de 39 kDa por *Fusarium solani* (CFAM 1313), além de

proteínas ainda não caracterizadas de 46 e 48 kDa para ambos os fungos (Tabela 3 e 4 em anexo).

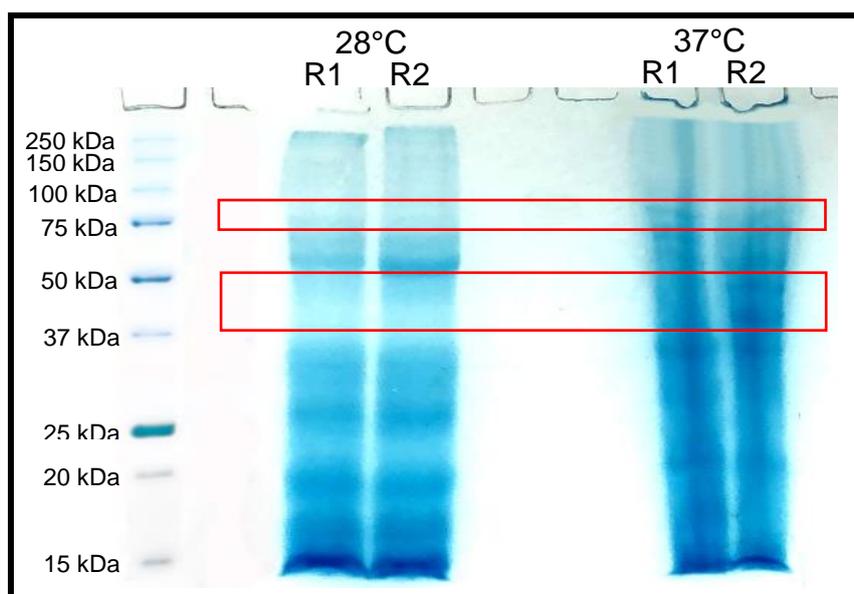
De maneira geral, segundo a literatura, proteínas nessa faixa de kDa podem estar relacionadas a determinados processos fundamentais para patogênese fúngica. OLIVEIRA e ROCHA (2017) relataram proteínas como a serina peptidase de 50 kDa encontrada em *Candida albicans* e a glicoproteína de 43 kDa encontrada em *Paracoccidioides*. Tais proteínas poderiam estar relacionadas, respectivamente, a capacidade de degradar Imunoglobulina G (IgG), facilitando a evasão do sistema imunológico do hospedeiro, e a mediação da adesão a componentes da matriz celular em células humanas; sendo esses processos auxiliares da instalação fúngica e início da infecção no hospedeiro.

Outras proteínas como a alpha-arrestina e a enolase possuem peso molecular de 46kDa e 48kDa, respectivamente, estando também na faixa diferencial entre as temperaturas de ambos os fungos. DONG et al. (2016) descreveu a alpha-arrestina de *Magnaporthe oryzae*, associada à regulação dos padrões de conidiação, o que auxiliaria na patogenicidade do microrganismo, e ainda revelou que mutantes do gene codificador dessa enzima deixavam de ser patogênico. Já a enolase foi descrita em diversos microrganismos, cuja função estava relacionada ao processo de interação patógeno-hospedeiro. Em *Paracoccidioides brasilienses*, essa enzima está associada à facilitação da invasão tecidual pelo microrganismo, pois após a enolase se ligar ao plasminogênio e ocorrer a conversão deste à plasmina, *Paracoccidioides brasilienses* adquire atividade proteolítica, contribuindo para patogenicidade fúngica (NOGUEIRA et al., 2010). Além disso, em *Saccharomyces cerevisiae* e *Conidiobolus lamprauges*, a enolase foi associada ao controle do crescimento e tolerância térmica, visto que em temperaturas mais elevadas como a 37°C há uma superexpressão dessa enzima, podendo estar envolvida na sobrevivência do fungo no hospedeiro (NATASHA et al., 2012; DE GODOY et al. 2014).

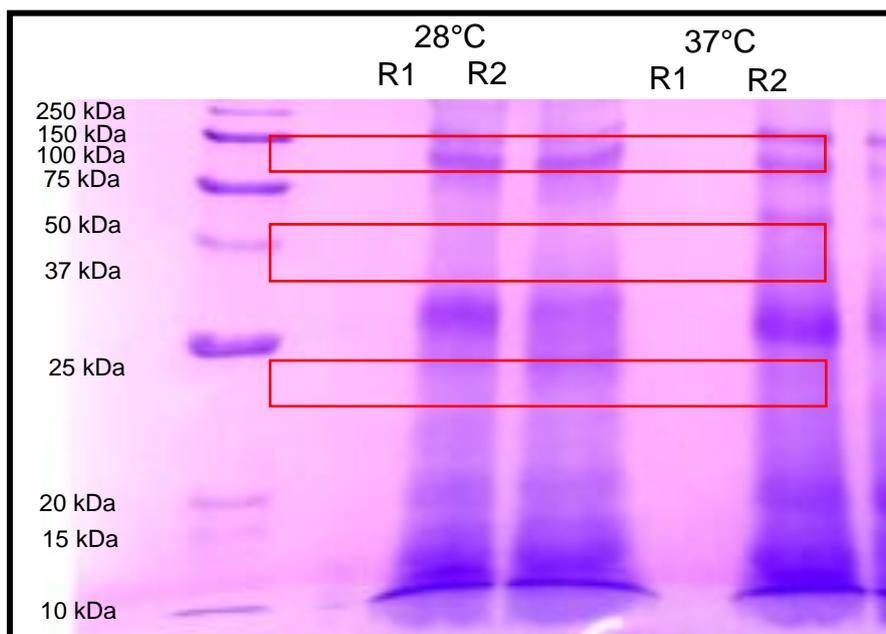
O gel de *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) também possui uma banda diferencial na temperatura de 37°C com aproximadamente 75 kDa (Figura 15). Nos resultados da *shotgun proteomics*, não foi identificada nenhuma proteína caracterizada com esse peso molecular, talvez por uma limitação do banco de dados; contudo, foi identificada uma proteína ainda não caracterizada de 72 kDa (Tabela 3 em anexo).

De forma geral, proteínas com esse peso molecular (~75 kDa) podem estar relacionadas à resposta do fungo ao estresse devido à alta temperatura. Um exemplo são as da família de Proteínas de Choque Térmico (Hsp) de 70 kDa, incluindo a Hsp75, que atua em alguns processos celulares incluindo o controle de diferenciação celular e a proliferação do microrganismo (CASTRO et al, 2014).

Já no gel do *Fusarium solani* (CFAM 1313), especialmente nas amostras de 28°C, é possível observar bandas específicas entre 100 a 150 kDa e em torno de 25 kDa (Figura 16). Em nossa análise por *shotgun* proteomics, foram identificadas apenas proteínas não caracterizadas com esses pesos moleculares, uma de 122 kDa e outra de 25kDa (Tabela 4 em anexo). Porém, devido essas proteínas terem sido identificadas a 28°C e por *Fusarium solani* ser um fungo fitopatígeno, supõe-se que possam estar associadas ao estilo de vida sapróbia do fungo, como as endoglucanases e a  $\beta$ -glucosidase. Em fungos, as endoglucanases podem variar de 25 a 50 kDa, enquanto as  $\beta$ -glucosidases são de maior peso molecular variando de 110 a 182 kDa (MARCO, 2012). MARCO (2012) cita um estudo com o fungo *Phanerochaete chrysosporium*, onde foram determinadas endoglucanases variando entre 28 e 37 kDa e uma  $\beta$ -glucosidase de 114 kDa para essa espécie. Além disso, SALES et al. (2011) estudou o efeito da temperatura na produção de endoglucanases, verificando as temperaturas de 30°C, 35°C e 40°C, no qual foi observado atividade mais expressiva no menor nível de temperatura (30°C).



**Figura 15.** Eletroforese unidimensional demonstrando as diferenças do perfil proteico das amostras de *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) submetidas às temperaturas de 28°C e 37°C. Legenda: R1 - Réplica 1; R2 - Réplica 2. Retângulos vermelhos mostrando bandas proteicas diferenciais entre as temperaturas.



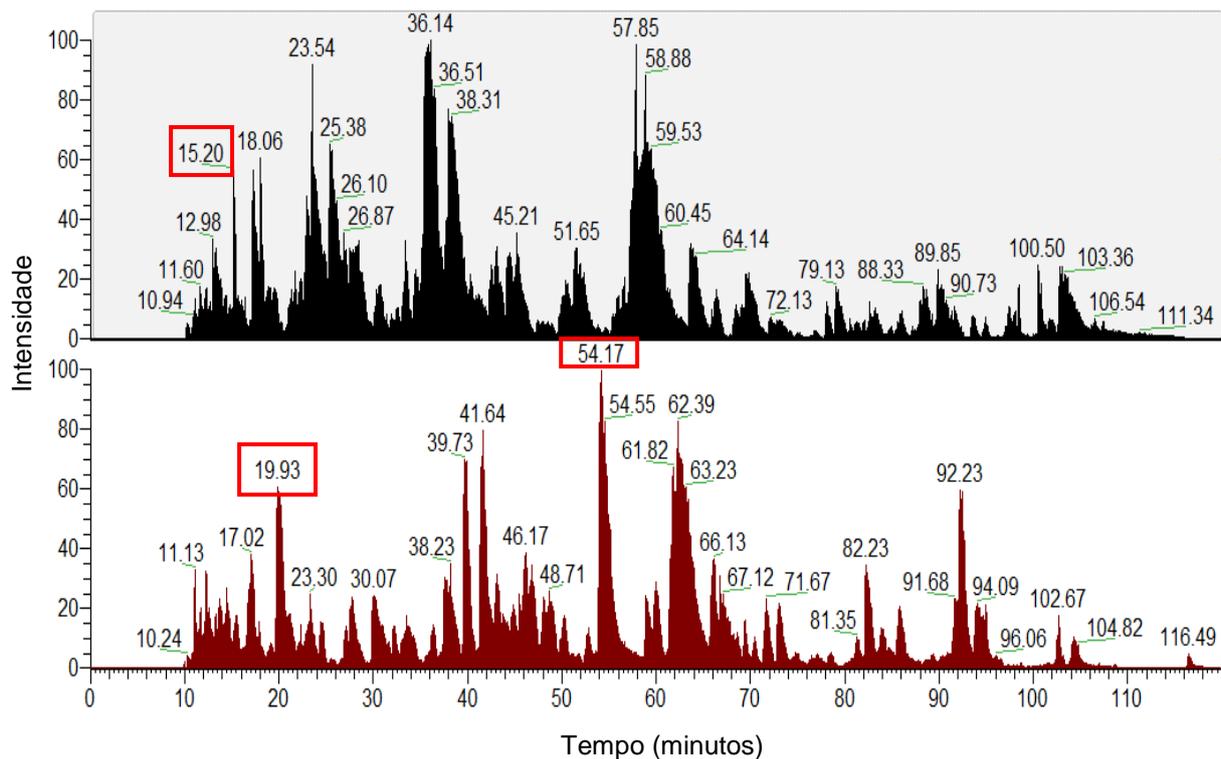
**Figura 16.** Eletroforese unidimensional demonstrando as diferenças do perfil proteico das amostras de *Fusarium solani* (CFAM1313) submetidas às temperaturas de 28°C e 37°C. Legenda: R1 - Réplica 1; R2 - Réplica 2. Retângulos vermelhos mostrando bandas proteicas diferenciais entre as temperaturas.

#### 5.5.4 Análise diferencial dos cromatogramas

Para inferir as proteínas presentes nos secretomas dos fungos foi utilizado a cromatografia líquida acoplado a espectrometria de massas. A análise cromatográfica dos peptídeos obtidos durou 120 minutos, sendo que nossos resultados demonstram diferenças entre os cromatogramas das amostras provenientes das temperaturas de 28°C e 37°C de ambos os fungos.

O gráfico 4 ilustra um exemplo de cromatograma de uma das réplicas técnicas da amostra de *Fusarium solani* (CFAM 1313) tanto a 37°C quanto a 28°C. Nesta, verifica-se picos diferenciais no que se refere tanto ao surgimento quanto na intensidade dos mesmos em ambas as temperaturas. Em 28°C, é possível observar um pico intenso e diferencial no tempo de 19.93 minutos e outro em 54.17 minutos, o qual não está presente a 37°C (Gráfico 4).

Também foi possível observar ainda que, na temperatura de 28°C, há picos mais intensos na faixa entre 60-70 minutos e entre 80-100 minutos, enquanto que no de 37°C há um pico diferencial no tempo de 15.20 minutos, além de picos mais intensos na faixa de 20-40 minutos, 55-60 minutos e entre 100-110 minutos (Gráfico 4).

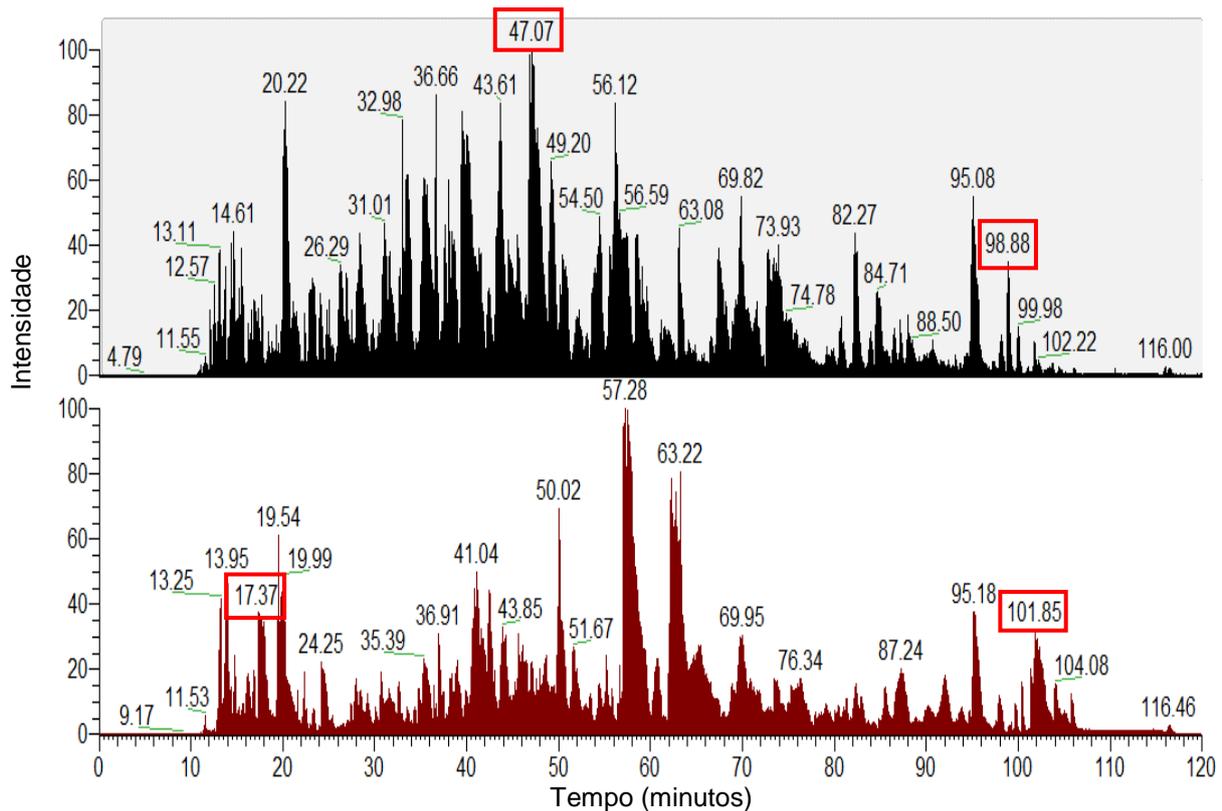


**Gráfico 4.** Cromatogramas de uma réplica técnica de *Fusarium solani* (CFAM 1313) a 37°C (preto) e 28°C (vermelho) de uma corrida cromatográfica de 120 minutos.

Além disso, também foi feita a análise cromatográfica para o fungo *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308). O gráfico 5 ilustra um exemplo de cromatograma de uma das réplicas técnicas tanto a 37°C quanto a 28°C.

Os cromatogramas de ambas as temperaturas para esse fungo apresentam diferenças maiores quanto à intensidade dos picos demonstrados. Em 37°C, é possível verificar uma distribuição de picos mais intensos entre os tempos de retenção de 20-50 e 70-90 minutos em comparação com 28°C. Já na temperatura de 28°C, observa-se maior intensidade entre os intervalos de 50 a 65 minutos.

Outro diferencial é a aparição de picos nos tempos de 47.07 e 98.88 minutos em 37°C, os quais não são observados a 28°C; e nos tempos de 17.37 e 101.85 minutos que se apresentam apenas no cromatograma de 28°C.



**Gráfico 5.** Cromatogramas de uma réplica técnica de *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) a 37°C (preto) e 28°C (vermelho) de uma corrida cromatográfica de 120 minutos.

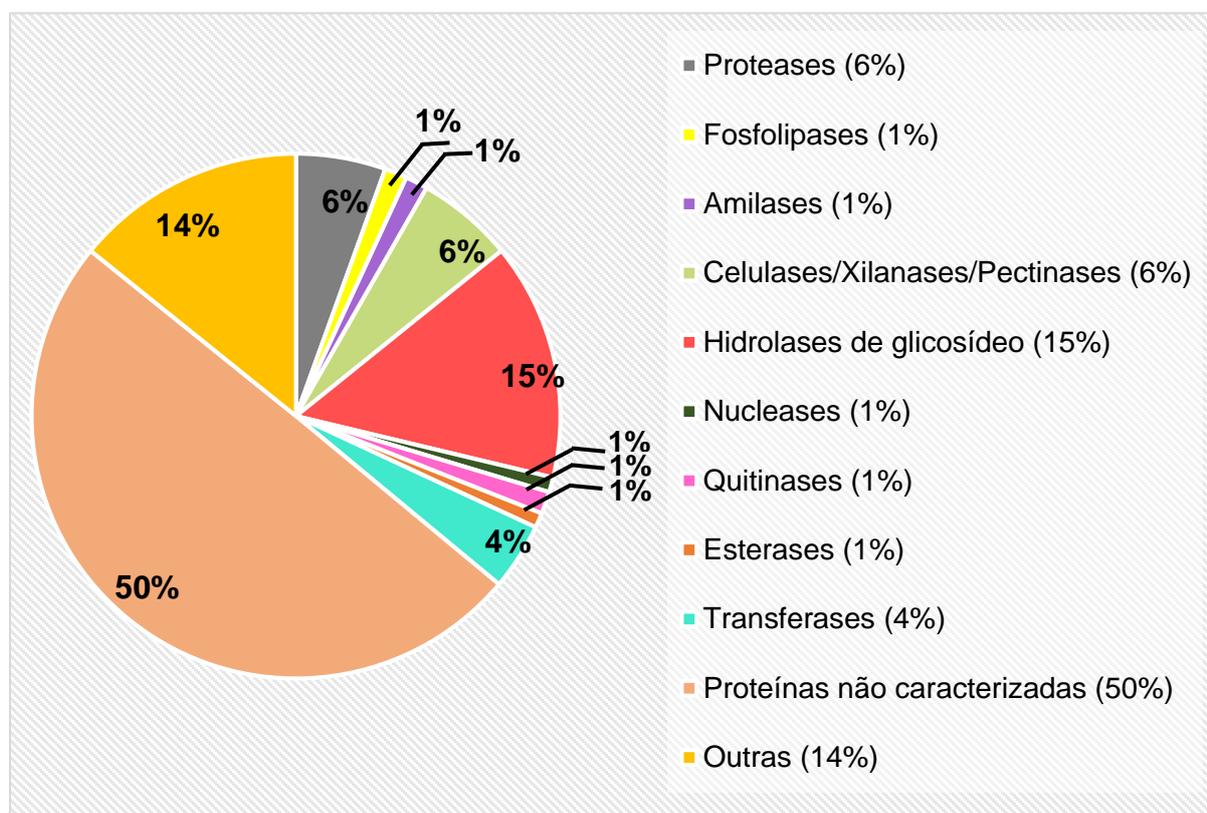
### 5.5.5 Identificação proteica

As proteínas presentes no secretoma de cada fungo foram inferidas através do software *PatternLab for Proteomics* (CARVALHO et al., 2016). Foram identificadas um total de 219 proteínas (com redundância), 3278 espectros, 583 peptídeos e 71 proteínas únicas para *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) e para *Fusarium solani* (CFAM 1313) foram detectadas 72 proteínas (com redundância), 2091 espectros, 373 peptídeos e 71 proteínas únicas, incluindo diversas classes de proteínas para ambos os fungos como pode ser visto no gráfico 6 e 7. A lista completa de identificações de ambos os fungos encontra-se disponível no anexo 8.1. De forma geral, tais proteínas possuem diversas funções relacionadas a processos biológicos, componentes celulares e função molecular.

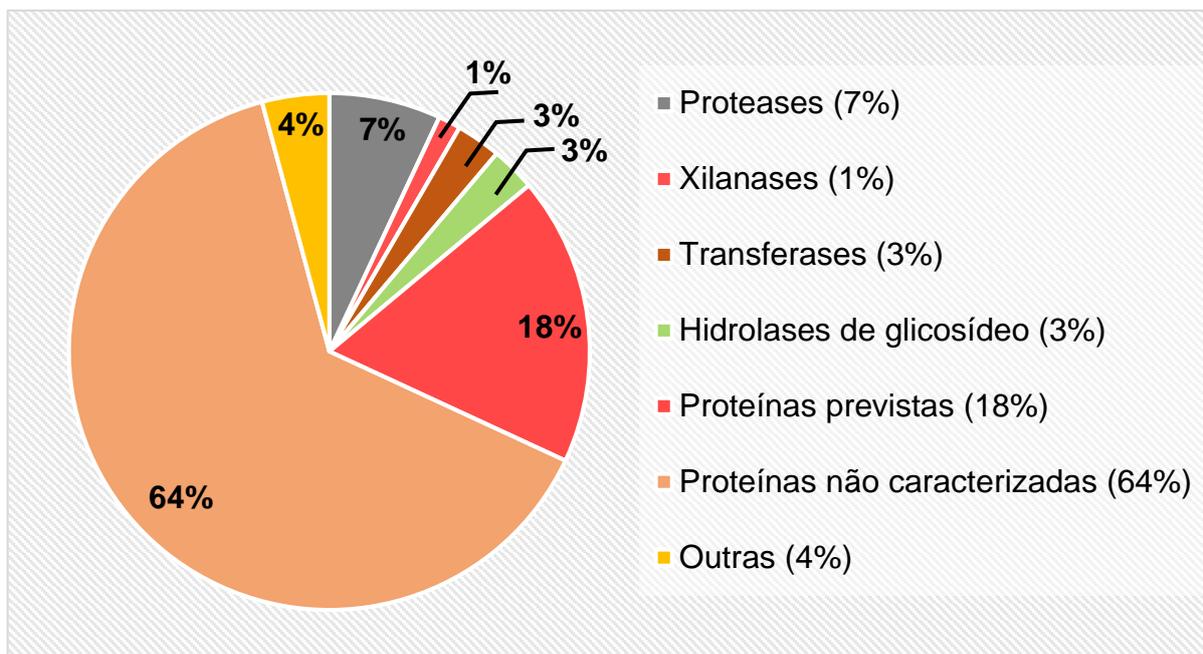
O fungo *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) apresentou aproximadamente o triplo de proteínas identificadas em relação a *Fusarium solani* (CFAM 1313). Isso pode ser explicado pela provável limitação com o banco de dados, pois estavam

disponíveis dois bancos de referência para *Trichoderma harzianum* e apenas um para *Fusarium solani*.

Além disso, muitas proteínas dentre essas identificadas são ainda não caracterizadas para os organismos estudados, sendo 50% para *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) e 64% para *Fusarium solani* (CFAM 1313), demonstrado no gráfico 6 e 7. Isso pode ser uma das explicações de não termos identificado proteínas expressas nos testes qualitativos desse estudo, como é o caso das ureases ou, até mesmo, proteínas de choque térmico. Outra suposição seria a possível baixa abundância dessas proteínas nas amostras, o que pode não ter permitido a detecção frente aos parâmetros estatísticos utilizados.



**Gráfico 6.** Distribuição das classes de proteínas identificadas no secretoma do fungo *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308), independente da temperatura submetida, demonstrada em porcentagem.

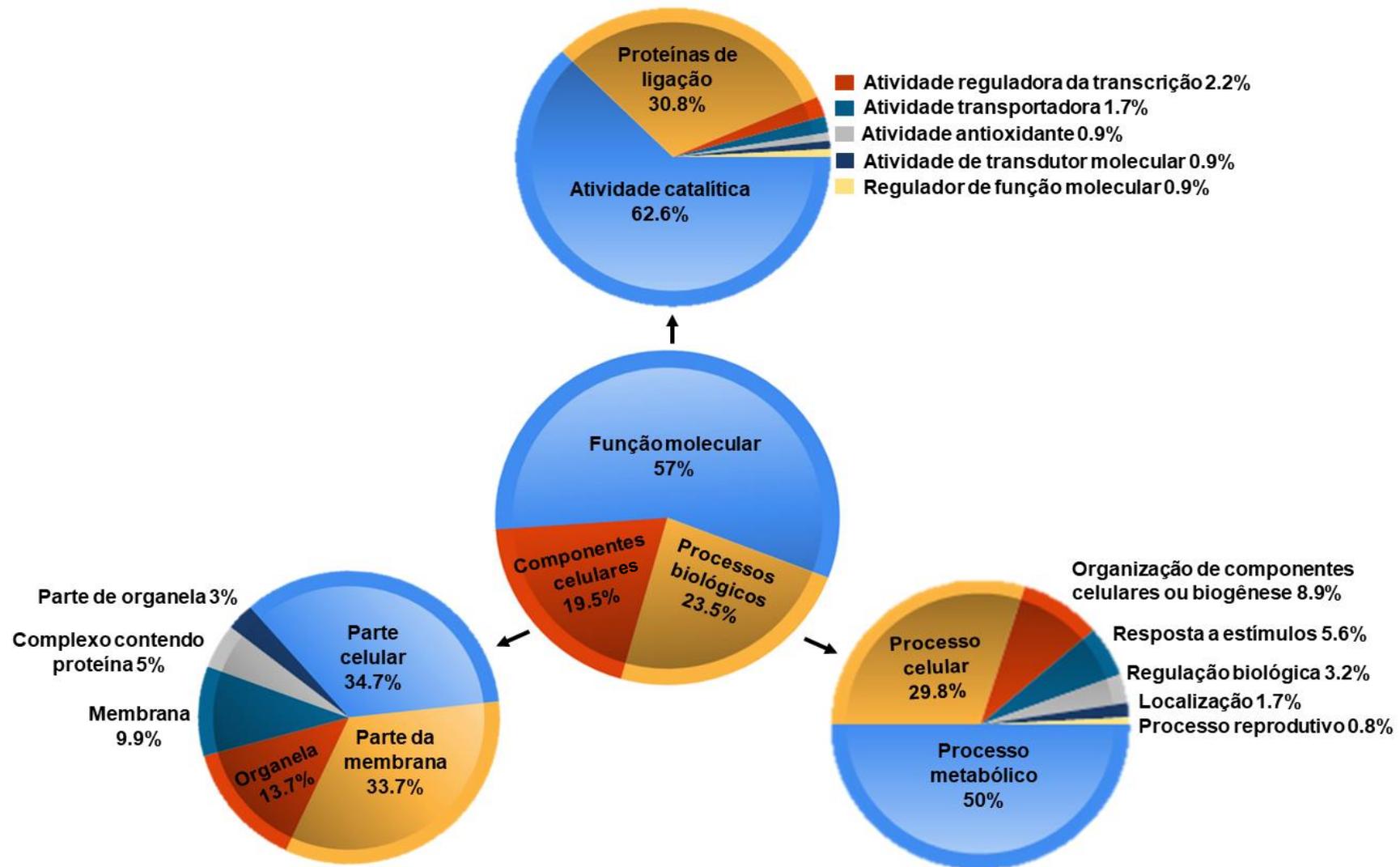


**Gráfico 7.** Distribuição das classes de proteínas identificadas no secretoma do fungo *Fusarium solani* (CFAM 1313), independente da temperatura submetida, demonstrada em porcentagem.

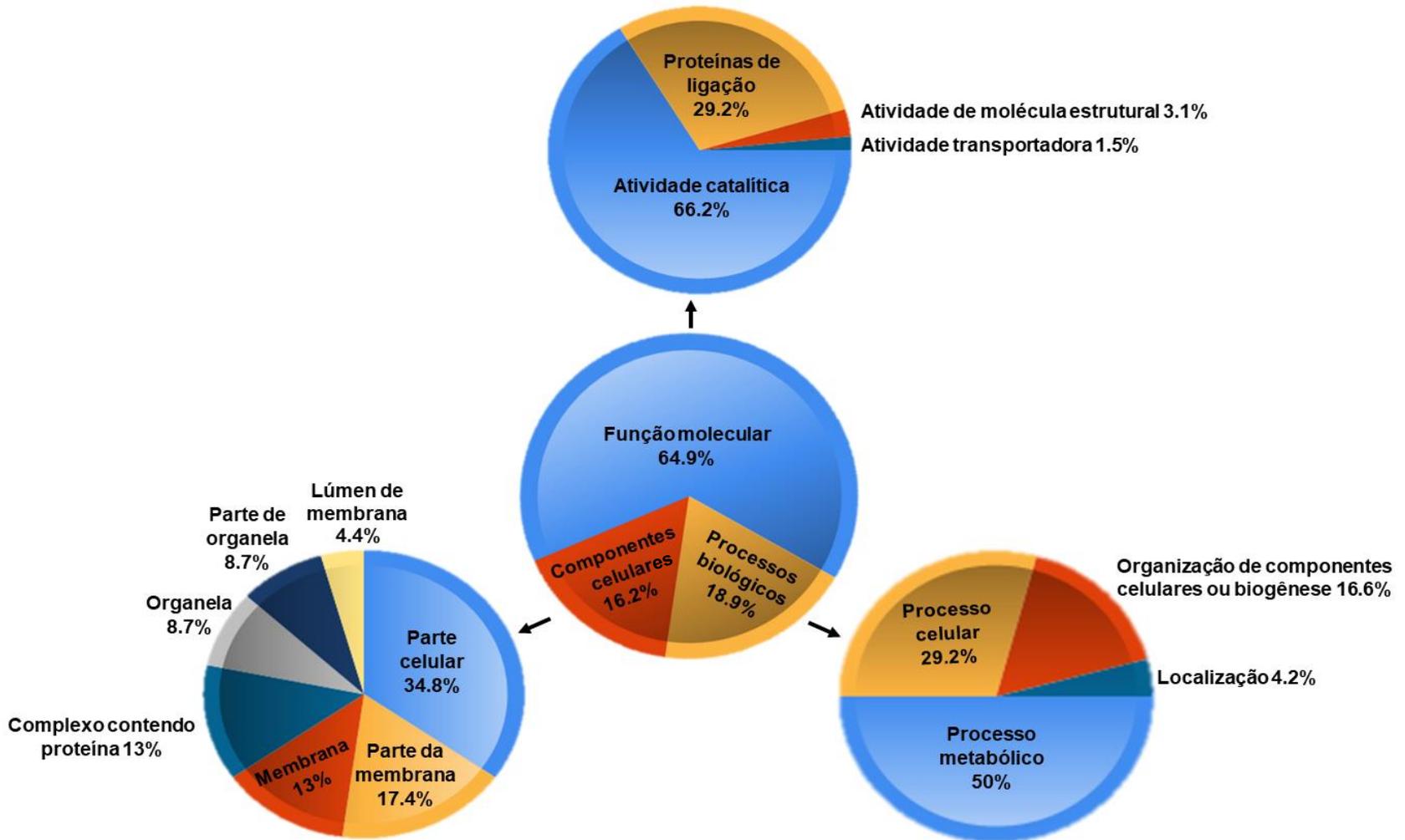
De forma geral, mais da metade do secretoma tanto de *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) quanto de *Fusarium solani* (CFAM 1313), independente da temperatura submetida, é composto por proteínas relacionadas à função molecular (GO 0003674), sendo 57% para *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) e 64,9% para *Fusarium solani* (CFAM 1313); mais especificamente referente a atividade catalítica (GO 0003824) de 62,6% e 66,2%, respectivamente, como é representado nos gráficos 8 e 9.

Dentre essas proteínas identificadas com atividade catalítica estão incluídas proteases, como protease aspártica e carboxipeptidase; fosfolipases, como lisofosfolipases e fosfolipase C; amilases, como glicoamilase e alfa-amilase e também celulases, como beta-glucosidase e beta-1,3-endoglucanase para *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308). Semelhantemente, *Fusarium solani* (CFAM 1313) também expressou protease, como carboxipeptidase; além de xilanase, como a beta-xilanase; e glicosil hidrolases das famílias 28 e 55.

Tais proteínas podem exercer funções específicas no ciclo de vida fúngica, principalmente com relação a sua nutrição. Proteínas secretadas, com atividade catalítica, como essas que foram identificadas, são capazes de digerir moléculas maiores a fim de obter fontes de carbono para serem absorvidas como nutrientes, garantindo a sobrevivência do organismo (PANKE-BUISSE et al., 2015; WALKER & WHITE, 2017).



**Gráfico 8.** Resultado da análise no *Gene Ontology* de *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308), demonstrando as funções das proteínas identificadas em porcentagem no secretoma do fungo.



**Gráfico 9.** Resultado da análise no *Gene Ontology* de *Fusarium solani* (CFAM 1313), demonstrando as funções das proteínas identificadas em porcentagem no secretoma deste microrganismo.

Também foram encontradas proteínas relacionadas a processos biológicos (GO 0008150) com um total de 23.5% para *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) e 18.9% para *Fusarium solani* (CFAM 1313), com maior porcentagem para processo metabólico (GO 0008152) sendo 50% para ambos os fungos (Gráficos 8 e 9). Um exemplo de proteína identificada com função metabólica de *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) foi a oxalato descarboxilase, que é responsável pelo catabolismo do ácido oxálico, gerando subprodutos como ácido fórmico, dióxido de carbono e água. Em fungos, essa proteína está relacionada com a regulação quantitativa de ácido oxálico no meio intra e extracelular, deixando a célula e o ambiente menos ácidos e propícios para seu desenvolvimento (DA SILVA, 2010; MÄKELÄ et al., 2010).

Outro exemplo de proteína identificada de *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) relacionada a processo metabólico é a indoleamina 2,3-dioxigenase, que é capaz de catalisar o aminoácido Triptofano, sendo conhecida como uma potente enzima imunorreguladora em mamíferos (MUNN et al., 2005), mas que em fungos tem função de caráter energético relacionada à obtenção de NAD<sup>+</sup> (nicotinamida-adenina-dinucleotídeo) pela via quinurenina (CARDOSO et al., 2015).

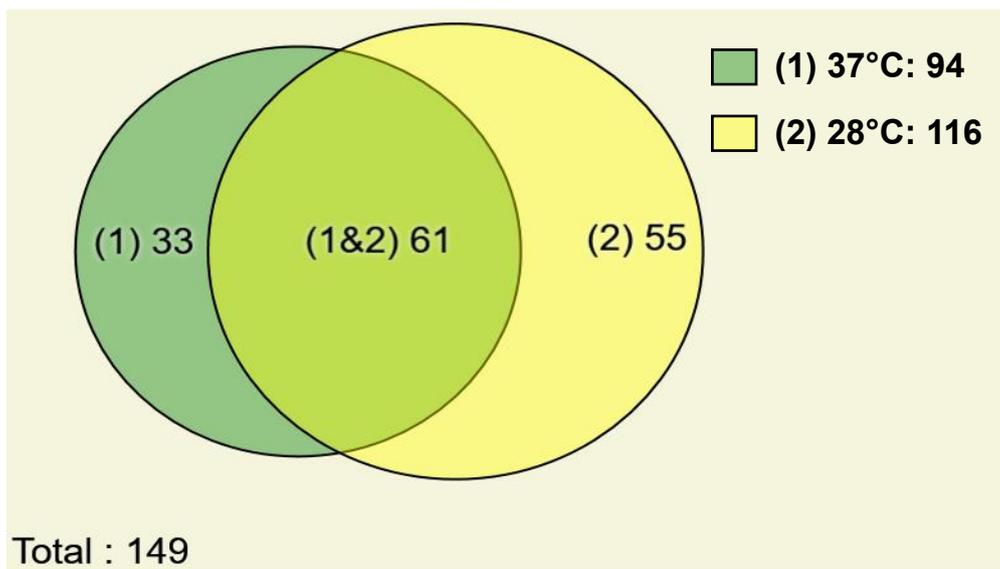
Já dentro dos 50% das proteínas de *Fusarium solani* (CFAM 1313) com função metabólica, a maioria foi identificada como proteínas não caracterizadas. Dentre as proteínas caracterizadas associadas a processos metabólicos, tem-se a beta-xilanase que está envolvida no catabolismo de polissacarídeos (PEREIRA et al., 2013).

Além disso, foram identificadas proteínas pertencentes a componentes celulares (GO 0005575), sendo 19.5% para *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308), principalmente da parte celular (GO 0044464) (34.7%), como por exemplo o antígeno nuclear de proliferação celular; e parte da membrana (GO 0044425) (33.7%), como a 1,3-beta-glucanosiltransferase (Gráfico 8). O antígeno nuclear de proliferação celular é uma proteína evolutivamente bem conservada encontrada em células eucarióticas, mais especificamente no núcleo, tendo sua função relacionada com a regulação do ciclo celular e/ou na replicação do DNA, sendo importante no desenvolvimento dos organismos, incluindo os fungos (STRZALKA & ZIEMIENOWICZ, 2010). Já a 1,3-beta-glucanosiltransferase é uma proteína parte da membrana que tem ligação com o alongamento das cadeias de 1,3-beta-glucano, sendo crucial para a morfogênese da parede celular fúngica e seu crescimento micelial (GASTEBOIS et al., 2010).

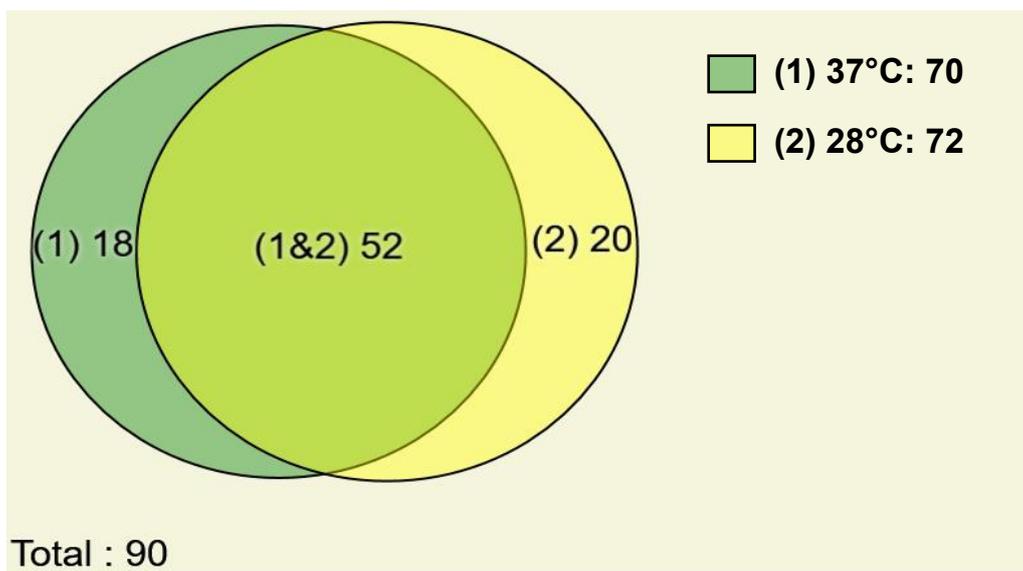
Já para *Fusarium solani* (CFAM 1313), 16.2% das proteínas identificadas são componentes celulares, predominando proteínas de parte celular (34.8%); porém, a maioria sem caracterização até o momento (Gráfico 9). Outras proteínas se destacaram por ser parte da membrana (17.4%), como a 1,3-beta-glucanosiltransferase semelhantemente ao *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) e a membrana plasma H<sup>+</sup>-ATPase, uma bomba de prótons que é o principal componente proteico da membrana plasmática em fungos. Esta desempenha uma função fundamental na fisiologia celular, fazendo o controle de funções celulares essenciais, incluindo absorção de nutrientes e regulação do pH intracelular (AZEVEDO et al., 2016).

### 5.5.6 Análise diferencial dos secretomas

Na análise diferencial foram identificadas proteínas únicas, tanto a 28°C quanto a 37°C, assim como aquelas compartilhadas entre essas temperaturas, sendo representadas abaixo pelos diagramas de Venn para ambos os fungos. Para *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) foram identificadas 33 proteínas exclusivas à temperatura de 37°C, 55 proteínas à 28°C e 61 proteínas compartilhadas entre as temperaturas (Gráfico 10). Já para *Fusarium solani* (CFAM 1313), identificou-se 18 proteínas exclusivas a 37°C, 20 exclusivas a 28°C e 52 presentes em ambas as temperaturas (Gráfico 11).



**Gráfico 10.** Diagrama de Venn de *Trichoderma harzianum* (CFAM 1313) comparando as proteínas identificadas unicamente a 37°C (verde), 28°C (amarelo), e ainda as compartilhadas entre as temperaturas (verde claro).

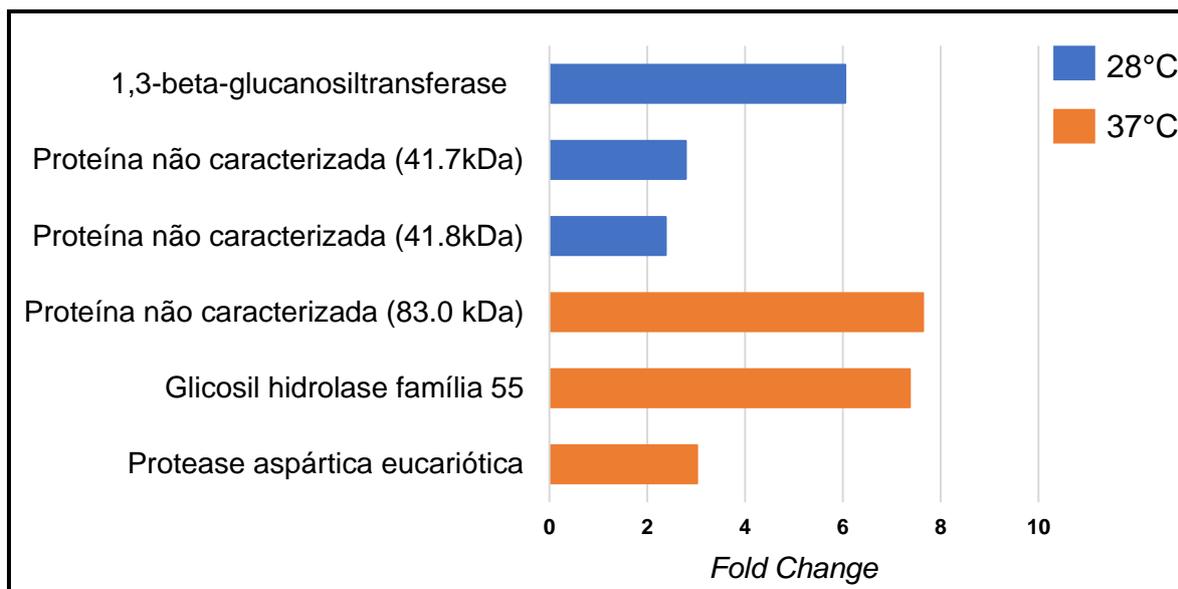


**Gráfico 11.** Diagrama de Venn de *Fusarium solani* (CFAM 1313) comparando as proteínas identificadas unicamente a 37°C (verde), 28°C (amarelo), e ainda as compartilhadas entre as temperaturas (verde claro).

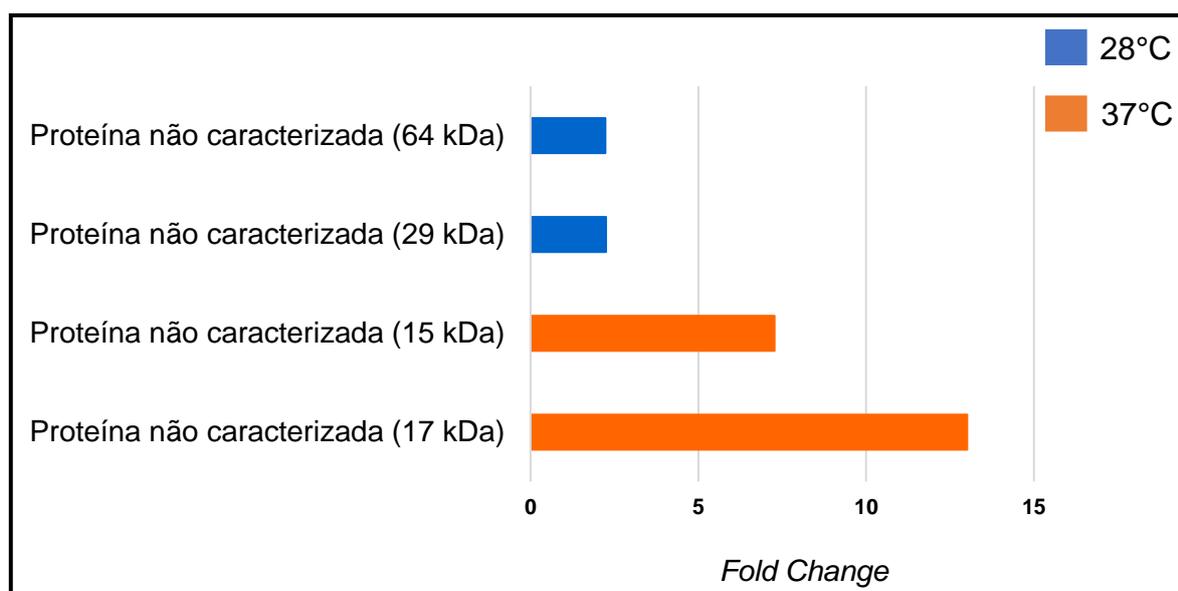
Além disso, também foi possível verificar algumas proteínas mais abundantes tanto a 28°C quanto a 37°C (Gráficos 12 e 13). Para *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308), a proteína mais abundante a 28°C foi a 1,3-beta-glucanosiltransferase estando 6.05 vezes mais abundante nessa temperatura em comparação com 37°C, seguida de duas proteínas ainda não caracterizadas, uma de 41.7 kDa e outra de 41.8 kDa, estando 2.79 e 2.38 vezes mais abundante a 28°C que a 37°C, respectivamente (Gráfico 12).

Já as proteínas mais abundantes a 37°C, estão inclusas uma proteína não caracterizada de 83 kDa, uma glicosil hidrolase da família 55 e uma protease aspártica eucariótica. Tais proteínas estão, respectivamente, 7.64, 7.37 e 3.02 vezes mais abundante na temperatura de 37°C em comparação com 28°C, como é demonstrado no gráfico 12

Para o fungo *Fusarium solani* (CFAM 1313), as proteínas mais abundantes de ambas as temperaturas são não caracterizadas. Na temperatura de 28°C, a mais abundante é uma de 29 kDa, seguida de uma de 64 kDa, estando, respectivamente, 2.25 e 2.23 vezes mais abundante nessa temperatura em comparação com 37°C. Já a 37°C, foram observadas uma de 17 kDa e outra de 15 kDa, estando, respectivamente, 13 e 7.27 vezes mais abundantes em relação a 28°C (Gráfico 13).



**Gráfico 12.** Proteínas mais abundantes expressas por *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) nas temperaturas de 28°C e 37°C.

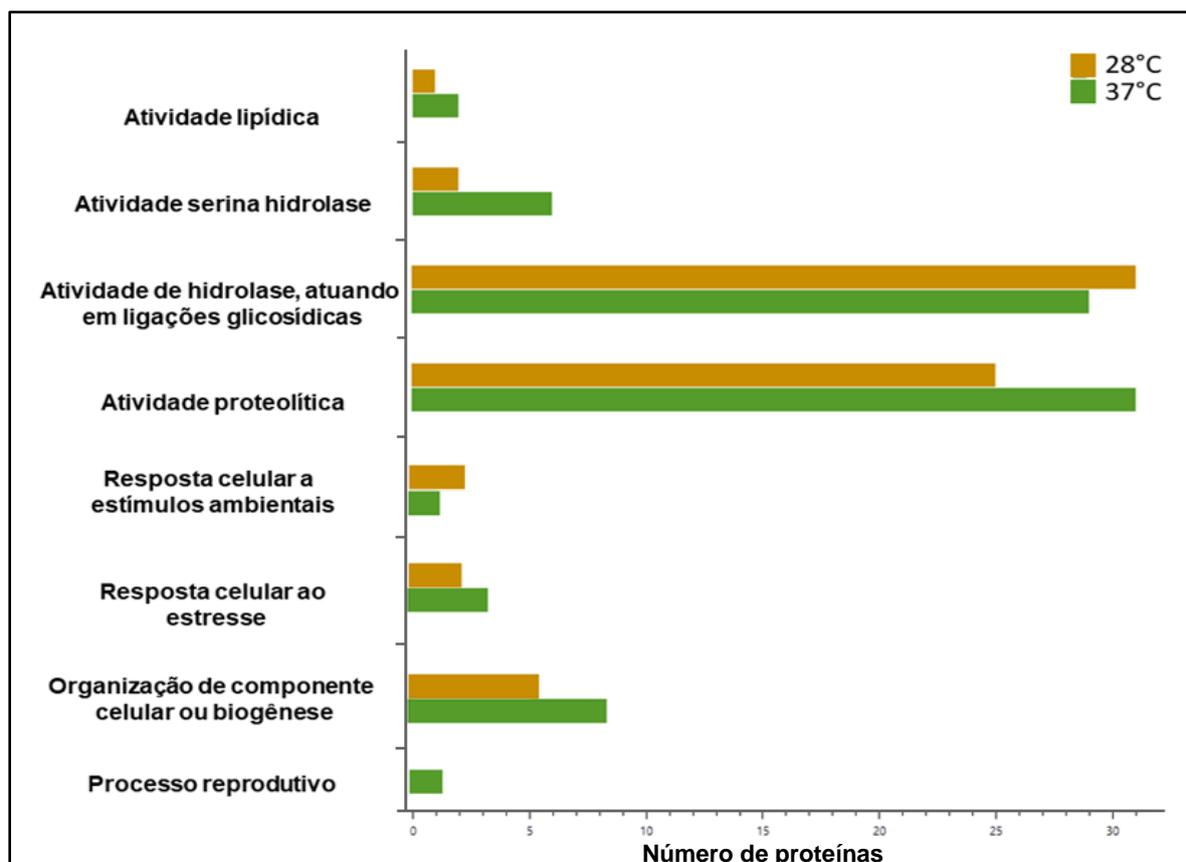


**Gráfico 13.** Proteínas mais abundantes expressas por *Fusarium solani* (CFAM 1313) nas temperaturas de 28°C e 37°C.

Uma análise mais detalhada quanto a algumas funções específicas das proteínas diferenciais foi feita por meio do *Gene Ontology*, como é visto nos gráficos 14 e 15. Foi possível observar que fatores como a temperatura influenciam em determinados processos fisiológicos dos fungos, modulando as proteínas expressas em cada condição. Ambos os fungos estudados apresentaram comportamento proteico diferencial tanto a 28°C quanto a 37°C.

Dessa forma, *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) expressou proteínas relacionadas à hidrólise de ligações glicosídicas e a resposta celular a estímulos ambientais predominantemente a 28°C em comparação a 37°C (Gráfico 14). Proteínas como quitinase 1 e beta-1,3-endoglucanase foram identificadas nessa temperatura, as quais são essenciais para a sobrevivência fúngica na natureza, pois estão relacionadas à defesa contra outros fungos (BERTOLDO & MAZARO, 2018). A competição entre os fungos no ambiente é um processo referente à interação entre dois ou mais organismos, visando um objetivo, como obtenção de nutrientes, espaço ou oxigênio (MACHADO et al., 2012). Essas proteínas identificadas atuam especificamente na quitina e nos glucanos presentes na parede celular desses fungos competidores, auxiliando na sobrevivência do fungo produtor (BERTOLDO & MAZARO, 2018).

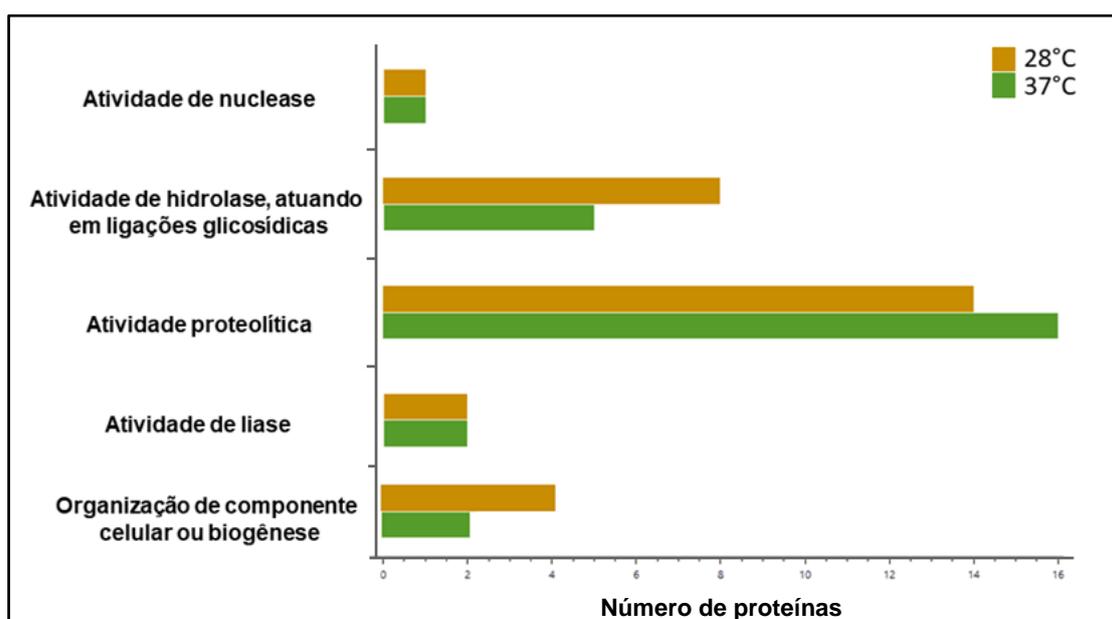
Tal resultado era esperado, já que a maior parte do gênero *Trichoderma* spp. é adaptado ao ambiente e muito conhecido pelo seu potencial para o biocontrole, sendo que cerca de 90% dos isolados pertencentes ao gênero é utilizado como antagonista de fungos fitopatogênicos (MACHADO et al., 2012).



**Gráfico 14.** Distribuição diferencial de proteínas abundantes no secretoma de *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) nas temperaturas de 28°C e 37°C.

Da mesma maneira, *Fusarium solani* (CFAM 1313) também demonstrou maior identificação de proteínas relacionadas à hidrólise de ligações glicosídicas a 28°C (Gráfico 15), especificamente a beta-xilanase. Esse resultado pode ser explicado pelo fato da espécie *Fusarium solani* ser também um fitopatógeno adaptado a natureza (LAZAROTTO, 2013); sendo que essa proteína fundamental na infecção de plantas é essencial na degradação da xilana, um dos principais constituintes das hemiceluloses em muitas espécies vegetais (CUNHA, 2016).

Outros patógenos vegetais já foram identificados como produtores de xilanases, incluindo o fungo *Rhizoctonia solani*, que acomete principalmente plantações de soja, o *Chrysosporthe cubensis*, conhecido por causar cancras em troncos, especialmente em espécies de eucalipto, e o *Fusarium oxysporum*, que causa doença da murcha vascular em diversas espécies de plantas (HERRERA et al., 2004; DE OLIVEIRA et al., 2014; GOMES, 2014).



**Gráfico 15.** Distribuição diferencial de proteínas abundantes no secretoma de *Fusarium solani* (CFAM 1313) nas temperaturas de 28°C e 37°C.

Além disso, diferentemente de *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308), o fungo *Fusarium solani* (CFAM 1313) teve um número maior de proteínas a 28°C relacionadas à organização de componentes celular ou biogênese, que estão ligadas ao processo de reprodução fúngica (Gráfico 15). Este resultado corrobora com os dados iniciais citados no item 5.1, onde foi visto que *Fusarium solani* (CFAM 1313) apresentou maior crescimento micelial a 28°C. Para alguns fungos, a elevação da

temperatura pode comprometer o seu desenvolvimento pois, conforme as temperaturas aumentam, há uma exaustão celular que resulta em menos recursos disponíveis para investir em seu crescimento (KRISHNAN et al., 2018). Isso também pode explicar a alta produção proteolítica expressa a 37°C para tal fungo (Gráfico 15), pois tais proteínas estão relacionadas à nutrição fúngica (WALKER & WHITE, 2017), sugerindo uma tentativa de adaptação a essa temperatura para sua sobrevivência.

Já o fungo *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) na temperatura de 37°C, demonstrou proteínas predominantemente relacionadas ao estresse celular, à atividade catalítica e também àquelas associadas ao desenvolvimento fúngico (Gráfico 14).

Apesar desse fungo ter resposta celular ao estresse, ele demonstrou habilidade de adaptação numa temperatura mais elevada, apresentando um maior número de proteínas relacionadas a sua reprodução bem como replicação celular e proteínas hidrolíticas, incluindo associadas à atividade lipídica, da serina hidrolases e proteolítica em comparação a 28°C. Sugerindo que o fungo *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) tenha uma maior afinidade de reprodução na temperatura de 37°C, podendo facilitar seu desenvolvimento em uma possível infecção em humanos que venha ocorrer. Sendo assim, esses dados corroboram com os resultados iniciais citados no item 5.1 desse trabalho, onde foi visto um crescimento micelial mais acelerado a 37°C, revelando melhor adaptação fúngica a tal temperatura.

### **5.5.7 Proteínas identificadas a 37°C relacionadas à patogênese**

Os secretomas dos fungos também foram analisados buscando proteínas que de alguma forma poderiam auxiliá-los na patogênese em humanos; logo, foi investigado especificamente proteínas presentes na condição onde a temperatura foi 37°C.

Foram detectadas proteínas relacionadas à patogenicidade em ambos os fungos. Para o fungo *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) encontrou-se protease aspártica eucariótica, endotiapepsina, proteinase T, carboxipeptidase, alérgeno asp f7 e lisofosfolipase. Já para *Fusarium solani* (CFAM 1313) foram identificadas a anidrase carbônica e, semelhantemente com *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308), a carboxipeptidase.

O alérgeno asp f7 é uma proteína produzida por fungos, especialmente do gênero *Aspergillus* e ainda não é tão bem caracterizada, porém sabe-se que ela tem

relação com a ativação de uma resposta imune de hipersensibilidade do tipo I (REMENTERIA et al, 2005).

Outras famílias de alérgenos já foram descritas com funções associadas à patogênese em humanos, como por exemplo a Asp f1, sendo relacionada à reação com a IgE de pacientes com aspergilose broncopulmonar alérgica; e a Asp f2, que possui relação com a ligação à laminina, podendo participar da colonização pulmonar (SIMON-NOBBE et al, 2008).

Dessa forma, sugerimos que o fato de *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) secretar a proteína alérgeno asp f7, o torna suscetível a causar algum tipo de reação alérgica no indivíduo que de alguma forma for exposto a ele; pois de maneira geral, os alérgenos impedem uma resposta imune eficiente, gerando alergias no hospedeiro. Contudo, é necessário novos experimentos *in vitro* e/ou *in vivo* para comprovar tal característica nesta espécie (REMENTERIA et al, 2005).

Outra proteína expressa também a 37°C foi a lisofosfolipase, que é uma das proteínas responsáveis pela hidrólise dos fosfolipídeos presentes na membrana celular do hospedeiro (BARMAN et al, 2018), sendo essa proteína classificada como fosfolipase B (REMENTERIA et al, 2005). A atividade de fosfolipases B já foi descrita em bactérias, mamíferos e fungos, especialmente do gênero *Candida* (KÖHLER et al, 2006, YANG, et al., 2014).

Na patogênese da espécie *Candida tropicalis*, há evidências sugerindo que enzimas que utilizam lisofosfolipídios como substratos, medeiam interações adesivas entre células do hospedeiro e o fungo, auxiliando na disseminação fúngica durante a infecção (GHANNOUM, 2000).

Em *Candida albicans* já foi descrito que em infecções acompanhadas de elevada secreção de fosfolipase, foi observada maior invasividade em células epiteliais e maior virulência em modelos *in vivo* com candidíase disseminada (KHOLER et al, 2006).

Já em espécies de *Candida* não-*albicans*, especificamente *Candida glabrata*, a associação entre a presença de atividade da fosfolipase e a candidemia persistente foi mais forte para tal espécie. Adicionalmente, foram demonstradas maiores atividades intermediadas por lisofosfolipase em isolados persistentes comparado com os não persistentes (GHANNOUM, 2000).

De maneira geral, apesar das fosfolipases serem mais estudadas em leveduras, elas são produzidas e secretadas por uma variedade de microrganismos

patogênicos como parte de sua virulência (CARDOSO et al., 2018). Dessa forma, o fato dessas proteínas estarem relacionadas à clivagem de um importante constituinte da membrana celular hospedeira, aumenta a probabilidade de participarem do processo de invasão e aderência celular mediada por diversos tipos de microrganismos (SCHALLER et al, 2005, GERALDINO et al, 2016).

No secretoma de *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) também foram identificadas diversas proteases, incluindo uma endotiapepsina e uma denominada como protease aspártica eucariótica. A endotiapepsina já foi detectada no secretoma do fungo *Lasiodiplodia theobromae* quando cultivado a 37°C, sendo relacionada à patogênese humana (FÉLIX et al., 2016). Já as proteases aspárticas são descritas como importante fator de virulência em fungos por estarem relacionadas à evasão imune e a invasão tecidual (YIKE 2011; SILVA-ROCHA et al, 2015). A produção dessas enzimas é considerada uma adaptação evolutiva de patógenos na utilização de nutrientes e sobrevivência no ambiente hospedeiro (MONIKA et al, 2017).

No processo de evasão imunológica, o comprometimento da cascata do sistema complemento ocasionada por proteases aspárticas já foi relatado em *Candida Albicans* (YIKE, 2011). Tal sistema é essencial para a defesa do hospedeiro e consequente eliminação do patógeno, sendo uma cascata composta por proteínas altamente reguladas que, quando acionadas, resulta em um complexo proteico de ataque à membrana, a qual penetra a parede celular dos microrganismos causando apoptose (SHERRINGTON et al, 2017).

Estudos afirmam que a secreção de proteases aspárticas tanto por fungo quanto bactéria pode afetar o bom funcionamento do sistema complemento por desativar componentes importantes como as proteínas C2, C3b, C4b e C5, além de impossibilitar a formação do complexo complemento terminal (TCC) (GROPP et al, 2009, AMAMURA et al, 2017). Elas também possuem a capacidade de degradar algumas imunoglobulinas, como a IgA, facilitando a permanência e desenvolvimento do microrganismo no hospedeiro (BRAGA-SILVA & SANTOS, 2011). Adicionalmente, tais proteínas são capazes de degradar determinados componentes da matriz extracelular, como queratina, colágeno, laminina, fibronectina, vimentina e mucina, permitindo a disseminação fúngica no interior do tecido hospedeiro (BRAGA-SILVA, 2011; SILVA-ROCHA et al, 2015, FÉLIX et al., 2016). Exemplo disso pode-se citar o fungo filamentoso *Aspergillus fumigatus*, onde essas proteínas desempenham um importante papel em uma infecção grave conhecida como aspergilose invasiva, sendo

responsáveis pela hidrólise de proteínas estruturais presentes nos pulmões, como elastina, colágeno e laminina, agravando a infecção (MANDUJANO-GONZALEZ et al., 2016).

Outra protease expressa por *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) foi a Proteinase T, uma serina protease já identificada no fungo *Tritirachium album limber*, com estabilidade térmica, não sofrendo desnaturação inclusive em temperaturas mais elevadas como 50°C (SAMA et al., 1996). Tal característica pode explicar o fato dela ter sido identificada apenas na temperatura de 37°C.

As serinas proteases já foram descritas para fungos demonstrando atividade extracelular para *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Histoplasma capsulatum* e *Paracoccidioides brasiliensis*, sendo associadas ao estilo de vida patogênico dos fungos (MUSZEWSKA et al., 2017).

Ainda dentro da classe das proteases, foi identificada a carboxipeptidase para ambos os fungos em 37°C. Tais proteínas são exopeptidases já encontradas em secretomas de fungos patogênicos como do gênero *Aspergillus* e dermatófitos, por exemplo *Trichophyton rubrum* e *Pseudogymnoascus destructans* (MONOD et al., 2002; ZAUGG et al., 2008; CHINNAPUN, 2015; BEEKMAN et al., 2018).

De forma geral, há uma variedade de peptidases secretadas por fungos que promovem a patogênese. Em dermatófitos humanos, como *Pseudogymnoascus destructans*, as carboxipeptidases são essenciais para o sucesso da infecção, uma vez que desempenham funções tanto na aquisição de nutrientes quanto na invasão e aderência de tecidos do hospedeiro (BEEKMAN et al., 2018).

Por fim, em *Fusarium solani* (CFAM 1313) a proteína anidrase carbônica foi expressa, podendo ser relacionada também a patogênese fúngica. Essa proteína é uma metaloenzima com importante papel na hidratação reversível de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) para o íon bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), sendo importante na infecção. Durante esse processo, é necessário que haja uma adaptação fúngica no interior do organismo, sendo que uma das dificuldades encontradas é a alteração da concentração de CO<sub>2</sub>, mudando de 0,033% no ambiente para até 6% nos tecidos do hospedeiro (CANELA, 2013). Em diversos organismos, desde bactéria até humanos, as anidrases carbônicas desempenham funções essenciais em processos biológicos, disponibilizando altas quantidades de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou CO<sub>2</sub> para reações anapleróticas ou biossintéticas (ELLEUCHE & PÖGGELER, 2010). Essas proteínas estão relacionadas ao mecanismo de concentração de carbono em cianobactérias, na

biossíntese de DNA, ácidos graxos e aminoácidos; e têm sido associadas à sobrevivência, proliferação e diferenciação de patógenos, tanto dentro quanto fora de seus hospedeiros (SUPURAN et al., 2016).

Tais enzimas já foram indicadas como importantes na virulência e desenvolvimento de patógenos como *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori*, *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans* (MORISHITA et al., 2008, ELLEUCHE & PÖGGELER, 2010; CANELA, 2013).

Portanto, ambos os fungos apresentaram proteínas que sugerem um perfil patogênico. Processos como invasão e aderência celular, hipersensibilidade do tipo 1, evasão imunológica e sobrevivência em ambiente com elevada concentração de CO<sub>2</sub> foram correlacionados com as proteínas identificadas na temperatura de 37°C para *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) assim como para *Fusarium solani* (CFAM 1313). Tais observações sugerem um potencial de adaptação fúngica a temperatura humana, oferecendo risco a indivíduos que de alguma forma forem expostos a esses fungos, como é o caso dos habitantes da comunidade Lago do Limão, no Amazonas.

## 6. CONCLUSÃO

Com os dados obtidos neste trabalho, foi possível observar que os fungos estudados apresentam diferenças relevantes em relação aos seus comportamentos frente as temperaturas submetidas. Quanto a seus crescimentos, *Fusarium solani* (CFAM 1313) demonstrou melhor adaptação à 28°C e *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) à 37°C, além de demonstrar que microscopicamente *Fusarium solani* (CFAM 1313) mostrou maior esporulação aparente a 37°C.

Em relação aos ensaios qualitativos, ambos os fungos demonstraram positividade para a produção de protease, fosfolipase e urease a 37°C, sugerindo um perfil patogênico inicial, já que tais enzimas podem ser associadas à patogênese em humanos.

Já com relação a produção proteica secretada por esses organismos, com base nos dados estatísticos para a produção de proteases e proteínas totais, o período que mais se destacou foi 192 horas para *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) e 48 horas para *Fusarium solani* (CFAM 1313), demonstrando que os fungos apresentam momentos diferentes de adaptação ao ambiente e/ou à nutrição, sugerindo características metabólicas distintas. Adicionalmente, ao comparar as proteínas extraídas do secretoma em ambas as temperaturas, verificou-se um melhor rendimento de ambos os fungos na temperatura de 28°C.

Além disso, foi possível observar por meio da eletroforese unidimensional um perfil proteico diferencial entre as amostras de 28°C e 37°C de cada cultura fúngica e através da *shotgun proteomics* foram identificadas proteínas que podem ser associadas à virulência, quando se trata da temperatura a 37°C, ou relacionadas à atividades ambientais quando encontradas em 28°C. Isso evidencia o potencial de adaptação dos fungos, especialmente a temperatura corporal, produzindo proteínas, como por exemplo, proteases aspárticas, lisofosfolipase ou carboxipeptidase; sugerindo assim, perfis patogênicos de ambos os fungos e consequente risco à saúde da comunidade de onde foram isolados.

Portanto, tais observações sugerem características diferenciais entre *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) e *Fusarium solani* (CFAM 1313), como fatores de virulência, crescimento fúngico, metabolismo celular e/ou produção proteica de acordo com a temperatura submetida. Fornecendo assim, informações interessantes que podem auxiliar futuramente na maior compreensão das propriedades

patogênicas que possam estar relacionadas à interação desses microrganismos com o hospedeiro humano.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, Fabiana Greyce Oliveira; DE AQUINO, Priscila Ferreira; CHALUB, Sidney Raimundo S; *et al.* Proteomic assessment of colorectal cancers and respective resection margins from patients of the Amazon state of Brazil. **Journal of proteomics**, v. 154, p. 59–68, 2017.

ALVES, Fernanda et al. Virulence factors of fluconazole-susceptible and fluconazole-resistant *Candida albicans* after antimicrobial photodynamic therapy. **Lasers in medical science**, v. 32, n. 4, p. 815-826, 2017.

AMAMURA, Thais A; FRAGA, Tatiana R; VASCONCELLOS, Sílvio A; *et al.* Pathogenic *Leptospira* secreted proteases target the membrane attack complex: a potential role for thermolysin in complement inhibition. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 958, 2017.

ANDRADE, Vânia Sousa; SARUBBO, Leonie Asfora; FUKUSHIMA, Kasutaka; *et al.* Production of extracellular proteases by *Mucor circinelloides* using D-glucose as carbon source/substrate. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 106–110, 2002.

ANDREOLA, Patrícia; COLOMBO, Filipe Augusto; DEMATHÉ, Adriana; *et al.* Atividade de fosfolipase do gênero *Candida*. *In*: **Congresso de Pesquisa e Extensão da Faculdade da Serra Gaúcha**. 2015, v. 3, p. 903–905.

AQUINO, Priscila Ferreira de. Prospecção de candidatos a biomarcadores oncológicos de cânceres gástricos por espectrometria de massas. UFAM, 2012.

AQUINO, Priscila Ferreira de. Avaliação proteômica da margem de ressecção de pacientes com câncer gástrico por espectrometria de massas. UFRJ, 2015.

ARDREY, Robert E. Liquid chromatography. **Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction**, p. 7–31, 2003.

ARVANITIS, Marios; ANAGNOSTOU, Theodora; FUCHS, Beth Burgwyn; *et al.* Molecular and nonmolecular diagnostic methods for invasive fungal infections. **Clinical microbiology reviews**, v. 27, n. 3, p. 490–526, 2014.

AZEVEDO, M M; GUIMARÃES-SOARES, L; PASCOAL, Cláudia; *et al.* Copper and zinc affect the activity of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase and thiol content in aquatic fungi. **Microbiology**, v. 162, n. 5, p. 740–747, 2016.

BALDIN, Clara; VALIANTE, Vito; KRÜGER, Thomas; *et al.* Comparative proteomics of a tor inducible *Aspergillus fumigatus* mutant reveals involvement of the Tor kinase in iron regulation. **Proteomics**, v. 15, n. 13, p. 2230–2243, 2015.

BARMAN, Ananya *et al.* Phospholipases play multiple cellular roles including growth, stress tolerance, sexual development, and virulence in fungi. *Microbiological research*, v. 209, p. 55-69, 2018.

BEEKMAN, Chapman; JIANG, Zhenze; SUZUKI, Brian M; *et al.* Characterization of PdCP1, a serine carboxypeptidase from *Pseudogymnoascus destructans*, the causal agent of White-nose Syndrome. **Biological chemistry**, v. 399, n. 12, p. 1375–1388, 2018.

BEHNSEN, Judith *et al.* Secreted *Aspergillus fumigatus* protease Alp1 degrades human complement proteins C3, C4, and C5. **Infection and immunity**, v. 78, n. 8, p. 3585-3594, 2010.

BERTOLDO, Edson; MAZARO, Sérgio Miguel.  $\beta$ -1, 3 Glucanases: uma revisão sob a ótica da defesa vegetal. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 17, n. 1, p. 1–13, 2018.

BEYHAN, Sinem; GUTIERREZ, Matias; VOORHIES, Mark; *et al.* A temperature-responsive network links cell shape and virulence traits in a primary fungal pathogen. **PLoS biology**, v. 11, n. 7, p. e1001614, 2013.

BRAGA-SILVA, A L.; SANTOS, L S A. Aspartic protease inhibitors as potential anti-*Candida albicans* drugs: impacts on fungal biology, virulence and pathogenesis. **Current medicinal chemistry**, v. 18, n. 16, p. 2401-2419, 2011.

BUENO, César Júnior; FISCHER, Ivan Herman; ROSA, Daniel Dias; *et al.* Produção de enzimas extracelulares por *Fusarium solani* de maracujazeiro amarelo. **Tropical Plant Pathology**, p. 343–346, 2009.

BUDZYŃSKA, Aleksandra *et al.* Enzymatic profile, adhesive and invasive properties of *Candida albicans* under the influence of selected plant essential oils. **Acta Biochimica Polonica**, v. 61, n. 1, 2014.

CAMPOS, Felipe Lopes; BARONI, Francisco De Assis. Isolados de *Cryptococcus neoformans*, *C. gattii* e *C. laurentii* produtores de protease e fosfolipase. **Revista de Patologia Tropical**, v. 39, n. 2, p. 83–90, 2010.

CANELA, Heliara Maria Spina. Análise molecular da anidrase carbônica no fungo patogênico humano *Aspergillus fumigatus*. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2013.

CANTÚ, Marcelo Delmar; CARRILHO, Emanuel; WULFF, Nelson Arno; *et al.* Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Química nova**, p. 669–675, 2008.

CARDOSO, Fernanda; BRUNO, Carlos E Malavasi; RAMOS, Cristiane C; *et al.* Expressão da enzima indoleamina-2, 3-dioxigenase em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). **Pesq. Vet. Bras**, v. 35, n. 10, p. 863–870, 2015.

CARDOSO, Pedro Henrique Magalhães; DOS SANTOS, Rennan Luiz Oliveira; SOUZA, Ana Clara; *et al.* Biosynthesis of phospholipases and proteinases using clinical and environmental strains of *Cryptococcus neoformans*. **Clinical and Laboratorial Research in Dentistry**, 2018.

CARVALHO, Paulo C; LIMA, Diogo B; LEPREVOST, Felipe V; *et al.* Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0. **Nature protocols**, v. 11, n. 1, p. 102–117, 2016.

CARVALHO, Paulo C; YATES III, John R; BARBOSA, Valmir C. Analyzing shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics. **Current protocols in bioinformatics**, p. 13, 2010.

CASTRO, Simone Vieira; LOBO, Carlos Henrique; FIGUEIREDO, José Ricardo; *et al.* Proteínas de choque térmico hsp 70: Estrutura e atuação em resposta ao estresse celular. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 7, n. 4, p. 261–271, 2014.

CHAMBERGO, Felipe S; VALENCIA, Estela Y. Fungal biodiversity to biotechnology. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 6, p. 2567–2577, 2016.

CHAUDHURY, Indrajit; STROIK, Daniel R; SOBECK, Alexandra. FANCD2-controlled chromatin access of the Fanconi-associated nuclease FAN1 is crucial for the recovery of stalled replication forks. **Molecular and cellular biology**, p. MCB-00457, 2014.

CHINNAPUN, Dutsadee. Virulence factors involved in pathogenicity of dermatophytes. **Walailak Journal of Science and Technology (WJST)**, v. 12, n. 7, p. 573–580, 2015.

CORABI-ADELL, Carlo. Biodiversidade do gênero *Trichoderma* (Hypocreales-Fungi) mediante técnicas moleculares e análise ecofisiográfica. 2005.

CHIARADIA, Mariza C; COLLINS, Carol H; JARDIM, Isabel C S F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química nova**, 2008.

CORREA, Juliana Ferraz de. Análise proteômica do fungo *Cryptococcus gattii* em diferentes temperaturas. 2009.

CUNHA, Luana Lima da. Purificação e caracterização bioquímica e biofísica de uma xilanase de *Aspergillus foetidus*. 2016.

DASARI, Surendra; THEIS, Jason D; VRANA, Julie A; *et al.* Tissue Shotgun Proteomics: Applications to the Clinical Laboratory. **Biophysical Journal**, v. 106, n. 2, p. 1a–2a, 2014.

DA SILVA, Leonardo Ferreira. Expressão de oxalato descarboxilase de *Flammulina* sp. em *Nicotiana tabacum* induz resistência a nep ii de *Moniliophthora perniciosa* e oxalato. UESC, 2010

DEEPA, K; JEEVITHA, T; MICHAEL, A. In vitro evaluation of virulence factors of *Candida* species isolated from oral cavity. **Journal of Microbiology and Antimicrobials**, v. 7, n. 3, p. 28–32, 2015.

DELABONA, Priscila da Silva et al. Produção de glicosil hidrolases por *Trichoderma harzianum* para o processo de sacarificação da biomassa vegetal. 2015.

DENNING, David W; CHAKRABARTI, Arunaloke. Pulmonary and sinus fungal diseases in non-immunocompromised patients. **The Lancet Infectious Diseases**, 2017.

DE GODOY, Isabela; JESUS DE PAULA, Daphine Ariadne; MARQUES DA SILVEIRA, Marcelo; et al. Expressão diferencial de proteínas do fungo *Conidiobolus lamprauges* cultivado em diferentes temperaturas. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, 2014.

DE OLIVEIRA, Dagoberto Martins; JÚNIOR, Daniel Alves Ferreira; DO PRADO, Eduardo Guimarães; *et al.* Proteomas. **Revista Práxis**, v. 1, n. 2, 2017.

DE OLIVEIRA, Erica Aparecida Santos; REIS, Aline Aparecida; DE LIMA FRACHIA, Caroline; *et al.* Produção de xilanase e celulase pelo patógeno *Rizoctonia solani* AG1-IA em cultura de soja. **Ciência & Tecnologia Fatec-JB**, v. 6, n. esp., 2014.

DE SOUZA, T.; DE ARAÚJO, C.; RODRIGUES, J.; FILHO, R.; FERNANDES, O. Análise quantitativa da produção de proteases por *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp da Coleção de Fungos da Amazônia – CFAM/FIOCRUZ- AM em diferentes condições de cultivo. **Scientia Amazonia**, v.4, n.2, 107-113, 2015.

DI COLOGNA, Nicholas de Mojana. Análise comparativa de complexos multienzimáticos do secretoma de *Trichoderma harzianum* cultivado em bagaço de cana e fontes definidas de carbono. 2017.

DOOHAN, F M.; BRENNAN, J.; COOKE, B.M. Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. **European Journal of Plant Pathology**, v. 109, n. 7, p. 755–768, 2003.

DONG, Bo; XU, Xiaojin; CHEN, Guoqing; *et al.* Autophagy-associated alpha-arrestin signaling is required for conidiogenous cell development in *Magnaporthe oryzae*. **Scientific reports**, v. 6, p. 30963, 2016.

DONNARUMMA, Fabrizio; MURRAY, Kermit K. Laser ablation sample transfer for localized LC-MS/MS proteomic analysis of tissue. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 51, n. 4, p. 261–268, 2016.

DOS SANTOS, Thaianie Dantas Dias; RIBEIRO, Patrícia Miranda Leite; DE REZENDE, Renata Portela; *et al.* Fungal and viral oral infections in individuals with onco-hematologic neoplasms in a University Hospital. **Brazilian Journal of Oral Sciences**, v. 15, n. 4, p. 315–319, 2016.

DRUZHININA, Irina S; SEIDL-SEIBOTH, Verena; HERRERA-ESTRELLA, Alfredo; *et al.* *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 10, p. 749–759, 2011.

ELIAS, Joshua E.; GYGI, Steven P. Target-decoy search strategy for mass spectrometry-based proteomics. In: **Proteome bioinformatics**. Humana Press, 2010. p. 55-71.

ELLEUCHE, Skander; PÖGGELER, Stefanie. Carbonic anhydrases in fungi. **Microbiology**, v. 156, n. 1, p. 23-29, 2010.

EMIDIO, Nayara Braga; CARPANEZ, Arthur Girardi; QUELLIS, Leonardo Ramos; *et al.* Proteômica: uma introdução aos métodos e aplicações. **HU Revista**, v. 41, n. 3 e 4, 2016.

ENG, J. K.; JAHAN, T. A.; HOOPMANN, M. R. Comet: an open-source MS/MS sequence database search tool. **Proteomics**, v. 13, n. 1, p. 22–24. doi: 10.1002/pmic.201200439, 2013.

FEDER, Vanessa; KMETZSCH, Livia; STAATS, Charley Christian; *et al.* Cryptococcus gattii urease as a virulence factor and the relevance of enzymatic activity in cryptococcosis pathogenesis. **The FEBS journal**, v. 282, n. 8, p. 1406–1418, 2015.

FÉLIX, Carina *et al.* Temperature modulates the secretome of the phytopathogenic fungus Lasiodiplodia theobromae. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 1096, 2016.

FENN, John B; MANN, Matthias; MENG, Chin Kai; *et al.* Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science**, v. 246, n. 4926, p. 64–71, 1989.

FERNANDES, Ana Carolina Loureiro Brito. Estudo de fatores de virulência e de estresse oxidativo na produção de biossurfactante do tipo ramnolípido por *Pseudomonas aeruginosa* PA1. 2010.

FERNÁNDEZ-ARENAS, Elena *et al.* Integrated proteomics and genomics strategies bring new insight into *Candida albicans* response upon macrophage interaction. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 6, n. 3, p. 460-478, 2007.

FERRÃO-GONZALES, Astria Dias; VITAL, Arabella Varjão Damaceno; LIMA, Jamille Macedo; *et al.* Desenvolvimento sustentável para o resgate da cultura do cacau baseado no aproveitamento de resíduos. **Interfaces Científicas-Saúde e Ambiente**, v. 1, n. 2, p. 41–52, 2013.

FIGUEIREDO-CARVALHO, Maria Helena Galdino; RAMOS, Livia de Souza; BARBEDO, Leonardo Silva; *et al.* Relationship between the Antifungal Susceptibility Profile and the Production of Virulence-Related Hydrolytic Enzymes in Brazilian Clinical Strains of *Candida glabrata*. **Mediators of inflammation**, 2017.

FIPKE, Glauber Monçon; PAZINI, Juliano De Bastos; DE AVELLAR, Matheus; *et al.* Efeito Da Temperatura No Crescimento Micelial De Possíveis Antagonistas Fúngicos Ao Sclerotinia Sclerotiorum. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 1, n. 1, 2009.

FLEURI, Luciana Francisco; SATO, Hélia Harumi. Estudo da influência de diferentes parâmetros na produção de enzimas líticas. **Food Science and Technology** (Campinas), 2008.

GASTEBOIS, Amandine; FONTAINE, Thierry; LATGÉ, Jean-Paul; *et al.*  $\beta$  (1-3) glucanosyltransferase Gel4p is essential for *Aspergillus fumigatus*. **Eukaryotic cell**, v. 9, n. 8, p. 1294–1298, 2010.

GERALDINO, Thais Herrero; DA COSTA, Tânia Maris Pedrini Soares; BRUNNQUELL, Cláudia Roberta; *et al.* Dimorfismo, produção de enzimas funcionais e adesinas de *Candida albicans*: Mini Revisão. **Biosaúde**, v. 14, n. 1, p. 26–41, 2016.

GHANNOUM, Mahmoud A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. **Clinical microbiology reviews**, v. 13, n. 1, p. 122-143, 2000.

GIACOMAZZI, Juliana *et al.* The burden of serious human fungal infections in Brazil. **Mycoses**, v. 59, n. 3, p. 145-150, 2016.

GILBERT, Andrew S; WHEELER, Robert T; MAY, Robin C. Fungal pathogens: survival and replication within macrophages. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 5, n. 7, p. a019661, 2015.

GILLET, Ludovic C; LEITNER, Alexander; AEBERSOLD, Ruedi. Mass spectrometry applied to bottom-up proteomics: entering the high-throughput era for hypothesis testing. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 9, p. 449–472, 2016.

GIRARD, Vincent; DIERYCKX, Cindy; JOB, Claudette; *et al.* Secretomes: the fungal strike force. **Proteomics**, v. 13, n. 3–4, p. 597–608, 2013.

GROPP, Katharina *et al.* The yeast *Candida albicans* evades human complement attack by secretion of aspartic proteases. **Molecular immunology**, v. 47, n. 2-3, p. 465-475, 2009.

GOMES, KDES. Purificação e caracterização de xilanases do fungo *Chrysosporthe cubensis* e utilização na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar. Universidade Federal de Viçosa, 2014.

- GORDON, Siamon. Alternative activation of macrophages. **Nature reviews immunology**, v. 3, n. 1, p. 23, 2003.
- GUARRO, Josep et al. Fatal Case of *Trichoderma harzianum* Infection in a Renal Transplant Recipient. **Journal of clinical microbiology**, v. 37, n. 11, p. 3751-3755, 1999.
- GUISEIX, José et al. *Trichoderma harzianum* peritonitis in peritoneal dialysis. **Nephron**, v. 74, n. 2, p. 473-474, 1996.
- GUPTA, V. K.; MISRA, A. K.; GAUR, R. K. Growth characteristics of *Fusarium* spp. causing wilt disease in *Psidium guajava* L. in Índia. **Journal of Plant Protection Research**, Cambridge, v. 50, p. 451-462, 2010.
- HAAS, E., & STANLEY, DW (2007). Fosfolipases. **Pharm: The Global Pharmacology Reference**, 1–3. doi: 10.1016 / b978-008055232-3.63043-0
- HARTMANN, Andreia; MISSIO, Raquel; HAMMAD, Marieli Peruzzi; *et al.* Incidência de *Candida* spp. na mucosa oral de pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) no município de Santo Ângelo-RS. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 6, n. 3, p. 125–130, 2016.
- HERMOSA, Rosa et al. Proteomic approaches to understand *Trichoderma* biocontrol mechanisms and plant interactions. **Current Proteomics**, v. 7, n. 4, p. 298-305, 2010.
- HERRERA, Martha Dina Vallejo; TORO, María Eugenia; DE FIGUEROA, Lucía I C; *et al.* Extracellular hydrolytic enzymes produced by phytopathogenic fungi. *In: Environmental Microbiology*. Springer, p. 299–321, 2004.
- HU, Xiao; XIAO, Guohua; ZHENG, Peng; *et al.* Trajectory and genomic determinants of fungal-pathogen speciation and host adaptation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 47, p. 16796–16801, 2014.
- HUFFNAGLE, Gary B; NOVERR, Mairi C. The emerging world of the fungal microbiome. **Trends in microbiology**, v. 21, n. 7, p. 334–341, 2013.
- JAISWAL, Mihir; WASHBURN, Michael P; ZYBAILOV, Boris L. Mass Spectrometry-Based Methods of Proteome Analysis. **Reviews in Cell Biology and Molecular Medicine**, 2015.

Jl, Xian-Ling et al. Shotgun analysis of the secretome of *Fusarium graminearum*. **Indian journal of microbiology**, v. 53, n. 4, p. 400-409, 2013.

KANTARCIOĞLU, A. Serda et al. Fatal *Trichoderma harzianum* infection in a leukemic pediatric patient. **Medical mycology**, v. 47, n. 2, p. 207-215, 2009.

KAUFFMAN, C A; FREIFELD, A G; ANDES, D R; *et al.* Endemic fungal infections in solid organ and hematopoietic cell transplant recipients enrolled in the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET). **Transplant Infectious Disease**, v. 16, n. 2, p. 213–224, 2014.

KIBBLER, Christopher C; BARTON, Richard; GOW, Neil A R; *et al.* **Oxford Textbook of Medical Mycology**. Oxford University Press, 2017.

KIM, Jeong-Yoon. Human fungal pathogens: Why should we learn? 2016.

KLITGAARD, Andreas; IVERSEN, Anita; ANDERSEN, Mikael R; *et al.* Aggressive dereplication using UHPLC–DAD–QTOF: screening extracts for up to 3000 fungal secondary metabolites. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 7, p. 1933–1943, 2014.

KNIEMEYER, Olaf. Proteomics of eukaryotic microorganisms: The medically and biotechnologically important fungal genus *Aspergillus*. **Proteomics**, v. 11, n. 15, p. 3232–3243, 2011.

KÖHLER, Gerwald A. et al. Phospholipase A2 and phospholipase B activities in fungi. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1761, n. 11, p. 1391-1399, 2006.

KOIKE, C M; LUCON, C M M. Efeito de diferentes fatores na esporulação e crescimento de isolados de *Trichoderma* spp. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 70, n. suplemento 3, p. 96–99, 2003.

KOULEN, Hector Henrique Ferreira. Metabolismo secundário de fungos Endofíticos associados às plantas *strychnos* cf. *toxifera* (loganiaceae) e *mauritia flexuosa* (arecaceae). 2011.

KRISHNAN, Abiramy; CONVEY, Peter; GONZALEZ, Marcelo; *et al.* Effects of temperature on extracellular hydrolase enzymes from soil microfungi. **Polar Biology**, v. 41, n. 3, p. 537–551, 2018.

LABORDE, Marie Caroline Ferreira. Avaliação de fungos sapróbios na sobrevivência de *Cercospora coffeicola*. 2014.

LAZAROTTO, Marília. Identificação e caracterização de *Fusarium* spp. e *Pestalotiopsis* spp. associados a *Carya illinoensis* no Rio Grande do Sul. 2013.

LEITE, Sarah Santana. Influência de fatores abióticos no crescimento e esporulação de isolados geneticamente distintos de *Trichoderma stromaticum*. 2012.

LEONG, Su-lin L; LANTZ, Henrik; PETTERSSON, Olga V; *et al.* Genome and physiology of the ascomycete filamentous fungus *Xeromyces bisporus*, the most xerophilic organism isolated to date. **Environmental microbiology**, v. 17, n. 2, p. 496–513, 2015.

LIMA, Anni Kelle Serrão de; RODRIGUES, Joselita Ribeiro; SOUZA, Ingrid da Silva de; *et al.* A isolated fungi in water consumed by riverside community of the middle Rio Solimões, Amazonas, Brazil: pathogenic potential. **Revista Ambiente & Água**, v. 12, n. 6, p. 1017–1024, 2017.

LIU, Jian Kui; HYDE, Kevin D; JONES, E B Gareth; *et al.* Fungal diversity notes 1–110: taxonomic and phylogenetic contributions to fungal species. **Fungal Diversity**, v. 72, n. 1, p. 1–197, 2015.

LODGE, D Jean. Factors related to diversity of decomposer fungi in tropical forests. **Biodiversity & Conservation**, v. 6, n. 5, p. 681–688, 1997.

LOO, Daniel S. Systemic antifungal agents: an update of established and new therapies. **Advances in dermatology**, v. 22, p. 101–124, 2006.

MACHADO, Daniele Franco Martins; PARZIANELLO, Francini Requia; SILVA, Antonio Carlos Ferreira da; *et al.* *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 35, n. 1, p. 274–288, 2012.

MACIEL, Caciara Gonzatto. Patógenos em sementes de *pinus* spp. ênfase em *Lasiodiplodia* sp. e *Fusarium* spp. 2016.

MÄKELÄ, Mii R; HILDÉN, Kristiina; LUNDELL, Taina K. Oxalate decarboxylase: biotechnological update and prevalence of the enzyme in filamentous fungi. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 801–814, 2010.

MALACHOVÁ, Alexandra; SULYOK, Michael; BELTRÁN, Eduardo; *et al.* Optimization and validation of a quantitative liquid chromatography–tandem mass spectrometric method covering 295 bacterial and fungal metabolites including all regulated mycotoxins in four model food matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 1362, p. 145–156, 2014.

MANDUJANO-GONZALEZ, Virginia; VILLA-TANACA, Lourdes; ANDUCHO-REYES, Miguel Angel; *et al.* Secreted fungal aspartic proteases: A review. **Revista iberoamericana de micologia**, v. 33, n. 2, p. 76–82, 2016.

MANE, Arati *et al.* Adherence to buccal epithelial cells, enzymatic and hemolytic activities of *Candida* isolates from HIV-infected individuals. **Medical mycology**, v. 49, n. 5, p. 548-551, 2011.

MARCO, Evilin Giordana de. Produção e caracterização de celulases produzidas por um isolado de *Bacillus* sp. 2012.

MARSHALL, Natalie C.; FINLAY, B. Brett; OVERALL, Christopher M. Sharpening host defenses during infection: Proteases cut to the chase. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 16, n. 4 suppl 1, p. S161-S171, 2017.

MARTINS, Ligia Manoel; SANT'ANA, Anderson S; FUNGARO, Maria Helena Pelegrinelli; *et al.* The biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxins in the Brazilian peanut production chain. **Food Research International**, v. 94, p. 101–107, 2017.

MARTINS, Mayra Kassawara. Variabilidade genética de isolados de *Fusarium* spp. e estudo da interação com a planta hospedeira. 2005.

MAY, Robin C. *et al.* *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 2, p. 106, 2016.

MAYAYO, E; PUJOL, I; GUARRO, J. Experimental pathogenicity of four opportunist *Fusarium* species in a murine model. **Journal of medical microbiology**, v. 48, n. 4, p. 363–366, 1999.

MCCOTTER, Sean W; HORIANOPOULOS, Linda C; KRONSTAD, James W. Regulation of the fungal secretome. **Current genetics**, v. 62, n. 3, p. 533–545, 2016.

MELANI, Rafael Donadélli. Estratégias proteômicas “bottom-up” e “top-down” aplicadas à venômica. 2016.

MEHL, Hillary L; EPSTEIN, Lynn. *Fusarium solani* species complex isolates conspecific with *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* race 2 from naturally infected human and plant tissue and environmental sources are equally virulent on plants, grow at 37 C and are interfertile. **Environmental microbiology**, v. 9, n. 9, p. 2189–2199, 2007.

MOBLEY, H. L. T. Urease. **Helicobacter pylori: Physiology and Genetics**. Edited by: Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL. 2001. 2011.

MONIKA, Staniszevska; ZBIGNIEW, Ochal. Contribution of aspartic proteases in *Candida* virulence. Protease inhibitors against *Candida* infections. **Current Protein and Peptide Science**, v. 18, n. 10, p. 1050–1062, 2017.

MONOD, Michel; CAPOCCIA, Sabrina; LÉCHENNE, Barbara; *et al.* Secreted proteases from pathogenic fungi. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 292, n. 5–6, p. 405–419, 2002.

MONTEIRO, Mônica Cristina Pereira. Identificação de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em solos preservados do cerrado. 2012.

MORA, Diego; ARIOLI, Stefania. Microbial urease in health and disease. **PLoS pathogens**, v. 10, n. 12, p. e1004472, 2014.

MORISHITA, Saori *et al.* Cloning, polymorphism, and inhibition of  $\beta$ -carbonic anhydrase of *Helicobacter pylori*. **Journal of gastroenterology**, v. 43, n. 11, p. 849-857, 2008.

MUHAMMED, Maged; ANAGNOSTOU, Theodora; DESALERMOS, Athanasios; *et al.* *Fusarium* infection: report of 26 cases and review of 97 cases from the literature. **Medicine**, v. 92, n. 6, p. 305, 2013.

MÜLLER, Juceli. Qualidade fisiológica e associação de *Fusarium* spp. a sementes de sorgo sacarino. 2017.

MUNN, David H; SHARMA, Madhav D; BABAN, Babak; *et al.* GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2, 3-dioxygenase. **Immunity**, v. 22, n. 5, p. 633–642, 2005.

MUSZEWSKA, Anna; STEPNIEWSKA-DZIUBINSKA, Marta M; STECZKIEWICZ, Kamil; *et al.* Fungal lifestyle reflected in serine protease repertoire. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 9147, 2017.

NASCIMENTO, Thiago Pajeú. Produção de proteases com atividade fibrinolítica por fungos filamentosos de solos da caatinga utilizando fermentação em estado sólido. 2014.

NATASHA, Maria Cristina da Silva; LAILA, Santos Brandão; LETICIA CAMARA; DUTRAI, Luciano Nakazato; VALÉRIA. Genes termorregulados diferencialmente expressos em *Conidiobolus lamprauges*. **Ciência Rural**, v. 42, n. 9, 2012.

NAVES, Plínio Lázaro Faleiro; SANTANA, Diogenes Pinto; RIBEIRO, Evandro Leão; *et al.* Novas abordagens sobre os fatores de virulência de *Candida albicans*. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 12, n. 2, p. 229–233, 2013.

NIELSEN, Kirsten; HEITMAN, Joseph. Sex and virulence of human pathogenic fungi. **Advances in genetics**, v. 57, p. 143–173, 2007.

NOGUEIRA, Fabio Cesar Sousa; DOMONT, Gilberto B. Survey of shotgun proteomics. **Shotgun Proteomics: Methods and Protocols**, p. 3–23, 2014.

NOGUEIRA, Sarah Veloso; FONSECA, Fernanda L; RODRIGUES, Marcio L; *et al.* *Paracoccidioides brasiliensis* enolase is a surface protein that binds plasminogen and mediates interaction of yeast forms with host cells. **Infection and immunity**, v. 78, n. 9, p. 4040–4050, 2010.

NUCCI, Marcio; ANAÏSSIE, Elias. *Fusarium* infections in immunocompromised patients. **Clinical microbiology reviews**, v. 20, n. 4, p. 695–704, 2007.

NUCCI, Marcio; ANAÏSSIE, Elias. Treatment and prevention of *Fusarium* infection. **UpToDate**. Waltham, MA: UpToDate, 2012.

OBATA, Takaji; IWATA, Hiroshi; NAMBA, Yasunosuke. Proteolytic enzyme from *Oerskovia* sp. CK lysing viable yeast cells. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 41, n. 12, p. 2387–2394, 1977.

OLIVEIRA, Luciana Gonçalves de. Diversidade e potencial enzimático de fungos filamentosos isolados do solo, Semi-Árido, Pernambuco, Brasil. 2009.

OLIVEIRA, A R de; ROCHA, M S. Secretomas de fungos patogênicos humanos: uma interação patógeno-hospedeiro. **Revista Acadêmica Oswaldo Cruz**. ano 4, n.15, 2017.

OPENSTAX COLLEGE, Biology. Structure and Function of Plasma Membranes. **Biology OpenStax College**. 139 – 147, 2013.

OSTERHOLZER, John J. et al. Cryptococcal urease promotes the accumulation of immature dendritic cells and a non-protective T2 immune response within the lung. **The American journal of pathology**, v. 174, n. 3, p. 932-943, 2009.

PAI, Ramakrishna; BOLOOR, Rekha; SHREEVIDYA, K; *et al.* Fusarium solani: An emerging fungus in chronic diabetic ulcer. **Journal of laboratory physicians**, v. 2, n. 1, p. 37, 2010.

PANKE-BUISSE, Kevin et al. Selection on soil microbiomes reveals reproducible impacts on plant function. **The ISME journal**, v. 9, n. 4, p. 980, 2015.

PEDROSO, Reginaldo dos Santos. Caracterização molecular, virulência e suscetibilidade ao fluconazol de espécies ambientais de 'Cryptococcus', antes e após inoculação em modelo murino. 2008.

PEREIRA, Douglas Endrigo Perez. Análise de celulases e xilanases por fungo isolado a partir do bioma cerrado. 2013.

PERES, Nalu Teixeira de Aguiar; MARANHÃO, Fernanda Cristina Albuquerque; ROSSI, Antonio; *et al.* Dermatophytes: host-pathogen interaction and antifungal resistance. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 85, n. 5, p. 657–667, 2010.

PESSOA, Cláudia Cristina Brito; SILVA, Silvia Helena Marques da; GOMES, Fabíola Silveira. Produção de fatores de virulência in vitro por isolados de Cryptococcus neoformans e Cryptococcus gattii de origem clínica em Belém, Estado do Pará, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 3, n. 2, p. 59–65, 2012.

PETRAS, Daniel; HEISS, Paul; SÜSSMUTH, Roderich D; *et al.* Venom proteomics of Indonesian king cobra, Ophiophagus hannah: integrating top-down and bottom-up approaches. **Journal of proteome research**, v. 14, n. 6, p. 2539–2556, 2015.

PIGOSSO, Laurine Lacerda et al. Interação de Paracoccidioides com o hospedeiro: análises proteômicas de lavado broncoalveolar. UFG, 2016.

PINHEIRO, G S; BARBOSA, L G; ANGELOTTI, F; *et al.* Impacto de alterações de temperatura no crescimento e esporulação de Fusarium oxysporum f. sp. tracheiphilum. *In: Embrapa Semiárido-Artigo em anais de congresso (ALICE)*. In: Workshop sobre mudanças climáticas e problemas fitossanitários. Mudanças

climáticas e problemas fitossanitários: anais... Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2012.

POESTER, Vanice Rodrigues; KLAFKE, Gabriel Baracy; CABANA, Ângela Leitzke; *et al.* Isolation and identification of *Aspergillus* spp. from the water used for rehabilitation of magellanic penguins. **Ciência Animal Brasileira**, v. 16, n. 4, p. 567–573, 2015.

PRICE, Margaret F; WILKINSON, Ian D; GENTRY, Layne O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia**, v. 20, n. 1, p. 7–14, 1982.

RAMADA, Marcelo Henrique Soller; STEINDORFF, Andrei Stecca; BLOCH, Carlos; *et al.* Secretome analysis of the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum* ALL 42 cultivated in different media supplemented with *Fusarium solani* cell wall or glucose. **Proteomics**, v. 16, n. 3, p. 477–490, 2016.

RAMBACH, Günter *et al.* Secretion of a fungal protease represents a complement evasion mechanism in cerebral aspergillosis. **Molecular immunology**, v. 47, n. 7-8, p. 1438-1449, 2010.

RAUNIYAR, Navin; YATES III, John R. Isobaric labeling-based relative quantification in shotgun proteomics. **Journal of proteome research**, v. 13, n. 12, p. 5293–5309, 2014.

REECE, Jane B. *et al.* Membrane Structure and Function. **Biology 9th Edition: Campbell**, 2011.

REMENTERIA, Aitor; LÓPEZ-MOLINA, Nuria; LUDWIG, Alfred; *et al.* Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. **Rev Iberoam Micol**, v. 22, n. 1, p. 1–23, 2005.

RICHARD, Mathias L; LAMAS, Bruno; LIGUORI, Giuseppina; *et al.* Gut fungal microbiota: the Yin and Yang of inflammatory bowel disease. **Inflammatory bowel diseases**, v. 21, n. 3, p. 656–665, 2014.

RICHARDSON, Jonathan; HO, Jemima; NAGLIK, Julian. *Candida*–epithelial interactions. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 1, p. 22, 2018.

ROBERT, Vincent A; CASADEVALL, Arturo. Vertebrate endothermy restricts most fungi as potential pathogens. **The Journal of infectious diseases**, v. 200, n. 10, p. 1623–1626, 2009.

RODRIGUES, Marcio L; NAKAYASU, Ernesto S; ALMEIDA, Igor C; *et al.* The impact of proteomics on the understanding of functions and biogenesis of fungal extracellular vesicles. **Journal of proteomics**, v. 97, p. 177–186, 2014.

RUTHERFORD, Julian C. The emerging role of urease as a general microbial virulence factor. **PLoS pathogens**, v. 10, n. 5, p. e1004062, 2014.

SALVATO, Fernanda. Métodos e estratégias em proteômica e suas aplicações na área vegetal. **Ciência Rural**, v. 40, n. 3, p. 727–734, 2010.

SALES, Marilia Ribeiro; DE MOURA, Rosemary Batista; PORTO, Tatiana Souza; *et al.* Variáveis que influenciam a produção de celulases e xilanase por espécies de *Aspergillus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 11, p. 1290–1296, 2011.

SAMA, Babru *et al.* Cloning and Expression of the Gene Encoding a Novel Proteinase from *TritiraChium Album Limber*. In: **Subtilisin Enzymes**. Springer, Boston, MA, 1996. p. 95-104.

SAMBROOK, Joseph; FRITSCH, Edward F; MANIATIS, Tom. Molecular cloning: a laboratory manual. **Cold spring harbor laboratory press**, 1989.

SANDOVAL-DENIS, Marcelo; SUTTON, Deanna A; CANO-LIRA, José F; *et al.* Phylogeny of the clinically relevant species of the emerging fungus *Trichoderma* and their antifungal susceptibilities. **Journal of clinical microbiology**, v. 52, n. 6, p. 2112–2125, 2014.

SARDI, Janaina de Cássia Orlandi; PITANGUI, Nayla de Souza; VOLTAN, Aline Raquel; *et al.* In vitro *Paracoccidioides brasiliensis* biofilm and gene expression of adhesins and hydrolytic enzymes. **Virulence**, v. 6, n. 6, p. 642–651, 2015.

SCHALLER, Martin; BORELLI, Claudia; KORTING, Hans C; *et al.* Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. **Mycoses**, v. 48, n. 6, p. 365–377, 2005.

SEIDL, Michael F; FAINO, Luigi; SHI-KUNNE, Xiaoqian; *et al.* The genome of the saprophytic fungus *Verticillium tricorpus* reveals a complex effector repertoire resembling that of its pathogenic relatives. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 28, n. 3, p. 362–373, 2015.

SHERRINGTON, Sarah L. *et al.* Adaptation of *Candida albicans* to environmental pH induces cell wall remodelling and enhances innate immune recognition. **PLoS pathogens**, v. 13, n. 5, p. e1006403, 2017.

SIEPEN, Jennifer A. et al. Prediction of missed cleavage sites in tryptic peptides aids protein identification in proteomics. **Journal of proteome research**, v. 6, n. 1, p. 399-408, 2007.

SILVA, Naiara Chaves. Análise de aspartato protease (sap) como fator associado à virulência de linhagens de *Candida albicans* e *Candida não-albicans*. 2013.

SILVA, Pábulo Eugênio da Costa. Produção de enzima fibrinolítica a partir da microalga *Chlorella vulgaris* utilizando resíduos industriais. 2013.

SILVA-ROCHA, Walicyranison Plínio; DE BRITO LEMOS, Vitor Luiz; FERREIRA, Magda Rhayanny Assunção; *et al.* Effect of the crude extract of *Eugenia uniflora* in morphogenesis and secretion of hydrolytic enzymes in *Candida albicans* from the oral cavity of kidney transplant recipients. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 15, n. 1, p. 6, 2015.

SCHNEIDER, Simone Weber; PARENTE, Ana Flávia Alves; PARENTE, Juliana Alves; *et al.* Análise proteômica de proteínas secretadas por *Paracoccidioides brasiliensis*.

SINGH, Anuradha; SHAHID, Mohammad; SRIVASTAVA, Mukesh; *et al.* Optimal physical parameters for growth of *Trichoderma* species at varying pH, temperature and agitation. **Virol Mycol**, v. 3, n. 1, p. 1–7, 2014.

SIMON-NOBBE, Birgit; DENK, Ursula; PÖLL, Verena; *et al.* The spectrum of fungal allergy. **International archives of allergy and immunology**, v. 145, n. 1, p. 58–86, 2008.

SOUZA, Paula Monteiro de. Produção de proteases por fungos filamentosos isolados do cerrado do centro-oeste brasileiro. 2015.

SPECHT, Thomas; DAHLMANN, Tim A; ZADRA, Ivo; *et al.* Complete sequencing and chromosome-scale genome assembly of the industrial progenitor strain P2niaD18 from the penicillin producer *Penicillium chrysogenum*. **Genome announcements**, v. 2, n. 4, p. e00577-14, 2014.

STRZALKA, Wojciech; ZIEMIENOWICZ, Alicja. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation. **Annals of botany**, v. 107, n. 7, p. 1127–1140, 2010.

TAKAHASHI-NAKAGUCHI, Azusa; MURAOSA, Yasunori; HAGIWARA, Daisuke; *et al.* Genome sequence comparison of *Aspergillus fumigatus* strains isolated from patients with pulmonary aspergilloma and chronic necrotizing pulmonary aspergillosis. **Medical mycology**, v. 53, n. 4, p. 353–360, 2015.

TANAKA, Koichi; WAKI, Hiroaki; IDO, Yutaka; *et al.* Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid communications in mass spectrometry**, v. 2, n. 8, p. 151–153, 1988.

TEIXEIRA, Maria Francisca Simas. Fungos da Amazônia: uma riqueza inexplorada (aplicações biotecnológicas). Editora da Universidade Federal do Amazonas, 2011.

TUKEY, John W. Comparing individual means in the analysis of variance. **Biometrics**, p. 99–114, 1949.

UBERTI, Augusto Frantz. Urease de *Helicobacter pylori*: ativação de plaquetas e neutrófilos. 2010.

VALLABHANENI, Snigdha; MODY, Rajal K; WALKER, Tiffany; *et al.* The global burden of fungal diseases. **Infectious Disease Clinics**, v. 30, n. 1, p. 1–11, 2016.

WALKER, Clair; GONZATTO MACIEL, Caciara; MENDES MILANESI, Paola; *et al.* Caracterização morfológica, molecular e patogenicidade de *Fusarium acuminatum* e *Fusarium verticillioides* a *Cordia americana*. **Ciência Florestal**, v. 26, n. 2, 2016.

WALKER, Graeme M.; WHITE, Nia A. Introduction to fungal physiology. **Fungi: biology and applications**, p. 1-35, 2017.

WERNECK, Gabriela Corezzi. Produção de proteases por fungos endofíticos isolados de plantas do Cerrado. 2017.

WINDER, Richard S. The influence of substrate and temperature on the sporulation of *Fusarium avenaceum* and its virulence on marsh reed grass. **Mycological Research**, v. 103, n. 9, p. 1145–1151, 1999.

YANG, Dong-Hoon; JUNG, Kwang-Woo; BANG, Soohyun; *et al.* Rewiring of signaling networks modulating thermotolerance in the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Genetics**, v. 205, n. 1, p. 201–219, 2017.

YANG, Fen *et al.* *Fusarium graminearum* and its interactions with cereal heads: studies in the proteomics era. **Frontiers in plant science**, v. 4, p. 37, 2013.

YANG, Hsueh-Hui et al. Induced proteome of *Trichoderma harzianum* by *Botrytis cinerea*. **Mycological research**, v. 113, n. 9, p. 924-932, 2009.

YANG, Weiming; YAN, Lei; WU, Chunrong; *et al.* Fungal invasion of epithelial cells. **Microbiological research**, v. 169, n. 11, p. 803–810, 2014.

YANG, Yue; LIU, Bin; DU, Xinjun; *et al.* Complete genome sequence and transcriptomics analyses reveal pigment biosynthesis and regulatory mechanisms in an industrial strain, *Monascus purpureus* YY-1. **Scientific reports**, v. 5, p. 8331, 2015.

YATES, John R; RUSE, Cristian I; NAKORCHEVSKY, Aleksey. Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. **Annual review of biomedical engineering**, v. 11, p. 49–79, 2009.

YIKE, Iwona. Fungal proteases and their pathophysiological effects. **Mycopathologia**, v. 171, n. 5, p. 299-323, 2011.

YOU, Jueng Soo; JONES, Peter A. Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin? **Cancer cell**, v. 22, n. 1, p. 9–20, 2012.

ZHANG, Yaoyang; FONSLow, Bryan R; SHAN, Bing; *et al.* Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. **Chemical reviews**, v. 113, n. 4, p. 2343–2394, 2013.

ZAUGG, Christophe; JOUSSON, Olivier; LECHENNE, Barbara; *et al.* *Trichophyton rubrum* secreted and membrane-associated carboxypeptidases. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 298, n. 7–8, p. 669–682, 2008.

## 8. ANEXOS

### 8.1 Tabelas de proteínas identificadas nos secretomas dos fungos

**Tabela 3.** Lista de proteínas identificadas no secretoma de *Trichoderma harzianum* (CFAM 1308) em ordem alfabética.

Nome da proteína	Massa molecular (Da)	NSAF*	Spectrum Count
1,3-beta-glucanosiltransferase	56151.2	0.000919404	7
1,3-beta-glucanosiltransferase	57101.2	0.022558054	178
1,3-beta-glucanosiltransferase	53200.0	0.000561978	4
1,3-beta-glucanosiltransferase	50239.5	0.002348994	16
1,3-beta-glucanosiltransferase	48635.4	0.007951308	53
1,3-beta-glucanosiltransferase	48645.4	0.008251357	55
1,3-beta-glucanosiltransferase	52881.8	0.00056429	4
1,3-beta-glucanosiltransferase	50639.7	0.00218348	15
1,3-beta-glucanosiltransferase	56226.3	0.000919404	7
Alérgeno Asp F7	29876.3	0.009296444	40
Alérgeno menor Alt a 7	26300.1	0.000277576	1
Alfa-amilase	50682.1	0.000592322	4
Alfa-amilase	50576.9	0.000592322	4
Alfa-L-arabinofuranosidase	34490.7	0.00063877	3
Alpha/beta hidrolase	37257.7	0.002211654	11
Antígeno nuclear de proliferação celular	28328.1	0.000264715	1
Antígeno nuclear de proliferação celular	28313.1	0.000264715	1
Aspergillopepsin-2	26815.2	0.005973141	23
Beta-1,3-endoglucanase (Fragmento)	38659.5	0.001909785	10
Beta-glucosidase	84181.8	0.00026336	3
Beta-glucosidase	84315.8	0.000175573	2
Carboxipeptidase	60654.6	0.001501342	12
Carboxipeptidase	60713.7	0.001501342	12
Carboxipeptidase de zinco	93734.2	0.000481695	6
Catalase-peroxidase	85446.8	8.65E-05	1
Catalase-peroxidase	88669.3	8.33E-05	1
Celulase	47084.8	0.000155821	1
Ceramidase não lisossômica neutra / alcalina	82970.1	0.000623284	7
Citocromo Microsomal B5	24099.9	0.000311642	1
ECM14	50109.7	0.000154417	1
Endoquitinase 1	44335.5	0.002763175	16
Endotiapsina	42322.8	0.032413871	191
Exo-rhamnogalacturonase B	50471.9	0.000750123	5
Família Polissacarídeo Liase 7	25709.5	0.006358505	23

Fosfatase ácida roxa	79542.4	0.000456467	5
Fosfatase ácida roxa	54023.3	0.001511371	11
Fosfatase ácida roxa	55225.6	0.001915884	14
Fosfatase ácida roxa	55230.6	0.002189582	16
Fosfatase ácida roxa	53824.1	0.001514406	11
Fosfatase ácida roxa	79294.2	0.000458297	5
Fosfoglicerato mutase	42077.4	0.001088274	6
Fosfolipase C	69076.9	0.000874785	8
Gama-glutamiltanspeptidase	61022.0	0.000359587	3
Glicoamilase	67226.3	0.004780818	44
Glicoamilase	69905.6	0.003855269	37
Glicosil hidrolase	96452.8	0.001197228	15
Glicosil hidrolase da família 12	35367.8	0.000415523	2
Glicosil hidrolase da família 128	35030.2	0.000854346	4
Glicosil hidrolase da família 132	50873.9	0.000273152	2
Glicosil hidrolase da família 132	45215.9	0.000311642	2
Glicosil hidrolase da família 16	40444.7	0.05060064	293
Glicosil hidrolase da família 16	72955.0	0.000958899	10
Glicosil hidrolase da família 16	45298.9	0.000332016	2
Glicosil hidrolase da família 16	39242.4	0.000547031	3
Glicosil hidrolase da família 16	48754.7	0.00014434	1
Glicosil hidrolase da família 17	75823.7	9.74E-05	1
Glicosil hidrolase da família 17	42292.7	0.027920134	169
Glicosil hidrolase da família 17 (Fragmento)	35298.6	0.034903922	168
Glicosil hidrolase da família 18	46304.8	0.002551117	16
Glicosil hidrolase da família 18	36079.8	0.004610846	23
Glicosil hidrolase da família 18	44266.3	0.002763175	16
Glicosil hidrolase da família 28	47933.5	0.001269653	8
Glicosil hidrolase da família 30	51800.3	0.001259289	9
Glicosil hidrolase da família 30-1	51771.3	0.001259289	9
Glicosil hidrolase da família 31	101306.7	0.000744422	10
Glicosil hidrolase da família 31	104770.5	0.000646127	9
Glicosil hidrolase da família 5	47905.8	0.004315045	27
Glicosil hidrolase da família 5	47047.8	0.000155821	1
Glicosil hidrolase da família 55	79586.8	0.002336295	26
Glicosil hidrolase da família 55	83191.0	0.010588614	120
Glicosil hidrolase da família 55	79343.3	0.010297741	114
Glicosil hidrolase da família 55	80426.7	0.001172759	13
Glicosil hidrolase da família 62	34524.8	0.00063877	3
Glicosil hidrolase da família 71	63474.6	0.000113324	1
Glicosil hidrolase da família 92	85965.0	0.002871221	33
Glicosil hidrolase da família 92	86210.0	0.002175167	25
Glicosil hidrolase da família 92	96322.6	0.000638522	8
Glucan 1,3-beta-glucosidase	42723.2	0.027357784	164

Glucan endo-1,3-beta-glucosidase	79651.7	0.001976865	22
Glucan endo-1,3-beta-glucosidase	80696.7	0.001169681	13
Glucan endo-1,3-beta-glucosidase	79391.2	0.010388072	115
Glucanase de parede celular	48661.6	0.00014434	1
Indoleamina 2,3-dioxigenase	54490.6	0.000140494	1
Lisofosfolipase	69984.3	0.00105968	10
Lisofosfolipase	69766.3	0.000741776	7
Manan endo-1,6-alfa-manosidase	43859.5	0.004347788	26
Oxalato descarboxilase	52824.3	0.000691142	5
Pro-kumamolisin	74316.9	0.000804238	8
Protease aspártica eucariótica	49198.0	0.01177925	78
Protease aspártica eucariótica	42622.3	0.022043752	127
Proteína contendo o domínio WSC	117447.0	0.004603488	75
Proteína da família 1 de esterase de carboidratos	34350.1	0.000431203	2
Proteína da família 1 do módulo de ligação a carboidratos	41565.7	0.00119683	7
Proteína da família 24 do módulo de ligação a carboidratos	67399.2	0.000324422	3
Proteína da família 5 de esterase de carboidratos	30500.8	0.001150357	5
Proteína de desenvolvimento sexual tardia	39416.1	0.008227353	45
Proteína de reconhecimento de quitina	42731.4	0.001000895	6
Proteína DNase1	18052.5	0.003284373	8
Proteína não caracterizada	39549.5	0.000560446	3
Proteína não caracterizada	49196.0	0.011477218	76
Proteína não caracterizada	50425.9	0.000155116	1
Proteína não caracterizada	52898.6	0.000283311	2
Proteína não caracterizada	48123.6	0.000793533	5
Proteína não caracterizada	41801.4	0.005939715	35
Proteína não caracterizada	62977.8	0.000349802	3
Proteína não caracterizada	13145.3	0.012099049	21
Proteína não caracterizada	40353.9	0.009952443	54
Proteína não caracterizada	47307.5	0.000163631	1
Proteína não caracterizada	20210.1	0.008615029	24
Proteína não caracterizada	72276.7	0.000733836	7
Proteína não caracterizada	21843.8	0.001337781	4
Proteína não caracterizada	18067.4	0.005303082	14

Proteína não caracterizada	117497.1	0.006015224	98
Proteína não caracterizada	79629.3	0.00065031	7
Proteína não caracterizada	39402.1	0.008227353	45
Proteína não caracterizada	52456.8	0.000540917	4
Proteína não caracterizada	52800.3	0.00082937	6
Proteína não caracterizada	42283.8	0.063470092	374
Proteína não caracterizada	46468.3	0.001137272	7
Proteína não caracterizada	37232.6	0.002211654	11
Proteína não caracterizada	68921.8	0.000874785	8
Proteína não caracterizada	121378.4	0.000183975	3
Proteína não caracterizada	164925.9	0.000135052	3
Proteína não caracterizada	58360.0	0.000233202	2
Proteína não caracterizada	51577.2	0.000676147	5
Proteína não caracterizada	221965.4	3.46E-05	1
Proteína não caracterizada	14333.1	0.000531483	1
Proteína não caracterizada	31431.0	0.000917208	4
Proteína não caracterizada	22530.7	0.000922349	3
Proteína não caracterizada	18125.5	0.003284373	8
Proteína não caracterizada	25373.7	0.000539853	2
Proteína não caracterizada	63034.9	0.000224791	2
Proteína não caracterizada	9113.4	0.001594448	2
Proteína não caracterizada	30310.5	0.000239725	1
Proteína não caracterizada	13537.9	0.004820715	9
Proteína não caracterizada	42650.3	0.032978842	190
Proteína não caracterizada	14504.0	0.000504127	1
Proteína não caracterizada	14329.0	0.01788555	36
Proteína não caracterizada	65444.2	0.000911113	8
Proteína não caracterizada	172598.7	4.42E-05	1
Proteína não caracterizada	38990.4	0.002706366	15
Proteína não caracterizada	18764.2	0.013573045	39
Proteína não caracterizada	62488.6	0.020116069	169
Proteína não caracterizada	53399.8	0.000287469	2
Proteína não caracterizada	30704.8	0.01444684	59
Proteína não caracterizada	36755.0	0.000433932	2
Proteína não caracterizada	60861.9	0.000239725	2
Proteína não caracterizada	54239.2	0.000665643	5
Proteína não caracterizada	26392.0	0.007681139	27
Proteína não caracterizada	44764.5	0.004264577	26
Proteína não caracterizada	41243.0	0.001108808	6
Proteína não caracterizada	61206.0	0.000498627	4
Proteína não caracterizada	54442.6	0.000280989	2
Proteína não caracterizada	66188.8	0.000110941	1
Proteína não caracterizada	23997.6	0.006126752	21
Proteína não caracterizada	9081.4	0.001594448	2
Proteína não caracterizada	25752.5	0.006358505	23

Proteína não caracterizada	30389.5	0.000239725	1
Proteína não caracterizada	44538.3	0.000163241	1
Proteína não caracterizada	40234.5	0.058667624	338
Proteína não caracterizada	39411.6	0.000557409	3
Proteína não caracterizada	41786.4	0.005600302	33
Proteína não caracterizada	63242.1	0.000350398	3
Proteína não caracterizada	45419.0	0.000331214	2
Proteína não caracterizada	41882.5	0.001036191	6
Proteína não caracterizada	24280.8	0.002821452	10
Proteína não caracterizada	51608.2	0.000405688	3
Proteína não caracterizada	19778.1	0.00596185	16
Proteína não caracterizada	47870.9	0.004634678	29
Proteína não caracterizada	72488.8	0.000733836	7
Proteína não caracterizada	23240.7	0.010644216	34
Proteína não caracterizada	30530.8	0.001150357	5
Proteína não caracterizada	40356.8	0.002948872	16
Proteína não caracterizada	63667.3	0.00011112	1
Proteína não caracterizada	29433.2	0.00922031	39
Proteína não caracterizada	50014.8	0.000445203	3
Proteína não caracterizada	45269.9	0.000311642	2
Proteína não caracterizada	83017.0	0.010955668	124
Proteína não caracterizada	223318.3	3.44E-05	1
Proteína não caracterizada	34947.2	0.00061953	3
Proteína não caracterizada	48151.6	0.006650285	42
Proteína não caracterizada	30855.9	0.014201979	58
Proteína não caracterizada	14321.0	0.000531483	1
Proteína não caracterizada	45820.8	0.000961139	6
Proteína não caracterizada	18422.0	0.013854351	39
Proteína não caracterizada	21888.8	0.001337781	4
Proteína não caracterizada	121440.3	0.000183975	3
Proteína não caracterizada	35365.8	0.000415523	2
Proteína não caracterizada	22331.6	0.000934926	3
Proteína não caracterizada	34417.2	0.000646804	3
Proteína não caracterizada	63562.7	0.000113324	1
Proteína não caracterizada	61981.7	0.002709466	23
Proteína não caracterizada	17895.3	0.005332544	14
Proteína não caracterizada	35044.2	0.000854346	4
Proteína não caracterizada	62579.7	0.019639949	165
Proteína não caracterizada	57160.2	0.023318438	184
Proteína não caracterizada	29423.3	0.006805715	27
Proteína não caracterizada	49633.4	0.000275901	2
Proteína não caracterizada	66144.7	0.000110941	1
Proteína não caracterizada	204571.6	3.73E-05	1
Proteína não caracterizada	36095.8	0.004811318	24
Proteína não caracterizada	54087.2	0.000532515	4

Proteína não caracterizada	47289.4	0.000163631	1
Proteína não caracterizada	93777.4	0.000210096	3
Proteína não caracterizada	36955.1	0.000433932	2
Proteína não caracterizada (Fragmento)	19929.6	0.00344529	10
Proteína não caracterizada (Fragmento)	11225.2	0.027047109	43
Proteína SnodProt1	14315.0	0.018879192	38
Proteinase T	40222.1	0.003331622	19
Quitinase 1	46334.8	0.003188897	20
Redutase benzoquinona	21484.8	0.000341101	1
Serina carboxipeptidase S28	62683.8	0.000364688	3
Sintase de policetídeo	291149.5	2.55E-05	1
Transglicosilase Murein	51905.8	0.021881258	165
Transglicosilase Murein	51119.0	0.000272609	2
Transglicosilase Murein	61533.8	0.00047612	4
Transglicosilase Murein	75919.8	9.74E-05	1
Transportador Triose-fosfato	47880.0	0.000312352	2
Tripsina	25461.7	0.000539853	2

**Legenda:** \*NSAF (fator de abundância espectral normalizado)

**Tabela 4.** Lista de proteínas identificadas no secretoma de *Fusarium solani* (CFAM 1313) em ordem alfabética.

<b>Nome da proteína</b>	<b>Massa molecular (Da)</b>	<b>NSAF*</b>	<b>Spectrum Count</b>
1,3-beta-glucanosiltransferase	49280.7	0.003024843	9
1,3-beta-glucanosiltransferase	57543.7	0.011646022	41
Anidrase carbônica	47638.4	0.001359379	4
Beta-xilanase (Fragmento)	20606.4	0.003274203	4
Hidrolase de éster carboxílico	60585.1	0.00054668	2
Carboxipeptidase	62074.7	0.003250899	12
Carboxipeptidase	56988.3	0.004154983	14
Glicosil hidrolase família 28	37220.7	0.013956289	33
Glicosil hidrolase família 55	85832.0	0.00305264	16
Peptídeo hidrolase	55138.2	0.00029853	1
Peptídeo hidrolase	53408.5	0.000310715	1
Peptídeo hidrolase	39592.1	0.001247954	3
Membrana Plasma ATPase	100100.1	0.000329546	2
Proteína prevista	32145.0	0.00259813	5
Proteína prevista	39726.7	0.086497031	221
Proteína prevista	62867.6	0.052319736	200
Proteína prevista	58702.1	0.039038572	140
Proteína prevista	34246.3	0.001497545	3
Proteína prevista	56779.2	0.002010855	7
Proteína prevista	23296.4	0.001377832	2
Proteína prevista	48304.8	0.002484273	7
Proteína prevista	71239.2	0.00069733	3
Proteína prevista	17581.4	0.002985303	3
Proteína prevista	13524.9	0.006090017	5
Proteína prevista	69979.8	0.000233513	1
Proteína prevista	51581.6	0.000333883	1
Proteína não caracterizada (Fragmento)	20294.0	0.016827679	21
Proteína não caracterizada (Fragmento)	53095.2	0.003705893	12
Proteína não caracterizada (Fragmento)	29587.2	0.038201017	69
Proteína não caracterizada (Fragmento)	25797.7	0.000626545	1
Proteína não caracterizada (Fragmento)	38288.8	0.074414536	174
Proteína não caracterizada (Fragmento)	10770.4	0.001450004	1
Proteína não caracterizada (Fragmento)	8941.9	0.005709391	3
Proteína não caracterizada	18070.7	0.046218881	51

Proteína não caracterizada	33615.7	0.000468463	1
Proteína não caracterizada	24694.0	0.001263489	2
Proteína não caracterizada	24211.2	0.001353337	2
Proteína não caracterizada	19447.6	0.010527955	13
Proteína não caracterizada	63749.6	0.007702383	30
Proteína não caracterizada	24737.2	0.015702959	23
Proteína não caracterizada	33848.9	0.001427348	3
Proteína não caracterizada	18947.8	0.102097348	114
Proteína não caracterizada	31571.4	0.003065445	6
Proteína não caracterizada	76426.1	0.000224227	1
Proteína não caracterizada	25115.5	0.00365401	6
Proteína não caracterizada	52485.1	0.00227725	7
Proteína não caracterizada	27906.3	0.001194121	2
Proteína não caracterizada	61187.0	0.001344968	5
Proteína não caracterizada	54765.0	0.018803838	62
Proteína não caracterizada	23731.6	0.001994547	3
Proteína não caracterizada	42171.8	0.014919012	39
Proteína não caracterizada	47651.0	0.003121307	9
Proteína não caracterizada	33164.3	0.003426859	7
Proteína não caracterizada	29126.3	0.308913917	560
Proteína não caracterizada	24433.9	0.00278083	4
Proteína não caracterizada	60069.1	0.006460812	23
Proteína não caracterizada	14900.3	0.004350012	4
Proteína não caracterizada	82914.6	0.000204363	1
Proteína não caracterizada	43476.8	0.005136159	14
Proteína não caracterizada	122799.4	0.000128157	1
Proteína não caracterizada	40365.2	0.002857247	7
Proteína não caracterizada	79634.1	0.003020842	15
Proteína não caracterizada	65592.0	0.002786614	11
Proteína não caracterizada	43009.1	0.000380626	1
Proteína não caracterizada	33640.8	0.000951565	2
Proteína não caracterizada	15976.4	0.008897752	9
Proteína não caracterizada	58969.9	0.001673082	6
Proteína não caracterizada	38685.5	0.007288584	18
Proteína não caracterizada	41491.4	0.000759354	2
Proteína não caracterizada	48491.7	0.001730119	5
Proteína não caracterizada	59340.2	0.001663939	6
Proteína não caracterizada	28427.3	0.00164299	3

**Legenda:** \*NSAF (fator de abundância espectral normalizado).

## 8.2 Cadastro SisGen



Ministério do Meio Ambiente  
**CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

**Comprovante de Cadastro de Acesso**

**Cadastro nº A93C32F**

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A93C32F**  
Usuário: **Fiocruz**  
CPF/CNPJ: **33.781.055/0001-35**  
Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**  
Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

### **Espécie**

**Fusarium solani**

**Trichoderma harzianum**

Título da Atividade: **Análise proteômica dos secretomas dos fungos Trichoderma harzianum e Fusarium solani**

### **Equipe**

<b>Priscila Ferreira de Aquino</b>	<b>ILMD/FIOCRUZ</b>
<b>Juliana Cardoso Leal</b>	<b>ILMD/FIOCRUZ</b>
<b>Fábio César Souza Nogueira</b>	<b>Universidade Federal do Rio de Janeiro</b>
<b>Paulo Costa Carvalho</b>	<b>ICC/FIOCRUZ</b>
<b>Kemily Nunes da Silva</b>	<b>ILMD/FIOCRUZ</b>

### **Parceiras Nacionais**

**33.663.683/0001-16 / Universidade Federal do Rio de Janeiro**

### **Resultados Obtidos**

#### **Divulgação de resultados em meios científicos ou de comunicação**

Identificação do meio onde foi divulgado: **Congresso científico**

Data do Cadastro: **10/09/2018 16:10:30**

Situação do Cadastro: **Concluído**



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético  
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **17:33** de **19/09/2018**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO  
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO  
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL  
ASSOCIADO - **SISGEN**