



Universidade Federal de Alfenas
Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas



ALEXANDRE ANDERSON DE LIMA

Análise da localização, da expressão gênica e predição estrutural de adesinas hipotéticas no patógeno emergente *Trichosporon asahii*.

**Alfenas-MG
2019**

ALEXANDRE ANDERSON DE LIMA

**Análise da localização, da expressão gênica e predição
estrutural de adesinas hipotéticas no patógeno emergente
Trichosporon asahii.**

Dissertação apresentada como partes do requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG. Área de concentração: Interação Patógeno-hospedeiro.

Orientadora: Prof^a. Dra. Ana Carolina B. Padovan

Co-orientador: Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida

Alfenas – MG

2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central – Campus Sede

Lima, Alexandre Anderson de.

Análise da localização, da expressão gênica e predição estrutural de adesinas hipotéticas no patógeno emergente *Trichosporon asahii* / Alexandre Anderson de Lima. -- Alfenas, MG, 2019.

152 f. : il. –

Orientadora: Ana Carolina Barbosa Padovan.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Alfenas, 2019.

Bibliografia.

1. Trichosporon. 2. Moléculas de Adesão Celular. 3. Leveduras. 4. Hifas. I. Padovan, Ana Carolina Barbosa. II. Título.

CDD 579



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas. UNIFAL-MG
Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas, MG.
CEP: 37130-001



ALEXANDRE ANDERSON DE LIMA

“Análise da localização superficial, da expressão gênica e caracterização estrutural de adesinas hipotéticas em leveduras e hifas do patógeno emergente *Trichosporon asahii*”

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas.


Área de concentração: Interação Patógeno-Hospedeiro

Aprovado em: 28 de fevereiro de 2019.

Profa. Dra. Ana Carolina Barbosa Padovan
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

Profa. Dra. Viviane Alves Gouveia
Instituição: UFMG

Assinatura: 

Profa. Dra. Amanda Latércia Tranches Dias
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

Dedico este trabalho ao menino que
um dia eu fui e sonhou em ser
cientista.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade de ter chegado até aqui e por todos os dons necessários para que esta etapa fosse cumprida.

Aos meus guias espirituais por todo o apoio, força e sabedoria que eu recebi durante esta jornada.

À minha mãe, Maria do Socorro, pelo exemplo de dedicação, força e superação no qual eu sempre me espelhei. Ao meu irmão, Mateus Roberto, por ser meu modelo de vitória, de que nenhuma limitação pode impedir alguém de sonhar e crescer. À minha irmã, Ludimila Oliveira, pela amizade e por sempre torcer por mim, compartilhando minhas alegrias e tristezas.

Ao meu marido, William Reis, meu maior incentivador, por todo amor, carinho, dedicação, apoio e cuidados, que sem ele ao meu lado não teria jamais dados os passos mais importantes da minha vida.

Aos amigos-irmãos que a vida trouxe e que fizeram a alegria dos dias de luta: Daniela Braga, Daniel Felipe, Paloma Gomes, Marcelo Garcia, Thamyres Moraes e Carla Benedini.

À minha orientadora, Dra. Ana Carolina Padovan, por todo o conhecimento acadêmico e de vida, bem como pela amizade e por ser um exemplo de profissional a ser seguido.

Ao meu co-orientador, Dr. Leonardo Augusto, pelos conhecimentos compartilhados e auxílio nos experimentos, sem o qual eu não realizaria este trabalho.

Aos demais professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, pelo apoio e incentivo que eu recebi.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia: Fran, Bianca, Toninho e Marcelo, que sempre foram solícitos sempre que eu precisei.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código de Financiamento 001.”

***“Eu quase que nada não sei. Mas
desconfio de muita coisa.***

...

***Mestre não é quem sempre ensina,
mas quem de repente aprende. ”***

João Guimarães Rosa

(Grande Sertão: Veredas)

RESUMO

O gênero *Trichosporon* spp. pertence ao filo Basidiomycota e atualmente conta com 12 espécies, sendo *Trichosporon asahii* a que possui maior relevância clínica, causando infecções invasivas que alcançam uma taxa de mortalidade de até 80%, o que depende do estado imunológico do paciente, da capacidade do fungo em crescer em diferentes morfologias e da susceptibilidade limitada aos antifúngicos, bem como, de sua capacidade de formar biofilmes. A formação de biofilmes depende da síntese de adesinas que medeiam as interações célula-meio nas diferentes morfologias do fungo. Assim sendo, os objetivos deste trabalho foram verificar se proteínas com função preditiva de adesinas são expressas em leveduras e hifas de *T. asahii* e se são encontradas na superfície celular deste fungo, bem como analisar os modelos tridimensionais dessas adesinas. Para isso, camundongos isogênicos 129/Sv foram inoculados com extrato de proteínas totais de leveduras e de hifas para geração de antissoros policlonais que foram avaliados por ensaio imunoenzimático (ELISA), mostrando que houve diferença na quantidade de anticorpos gerados contra as proteínas totais de leveduras e hifas e que os mesmos reconheceram diferencialmente os extratos proteicos opostos aos quais foram produzidos de forma significativa ($p < 0,05$), e que os anticorpos gerados contra proteínas de hifas possuem maior força de ligação. Os antissoros policlonais foram utilizados em ensaios de microscopia de imunofluorescência, ambos contra leveduras e contra hifas, mostrando reconhecimento das diferentes morfologias de forma semelhante e independente das células terem passado por tratamento de permeabilização ou não. Além disso, quatro proteínas previamente caracterizadas *in silico* por nosso grupo como potenciais adesinas (*Restina-like*, *CFL1-like*, *Mar-like* e *Beta-like*) tiveram sua estrutura proteica terciária modelada no servidor I-TASSER. A partir de cinco modelos gerados para cada adesina foi escolhido aquele que apresentou o maior valor de confiança (*C-score*). Em seguida, as sequências de aminoácidos das proteínas foram analisadas no programa TepiTool no NetMHCII para identificar peptídeos reconhecidos por alelos do MHC classe II humanos e H2 murino. Os peptídeos foram então, analisados no programa VaxiJen v. 2.0 para verificar a imunogenicidade dos mesmos, com ponto de corte $> 0,5$. Em seguida, os peptídeos de cada proteína foram localizados na estrutura 3D de cada proteína no programa PyMol 3.1. Finalmente, foram selecionados aqueles que se encontraram na superfície de cada modelo proteico e próximos à região *N*-terminal. Estes peptídeos foram sintetizados por empresa comercial e inoculados em camundongos para produção de antissoro específico contra cada peptídeo. Através dos anticorpos policlonais gerados contra cada peptídeo, proteínas de superfície foram detectadas na superfície de leveduras e de hifas de *T. asahii*. O ensaio piloto de reconhecimento de proteínas por *Western blot* não trouxe conclusões definitivas a respeito da eficácia do reconhecimento das adesinas pelos anticorpos gerados contra os peptídeos. A análise de expressão gênica das quatro potenciais adesinas em leveduras e hifas mostrou que todas são sintetizadas em maior grau nas hifas de *T. asahii*. A partir das estruturas 3D das quatro adesinas foi realizado ensaio *in silico* de *docking* molecular, mostrando que todas as quatro adesinas se ligam a proteínas humanas que são alvo da adesão celular de patógenos. Este trabalho contribuiu para a compreensão da interação molecular entre o patógeno emergente *T. asahii* e os tecidos de seu hospedeiro humano.

Palavras-chave: *Trichosporon*. Moléculas de adesão celular. Leveduras. Hifas

ABSTRACT

Trichosporon spp. belong to the Basidiomycota phylum and currently possess 12 species, being *Trichosporon asahii* the most clinically relevant species, causing invasive infections, with mortality rate ranging up to 80%, depending on the patient's immune status, the ability of the fungus to grow in different morphologies and the limited susceptibility to antifungal agents, as well as its ability to form biofilms. Biofilm formation depends on the expression of adhesins that mediate cell-environment interactions in the different morphologies of the fungus. The aim of this work was to verify if proteins with predictive function of adhesins are expressed in yeast and hyphae of *T. asahii* and if they are found in the cellular surface of this fungus, as well as to analyze the three-dimensional models of these adhesins. For this, isogenic 129 / Sv mice were inoculated with total yeast and hyphae protein extracts for the generation of polyclonal antisera that were evaluated for titration by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), showing that there was a difference in the amount of antibodies raised against the total proteins of yeasts and hyphae and that they differentially recognized the opposite protein extracts to which they were produced in significantly way ($p < 0.05$), and that the antibodies generated against hyphae proteins have greater binding strength. Polyclonal antisera were used in immunofluorescence microscopy assays, both against yeasts and hyphae, showing recognition of the different morphologies in a similar way and independent of the cells having undergone permeabilization treatment or not. In addition, four proteins previously characterized *in silico* by our group as potential adhesins (Restin-like, CFL1-like, Mar-like and Beta-like) had their tertiary protein structure modeled on the I-TASSER server. Among five 3D probabilistic models generated for each protein, the one that presented the highest confidence value (C-score) was chosen. Thereafter, the amino acid sequences of the proteins were analyzed in the TepiTool and NetMHCII softwares to identify peptides recognized by human class II MHC and Murine H2 alleles. The peptides were analyzed in the VaxiJen v.2.0 software to verify their immunogenicity and it was used the cutoff value > 0.5 . Thus, the peptides of each protein were located in the 3D structure of each protein using the PyMol 3.1 software. Finally, those that were on the surface of each protein model and close to the N-terminus region were selected. These peptides were synthesized by commercial company and inoculated in mice for production of specific antiserum against each peptide. Through the polyclonal antibodies generated against each peptide, surface proteins were detected on the surface of yeast and hyphae of *T. asahii*. The Western blot protein recognition pilot assay did not provide definitive conclusions regarding the efficacy of adhesins recognition for antibodies raised against peptides. Gene expression analysis of the four potential adhesins in yeast and hyphae showed that all are synthesized to a greater degree in the hyphae of *T. asahii*. From the 3D structures of the four adhesins an *in silico* molecular docking assay was performed, showing that all four adhesins bind to human proteins that are the target of cellular adhesion of pathogens. This work contributed to the understanding of the molecular interaction between the emerging pathogen *T. asahii* and the tissues of its human host.

Keywords: *Trichosporon*. Cell adhesion molecules. Yeast. Hyphae.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Modelo de adesina fúngica clássica.....	31
Figura 2 -	Fluxograma do delineamento experimental.....	39
Figura 3 -	Diferentes morfologias cultivadas de <i>T. asahii</i> CBS 2479.....	56
Figura 4 -	Titulação dos anticorpos IgG totais produzidos contra proteínas totais de hifas e contra proteínas totais de leveduras.....	59
Figura 5 -	Resultado do reconhecimento das proteínas totais.....	61
Figura 6 -	Afinidade de ligação entre os antissoros gerados contra extratos totais de leveduras e de hifas utilizando ureia como agente caotrópico.....	63
Figura 7 -	Afinidade de ligação entre os antissoros gerados contra extratos totais de leveduras e de hifas utilizando ureia como agente caotrópico.....	65
Figura 8 -	Taxa de queda (Q%) na ligação entre anticorpos produzidos contra extrato proteico da mesma morfologia e da morfologia contrária para o qual foram gerados.....	66
Figura 9 -	Imagens de microscopia de fluorescência de hifas tratadas com soro pré-imune.....	68
Figura 10 -	Imagens de microscopia de fluorescência de hifas tratadas com antissoro gerado contra proteínas totais de hifas.....	69
Figura 11 -	Imagens de microscopia de fluorescência de leveduras tratadas com soro pré-imune.....	70
Figura 12-	Imagens de microscopia de fluorescência de leveduras tratadas com antissoro gerado contra proteínas totais de leveduras.....	71
Figura 13 -	Imagens de microscopia de fluorescência de hifas tratadas com antissoro pré-imune.....	72
Figura 14 -	Imagens de microscopia de fluorescência de hifas tratadas com antissoro gerado contra proteínas totais de leveduras.....	73
Figura 15 -	Imagens de microscopia de fluorescência de leveduras tratadas com soro pré-imune.....	74

Figura 16 -	Imagens de microscopia de fluorescência de leveduras tratadas com antissoro gerado contra proteínas totais de hifas.....	75
Figura 17 -	Modelo tridimensional da estrutura terciária da proteína Restina- <i>like</i>	77
Figura 18 -	Modelo tridimensional da estrutura terciária da proteína CFL1- <i>like</i>	77
Figura 19 -	Modelo tridimensional da estrutura terciária da proteína Beta- <i>like</i>	78
Figura 20 -	Modelo tridimensional da estrutura terciária da proteína Mar- <i>like</i>	78
Figura 21 -	Localização do peptídeo selecionado na estrutura tridimensional de Restina- <i>like</i>	90
Figura 22 -	Localização do peptídeo selecionado na estrutura tridimensional de CFL1- <i>like</i>	91
Figura 23 -	Localização do peptídeo selecionado na estrutura tridimensional de Beta- <i>like</i>	91
Figura 24 -	Localização do peptídeo selecionado na estrutura tridimensional de Beta- <i>like</i>	92
Figura 25 -	Imagens de microscopia confocal de proteínas na superfície de leveduras de <i>T. asahii</i>	94
Figura 26 -	Imagens de microscopia confocal de proteínas na superfície de leveduras de <i>T. asahii</i>	95
Figura 27 -	Imagens de microscopia confocal de proteínas na superfície de hifas de <i>T. asahii</i>	96
Figura 28 -	Imagens de microscopia confocal de proteínas na superfície de hifas de <i>T. asahii</i>	97
Figura 29 -	Ensaio piloto de <i>Western blot</i> do reconhecimento das proteínas.....	99
Figura 30 -	Comparação da expressão gênica em leveduras e hifas de <i>T. asahii</i> CBS 2479.....	101
Figura 31 -	Representação tridimensional do melhor modelo de <i>docking</i> molecular entre Colágeno IV e as adesinas.....	104

Figura 32 -	Representação tridimensional do melhor modelo de <i>docking</i> molecular entre Albumina e as adesinas.....	106
Figura 33 -	Representação tridimensional do melhor modelo de <i>docking</i> molecular entre Fibrinogênio e as adesinas.....	108
Figura 34 -	Respresentação tridimensional do melhor modelo de <i>docking</i> molecular entre Fibronectina e as adesinas.....	110
Figura 35 -	Representação tridimensional do melhor modelo de <i>docking</i> molecular entre Hemoglobina e as adesinas.....	112
Figura 36 -	Representação tridimensional do melhor modelo de <i>docking</i> molecular entre Laminina e as adesinas.....	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	<i>Primers</i> utilizados para análise da expressão gênica.....	51
Tabela 2 -	Valores de C-score para cada modelo de proteína.....	76
Tabela 3 -	Estruturas secundárias encontradas na proteína <i>Restina-like</i> , evidenciando os aminoácidos iniciais e finais de cada uma delas.....	79
Tabela 4 -	Estruturas secundárias encontradas na proteína <i>Beta-like</i> , evidenciando os aminoácidos iniciais e finais de cada uma delas.....	80
Tabela 5 -	Estruturas secundárias encontradas na proteína <i>Mar-like</i> , evidenciando os aminoácidos iniciais e finais de cada uma delas.....	82
Tabela 6 -	Estruturas secundárias encontradas na proteína <i>CFL1-like</i> , evidenciando os aminoácidos iniciais e finais de cada uma delas.....	83
Tabela 7 -	Sequência dos peptídeos imunogênicos das proteínas <i>Restina-like</i> , <i>CFL1-like</i> , <i>Beta-like</i> e <i>Mar-like</i>	83
Tabela 8 -	Peptídeos selecionados de cada proteína para serem sintetizados.....	89
Tabela 9 -	Valores de docking fornecido pelo servidor PatchDock.....	102
Tabela 10 -	Ligação entre os motivos de adesão conservados e os ligantes analisados.....	115

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABC - Cassete de Ligação a ATP
- Abs - Anticorpos
- AIDS - *Acquired Immunodeficiency Syndrome*
Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
- ATP - Adenosina Trifosfato
- BSA - *Bovine Serum Albumine*
Albumina Sérica Bovina
- CBS - *Center for Biological Sequence Analysis*
Centro para Análise de Sequência Biológica
- cDNA - DNA complementar
- CIM - Concentração Inibitória Mínima
- CLSI - *Clinical Laboratory Standards Institute*
Instituto de Padrões de Laboratórios Clínicos
- C-Score - *Confidence Score*
Escore de Confiança
- C-terminal - Carboxi terminal
- DA - Dermatite atópica
- DAPI - 4,6 Diamino-2-Fenilindol
- DEPC - Dietil pirocarbonato
- dNTP - Desoxirribonucleotídeos fosfatados
- ECM - Matriz Extracelular
- EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
- ELISA - Ensaio de Imunoabsorção Enzimático
- EPS - Polissacarídeo Extracelular
- FITC - Isotiocianato de Fluoresceína
- Fw - *Forward*
Frente
- GAPDH - Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase
- GPI - Glicosilfosfatidilinositol
- GPI-CWP - Proteínas de Parede Celular Dependentes de
Glicosilfosfatidilinositol

GXM - Glicoronoxilomanana
HIV - *Human Immunodeficiency Virus*
Vírus da Imunodeficiência Humana
HRP - *Horseradish Peroxidase*
Ig - Imunoglobulina
IgE - Imunoglobulina E
IgG - Imunoglobulina G
MFS - Superfamília dos Facilitadores Maiores
MHC II - Complexo Principal de Histocompatibilidade tipo II
NMR - Ressonância Magnética Nuclear
N-terminal - Amino terminal
OD - Densidade ótica
OPD - Diclorato de O-fenilenodiamina
PBS - Tampão Fostato Salino
PCR - Reação em Cadeia de Polimerase
PVDF - Fluoreto de Polivinilideno
RGD - Ácido Arginilglicilaspártico
RNA - Ácido Ribonucleico
rpm - Rotações por minuto
RT-PCR - Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real
Rv - *Reverse*
Reverso
SDA - *Sabouraud* Dextrose Agar
SDS - Dodecil Sulfato de Sódio
SFB - Soro Fetal Bovino
SNC - Sistema Nervoso Central
TBS - *Tris-buffered saline*
TRIS - Trisaminometano

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	O gênero <i>Trichosporon</i> e sua importância clínica.....	20
2.2	Terapia e sensibilidade aos antifúngicos.....	23
2.3	Fatores relacionados à virulência.....	26
2.4	Interação patógeno-hospedeiro.....	30
3	OBJETIVOS	37
3.1	Objetivo Geral.....	37
3.2	Objetivos Específicos.....	37
4	MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1	Delineamento experimental.....	38
4.2	Isolado utilizado.....	40
4.3	Obtenção dos extratos proteicos de leveduras e hifas de <i>T. asahii</i>	40
4.3.1	<i>Análise da viabilidade e pureza do isolado fúngico</i>	40
4.3.2	<i>Condições de crescimento para indução de leveduras e hifas</i>	40
4.3.3	<i>Extração de proteínas totais para inoculação em camundongos</i>	41
4.3.4	<i>Quantificação dos extratos de proteínas totais</i>	41
4.4	Imunização dos camundongos com os extratos totais de leveduras e hifas de <i>T. asahii</i> e com os peptídeos sintéticos	42
4.4.1	<i>Animais utilizados</i>	42
4.4.2	<i>Imunização dos camundongos</i>	42
4.4.3	<i>Coleta de antissoro</i>	43
4.5	Ensaio ELISA	43
4.5.1	<i>Determinação do valor de cut-off dos anticorpos</i>	45
4.5.2	<i>Determinação do título dos anticorpos</i>	45
4.5.3	<i>Afinidade dos anticorpos</i>	46
4.6	Microscopias de fluorescência e confocal de leveduras e hifas	46
4.7	Análises in silico de proteínas hipotéticas da superfície de <i>T. asahii</i> para determinação dos peptídeos imunogênicos	48
4.7.1	<i>Determinação do peso molecular das proteínas selecionadas</i>	48
4.7.2	<i>Predição de imunogenicidade dos peptídeos</i>	48

4.7.3	<i>Predição da estrutura terciária das proteínas selecionadas.....</i>	49
4.7.4	<i>Seleção dos peptídeos imunogênicos.....</i>	50
4.7.5	<i>Síntese dos peptídeos imunogênicos.....</i>	50
4.8	Análise da expressão gênica das adesinas em leveduras e hifas de <i>T. asahii</i>.....	50
4.8.1	<i>Primers utilizados.....</i>	50
4.8.2	<i>Síntese de cDNA.....</i>	51
4.8.3	<i>Ensaio de RT-PCR (Real-Time PCR).....</i>	52
4.8.4	<i>Análise dos dados da RT-PCR</i>	52
4.9	Ensaio de Western blot.....	53
4.9.1	<i>Eletroforese em gel de poliacrilamida.....</i>	53
4.9.2	<i>Análise por Western blot.....</i>	54
4.10	<i>Docking molecular das proteínas sselecionadas</i>	54
5	RESULTADOS.....	56
5.1	Crescimento de <i>T. asahii</i> CBS 2479 como levedura e hifa induzidas por diferentes meios de cultura.....	56
5.2	Extração de proteínas totais de leveduras e hifas de <i>T.asahii</i>.....	57
5.3	Avaliação do reconhecimento das proteínas pelos anticorpos de levedura e hifa gerados em camundongos 129/Sv.....	57
5.3.1	<i>Rendimento das coletas dos soros pré-ímmunes e antissoros.....</i>	57
5.3.2	<i>Análise dos anticorpos contra extrato de leveduras e hifas por ELISA.....</i>	57
5.3.3	<i>Imunofluorescências das leveduras e hifas e <i>T. asahii</i>.....</i>	66
5.4	Análises <i>in silico</i> de proteínas preditas como adesinas de superfície celular de <i>T. asahii</i>.....	76
5.4.1	<i>Modelagem tridimensional das proteínas.....</i>	76
5.4.2	<i>Peptídeos imunogênicos.....</i>	83
5.5	Avaliação do reconhecimento das proteínas pelos anticorpos gerados com os peptídeos sintetizados	92
5.5.1	<i>Rendimento das coletas dos soros pré-ímmunes e antissoros.....</i>	92
5.5.2	<i>Microscopia de imunofluorescência confocal das adesinas na superfície fúngica.....</i>	93
5.5.3	<i>Reconhecimento das proteínas pelos anticorpos por Western blot.....</i>	98

5.6	Avaliação da expressão gênica das quatro adesinas em leveduras e hifas.....	100
5.7	Avaliação do <i>docking</i> molecular das quatro adesinas.....	101
6	DISCUSSÃO.....	116
7	CONCLUSÕES.....	129
	REFERÊNCIAS.....	131
	ANEXOS.....	149

1 INTRODUÇÃO

As espécies do gênero *Trichosporon* apresentam-se como fungos leveduriformes com a capacidade de formar pseudo-hifas, hifas verdadeiras e artroconídios, que são formados pela fragmentação das hifas. São capazes de degradar ureia e utilizar diversos tipos de carboidratos como fonte de carbono, mas não são fermentadores. Essa variedade de formas e metabolismo confere a este gênero características cosmopolitas, permitindo que ele ocupe diversos nichos, podendo ser encontrado no solo, na água, decompondo matéria orgânica e colonizando diversos hospedeiros, incluindo o homem (HAUPT et al., 1983; MIDDELHOVEN, 2003; CHAGAS-NETO; CHAVES E COLOMBO, 2008).

Espécies de fungos oportunistas e patogênicos tendem a expressar perfis proteicos diferentes em cada uma de suas morfologias. Essas diferenças estão ligadas a virulência como, por exemplo, na síntese de adesinas, que são proteínas presentes na superfície da célula fúngica que medeiam a adesão do fungo ao substrato. Em *Candida albicans* algumas adesinas podem ser sintetizadas em apenas uma ou ambas morfologias do fungo, a exemplo de Als3p e Hwp1p, presentes somente em hifas e Als1p, presentes tanto em hifas quanto leveduras. Sabe-se que *T. asahii* é um fungo capaz de transitar entre as morfologias de levedura e hifas, porém, até o momento, ainda não são conhecidas adesinas que sejam sintetizadas por este fungo e tão pouco, se estão presentes em apenas uma de suas morfologias (BAILEY et al., 1996; HOYER et al., 1998; SUNDSTROM, CUTLER e STAAB, 2002; ZHENG, WANG e WANG, 2004; MARTÍNEZ-GOMARIZ et al., 2009; BOYCE e ANDRIANOPOULOS, 2015).

As adesinas permitem que o fungo realize interações célula-célula, célula-hospedeiro ou célula-superfície abiótica. Uma vez que a célula fúngica se adere ao hospedeiro ou a um substrato abiótico que esteja em contato direto com tecidos do hospedeiro, a exemplo de cateteres, ela realiza a formação de biofilmes, a partir do qual pode se disseminar para outras partes do hospedeiro humano, desenvolvendo um quadro de infecção invasiva (COLOMBO, PADOVAN e CHAVES, 2011; DUARTE-OLIVEIRA et al., 2017).

Das 12 espécies que compõem o gênero *Trichosporon*, 9 delas possuem relevância clínica para o homem, sendo que a espécie *Trichosporon asahii* é a mais frequentemente isolada em infecções invasivas e reconhecidamente alta produtora de

biofilmes. A capacidade que *T. asahii* tem em invadir e se disseminar pelos tecidos do hospedeiro pode ter relação com a síntese de proteínas encontradas em sua superfície e que possuem função de adesinas. Estas proteínas podem ser diferencialmente sintetizadas em leveduras e hifas de forma a possuírem papéis diferentes durante o processo infeccioso (PFALLER et al., 2007, 2009; COLOMBO et al., 2011; DUARTE-OLIVEIRA et al., 2017).

Atualmente, os genomas de duas cepas de *T. asahii* estão sequenciados, sendo uma cepa de origem ambiental, a CBS 8904, e outra de origem clínica, a CBS 2479. O genoma do fungo possui aproximadamente 25 Mbp e contém cerca de 8.300 ORFs (*Open Reading frames*) preditas que codificam proteínas. Porém, o conhecimento da anotação proteica para o genoma que realmente é expresso ainda não é bem elucidado se comparado com outras espécies de fungos. Desta forma, os genomas depositados permanecem classificados com o nível de “scaffold”, com a anotação genômica realizada apenas por ontologia gênica. (YANG et al., 2012; MARINÉ et al., 2015).

Com a emergência das infecções causadas por *T. asahii*, sua alta capacidade em formar biofilmes e o pouco conhecimento que existe sobre os produtos de sua expressão gênica, *in vitro* e *in vivo*, há a necessidade de se conhecer os mecanismos pelos quais esse fungo interage com seu hospedeiro humano e se possíveis proteínas diferencialmente sintetizadas pela levedura ou pela hifa, bem como, aquelas localizadas em sua superfície poderiam participar dos processos de adesão e formação de biofilmes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O gênero *Trichosporon* e sua importância clínica

Os fungos do gênero *Trichosporon* pertencem ao filo Basidiomycota, classe Temellomycetes, ordem Trichosporonales, família Trichosporonaceae. Podem habitar diversos nichos no ambiente, tais como solo, ar, água, ambientes marinhos, decompondo madeira, encontrado em queijos e excremento de pássaros. São encontrados em diversos hospedeiros como escaravelhos, pombos, morcegos e gato, assim como fazem parte da microbiota normal do trato gastrointestinal e da pele humana. Anteriormente a espécie do gênero mais associada a infecções era *Trichosporon beigelli*, porém, estudos genéticos e bioquímicos demonstraram que se referiam a seis espécies diferentes: *T. asahii*, *T. cutaneum*, *T. inkin*, *T. asteroides*, *T. mucoides* e *T. ovoides*. Pela atual classificação do gênero, ele abriga 12 espécies, sendo 9 são causadoras de infecções em humanos, sendo elas *T. asahii*, *T. asteroides*, *T. coremiforme*, *T. dohaense*, *T. faecale*, *T. inkin*, *T. japonicum*, *T. lactis* e *T. ovoides* (CHAGAS NETO, CHAVES e COLOMBO, 2008; COLOMBO, PADOVAN e CHAVES, 2011; CHO, MATSUKURA e SUGITA, 2015; LIU et al., 2015).

Esses fungos são comensais do organismo humano e podem emergir como patógenos quando enfrentam mudanças que causem perturbações nas condições ambientais do meio em que vivem, causando aumento na população local ou levando ao seu desenvolvimento em locais do hospedeiro onde não seriam encontrados em condições ambientais normais (BROWN, CORNFORTH e MIDEO, 2012).

Em estudo global realizado por Pfaller e colaboradores em 2009, com 11.240 isolados clínicos não-*Candida* originados de amostras de sangue, fluídos corporais, tecidos, trato gastrointestinal, geniturinário e respiratório, 2.392 isolados foram identificados como pertencentes ao gênero *Trichosporon*, correspondendo a 10,6% do total de isolados estudados ao longo de 10,5 anos, tornando o gênero o terceiro maior causador de infecções invasivas do tipo não-*Candida*.

As infecções causadas pelas espécies do gênero *Trichosporon* variam em sua forma e gravidade, dependendo do local em que se manifestam, sendo classificadas em infecções superficiais epidérmicas, síndromes alérgicas por hipersensibilidade, e infecções invasivas como infecções do trato urinário, endocardite, peritonite e fungemia. Os grupos que possuem o maior risco para desenvolverem infecções

invasivas por *Trichosporon* spp. são os pacientes imunocomprometidos, como os portadores de leucemia, do vírus HIV, pacientes transplantados ou que tiveram a integridade de mucosas comprometida por inserção de cateteres ou por quimioterapia. No gênero, as espécies *T. asahii* e *T. asteroides* são as principais causadoras de tricosporonoses em pacientes hematológicos, sendo a de maior relevância clínica, *T. asahii*. (KEMKER et al., 1991; LUSSIER et al., 2000; PFALLER e DIEKEMA, 2004; WALSH et al., 2004; CHAGAS-NETO, CHAVES e COLOMBO, 2008; COLOMBO, PADOVAN e CHAVES, 2011).

O estudo epidemiológico de Chitasombat e colaboradores (2012) com pacientes imunossuprimidos mostrou que houve aumento na incidência de infecções invasivas não-*Candida*, incluindo o gênero *Trichosporon*, de 1,8 para 2,3 casos a cada 100.000 pacientes-dia entre 2005 e 2010 (CHITASOMBAT et al., 2012).

As tricosporonoses superficiais são causadas principalmente por *T. inkin* e *T. ovoides* e manifestam-se clinicamente sobre a epiderme na forma de pápulas disseminadas, ou na forma de tricomicoses em que nódulos esbranquiçados se desenvolvem nas hastes dos pelos de diversas partes do corpo, sendo esta manifestação conhecida por *Piedra* branca. A tricomicose causada por *Trichosporon* spp. pode se desenvolver em pelos da cabeça, barba, axilas, região genital, cílios e sobrancelhas, causando enfraquecimento dos pelos e consequente queda (GUÉHO et al., 1994; ASADA et al., 2006; TENDOLKAR et al., 2014; RIZZITELLI et al., 2016).

Em estudo realizado no Japão (ZHANG et al, 2011a) com amostras de DNA retiradas da pele de 380 pacientes saudáveis foi demonstrado que *T.asahii* era detectado em 44,73% dos pacientes (170 pacientes) e em estudo realizado com pacientes com dermatite atópica (DA) também no Japão (ZHANG et al, 2011b) que houve aumento na presença de *T. asahii* em lesões de DA quando comparado com pacientes saudáveis, ficando atrás somente de *Malassezia* spp.

Outro tipo de infecção que manifesta-se tanto nas mãos quanto nos pés é a onicomicose. Esta modifica as características das unhas que passa a apresentar onicólise distal, hiperqueratose subungueal e alteração na sua cor. Os principais fatores de risco são idade avançada, traumas locais, hiperidrose, imunodeficiências, condições climáticas, fatores socioeconômicos e inflamação de cutícula (paroníquia). Os patógenos prevalentes nesses tipos de infecção são *T. inkin* e *T. ovoides* (MALINI, OUDEACOMAR e UDAYASHANKAR, 2013; RIZZITELLI et al., 2016).

Trichosporon spp. também podem causar manifestações no trato respiratório que levam ao desenvolvimento de pneumonia por hipersensibilidade. Os maiores índices de ocorrência desse tipo de pneumonia acontecem durante o verão no Japão, cuja umidade favorece o desenvolvimento de *Trichosporon* sp. A infecção se inicia quando o hospedeiro inala artroconídios do fungo presentes no ar. Após o contato, o sistema respiratório do hospedeiro gera uma resposta imune inicial que evolui para hipersensibilidades do tipo III e IV após sucessivas inalações do antígeno. Essa hipersensibilidade pelo constante contato com *Trichosporon* sp. leva a lesões nos tecidos do trato respiratório do paciente (MIYAGAWA et al.1982; ANDO et al. 1991; NISHIURA et al, 1997; SUGITA, IKEDA e NISHIKAWA, 2004).

O fungo causa infecções no trato urinário em pacientes hospitalizados em unidades de tratamento intensivo e que são imunocompetentes. O maior fator de risco para o desenvolvimento desse tipo de infecção é a presença de cateter vesical. Neste tipo de cateter ocorre a formação de biofilme principalmente por *T. asahii* e *T. asteroides* a partir do qual inicia o processo infeccioso. Após desenvolvimento no trato urinário pode haver migração para os rins e destes para o sangue (FEBRÉ et al., 1999; COLOMBO, PADOVAN e CHAVES, 2011; SUN et al., 2012; CHAITANYA et al., 2015; KHAN et al., 2015).

Das espécies causadoras de infecções profundas, *T. asahii* tem sido descrita como a principal causadora desse tipo de infecção, tornando essa espécie um patógeno emergente (CHAGAS-NETO; CHAVES E COLOMBO, 2008; ALMEIDA JÚNIOR e HENNEQUIN, 2016). De 43 isolados de infecções descritas no estudo de Ruan, Chien e Hsueh (2009), 32 isolados (74%) foram identificados como sendo de *T. asahii*, correspondendo a 84% dos casos de infecções invasivas.

Estudos realizados em diversos países reportaram casos, considerados raros, de infecções invasivas do Sistema Nervoso Central (SNC) causadas por espécies do gênero *Trichosporon*, inclusive pela espécie *T. asahii*. No Brasil foi descrito somente um caso de infecção invasiva do SNC pelo gênero *Trichosporon*, porém associado à espécie *T. inkin* (HESLOP et al., 2011; Paradžik et al., 2015; HAJJAR et al., 2017; MILAN et al., 2018).

As infecções profundas causadas por *T. asahii* acometem principalmente pacientes com doenças hematológicas, como os que estão sob tratamento quimioterápico contra leucemia, pacientes que desenvolvem AIDS e aqueles neutropênicos. Também pode acometer pacientes transplantados, indivíduos que se

submeteram a implantes de próteses ortopédicas ou estéticas, portadores de diabetes mellitus, pacientes que estejam utilizando cateteres durante o período de hospitalização e ainda, de forma pouco usual, indivíduos que sofreram queimaduras. Nesses casos de extremo acometimento em pacientes com fungemia a taxa de mortalidade dos pacientes é alta, podendo alcançar até 80% conforme pode ser visto no estudo realizado por Krcmery *et al.* (1999) (KRCMERY *et al.*, 1999; REDDY, TORRES e KONTOYIANNIS, 2002; BONAVENTURA *et al.*, 2006; THIBEAULT *et al.*, 2008; DI FONSECA *et al.*, 2009; MAXFIELD *et al.*, 2015; ODERO *et al.*, 2015; RUBIC *et al.*, 2015; ZUO *et al.*, 2015; DE ALMEIDA e HENNEQUIN, 2016).

Em estudos de histopatologia realizados em pacientes com infecções invasivas causadas por *T. asahii* a partir de biópsias de pele, trato urinário, órgãos genitais, SNC, tecidos moles profundos e sangue dos casos de fungemia, observou-se que estão presentes tanto a morfologia de hifa quanto a de levedura do fungo nas lesões e na corrente sanguínea (HESLOP *et al.*, 2011; OZKAYA-PARLAKAY *et al.*, 2012; KHAN *et al.*, 2015; KUMAR *et al.*, 2015; MAXFIELD *et al.*, 2015; PARADŽIK *et al.*, 2015; THIEN *et al.*, 2016; ÇULHA *et al.*, 2018; GARG *et al.*, 2018; GO *et al.*, 2018; KILEY *et al.*, 2018; NGUYEN *et al.*, 2018).

Da mesma maneira, trabalhos descrevendo isolados de *T. asahii* encontrados no solo, em áreas poluídas por óleo, ambiente aquático e do chão doméstico mostraram que ambas as morfologias podem ser encontradas no ambiente fora do corpo humano (KARASHIMA *et al.*, 2002; CHANDRAN e DAS, 2010; ASHENGROPH e AMINI, 2017; KAUR, SANGWAN e KAUR, 2017; PINHEIRO *et al.*, 2018).

2.2 Terapia e sensibilidade aos antifúngicos

Nas últimas décadas o número de casos de infecções sistêmicas causadas por patógenos fúngicos tem aumentado consideravelmente e os fármacos disponíveis para combater esse tipo de infecção são limitados. Dentre as classes disponíveis encontram-se os polienos (Anfotericina B), os azóis e triazóis (Fluconazol, Isavuconazol, Itaconazol, Posaconazol, Ravuconazol e Voriconazol) e as equinocandinas (Anidulanfungina, Casponfungina e Micafungina) (BERGOLD e GEORGIADIS, 2004; FERA, LA CAMERA e DE SARRO, 2009).

Os fármacos de primeira escolha no tratamento dos patógenos fúngicos tem sido a Anfotericina B e os azóis, principalmente o Voriconazol e o Fluconazol. Os azóis

agem inibindo a síntese do esterol de membrana dos fungos, o ergosterol, causando aumento da permeabilidade da membrana e extravasamento citoplasmático, sendo seu efeito fungistático nas células afetadas diretamente pelo fármaco mas comprometendo a reprodução celular, sendo fungicida para as células filhas. Já a Anfotericina B age ligando-se diretamente ao ergosterol causando comprometimento da estrutura da membrana e morte do patógeno, tendo assim, ação fungicida. Porém, os protocolos de teste de susceptibilidade a antifúngicos do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) não incluem o gênero *Trichosporon*, de forma que os resultados são interpretados a partir daqueles descritos para *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp. (BRAJTBURG *et al.*, 1990; WALSH *et al.*, 1990; BERGOLD e GEORGIADIS, 2004; KURIYAMA *et al.*, 2005; CHAGAS-NETO; CHAVES e COLOMBO, 2008; FERA; LA CAMERA e DE SARRO, 2009).

No estudo realizado por Rodriguez-Tudela *et al.* (2005) foi demonstrado *in vitro* são necessárias maiores concentrações de Anfotericina B para *T. asahii*, apresentando concentração inibitória mínima (CIM) ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$, comparado aos compostos azólicos, que apresentaram CIM $< 0,14$ $\mu\text{g/ml}$. O agente que obteve melhores resultados contra isolados de *T. asahii* foi o Voriconazol. Ao contrário, os fungos patogênicos não-*Trichosporon* spp. apresentaram-se resistentes para os agentes azólicos do que para a Anfotericina B.

Foi observado por Iturrieta-González *et al.* (2014) que os 36 isolados clínicos de *T. asahii* obtidos de sangue, urina, pele e cabelo apresentaram *in vitro* médias geométricas das CIMs semelhantes para Fluconazol (2,67 $\mu\text{g/ml}$) e Anfotericina B (2,57 $\mu\text{g/ml}$) enquanto que a média geométrica da CIM para Voriconazol foi de 0,032 $\mu\text{g/ml}$, confirmando este fármaco como a melhor opção para o tratamento de infecções causadas por *T. asahii* (ITURRIETA-GONZÁLES *et al.*, 2014).

Outra classe de fármacos utilizada no tratamento contra fungos é a das equinocandinas. Essa classe age inibindo a síntese do complexo 1,3- β -D-glicana sintase, que sintetiza β -D-glicana um componente importante da parede celular fúngica. Porém as equinocandinas não são ativas contra *Trichosporon* spp. conforme demonstrado nos estudos *in vitro* para isolados de Tawara e colaboradores (2000) em que a micafungina apresentou um CIM >64 $\mu\text{g/ml}$ e nos estudos *in vitro* de Espinel-Ingroff (1998) em que a caspofungina apresentou uma CIM >16 $\mu\text{g/ml}$ (ESPINEL-INGROFF, 1998; DENNING, 2003; SUN e SINGH, 2010; TAWARA *et al.*, 2000).

Liao e colaboradores (2014) investigaram isolados clínicos de *T. asahii* quanto a sensibilidade a combinações de antifúngicos *in vitro*. Foram utilizadas combinações de Anfotericina B/Caspofungina, Voriconazol/Anfotericina B e Voriconazol/Caspofungina. A combinação Voriconazol/Anfotericina B foi a que teve maior efeito sinérgico (87,5% dos isolados) (LIAO et al., 2014).

Em outro estudo realizado por Liao (2015) onde foram levantados casos de infecção por *Trichosporon* spp. entre os anos de 1975-2014, *T. asahii* foi isolado de 76,75% de infecções fúngicas invasivas. Este estudo mostrou ainda que entre os anos de 1975-2004 a Anfotericina B foi o fármaco que obteve os melhores resultados na cura dos pacientes, porém caindo no período de 2005-2014, tendo neste período o Voriconazol apresentado os melhores resultados no tratamento de trichosporonoses invasivas. Os dados levantados nesse estudo confirmam a tendência de que *T. asahii* vem apresentando aumento na resistência à Anfotericina B (LIAO et al., 2015).

De acordo com Basu, Tilak e Kumar (2015), isolados de *T. asahii* obtidos de sangue de pacientes em UTIs neonatais também apresentaram resistência à Anfotericina B e ao fluconazol, porém ainda sensíveis ao Voriconazol.

Em estudo realizado por Kushima (2012) foi descrita a presença do gene *ERG11* em *T. asahii*, relacionado ao *ERG11* encontrado em *C. neoformans*. Este gene, codifica a Lanosterol 14- α -demetilase, enzima envolvida no processo de conversão do lanosterol para ergosterol, sendo essa, o alvo de ação dos azólicos. No trabalho foi demonstrado que a mutação de aminoácido G150S no *ERG11* de *T. asahii* foi responsável por conferir multi-resistência a azólicos para este fungo. (KUSHIMA, et al., 2012).

Posteriormente Kushima e colaboradores (2017) compararam as sequências de aminoácidos da Erg11p, em uma região altamente conservada entre outros organismos, entre um isolado de *T. asahii* com baixa CIM para azólicos (CIM \leq 4 μ g/mL para Fluconazol e \leq 0,125 μ g/mL para Voriconazol) e seis isolados clínicos com altas CIMs (CIM \geq 64 μ g/mL para Fluconazol e \geq 8 μ g/mL para Voriconazol). Foi demonstrado que os isolados clínicos possuem no gene *ERG11* uma mutação pontual na guanina 448 (G448A), resultando na substituição de aminoácido na posição G150S, sugerindo ser esta a causa da resistência dos seis isolados de *T. asahii* para a classe dos azóis (KUSHIMA et al., 2017).

2.3 Fatores associados à virulência

Os fungos patógenos oportunistas possuem uma série de fatores que lhes permite sucesso na colonização, sobrevivência e invasão dos tecidos do hospedeiro, que são conhecidos como fatores de virulência. Entre estes fatores têm-se a transição morfológica entre a forma de levedura e hifa, a síntese de componentes de parede celular, produção e secreção de enzimas líticas e a formação de biofilmes (COLOMBO, PADOVAN e CHAVES, 2011; MAYER, WILSON e HUBE, 2013; BENTUBO e GOMPERTZ, 2014).

A transição da fase levedura para hifa em toda a população infectante é consequência de mecanismos regulatórios que reconhecem mudanças ambientais que levam a mudanças morfológicas no nível celular. A transição fenotípica pode ocorrer em qualquer momento do crescimento celular devido a mudanças de pH, temperatura, presença de soro, de diferentes tipos de carboidratos, fonte de ferro ou estresse osmótico e oxidativo. Nessas diferentes condições ambientais, leveduras como *C. albicans* sintetizam proteínas diferencialmente em suas duas fases morfológicas, como a Fr10p, uma redutase férrica expressa em maior quantidade na superfície de hifas ao lisar eritrócitos para usar a hemoglobina como fonte de ferro. Outro exemplo é a Hog1p e a Sko1p que são expressas na superfície de leveduras de *C. albicans* impedindo a transformação de leveduras em hifas em ambientes com estresse oxidativo e osmótico, sendo consideradas fatores de virulência (BENSEN, FILLER e BERMAN, 2002; NANTEL et al, 2002; GARAIZAR et al., 2006; ALONSO-MONGE et al., 2010; JEEVES et al, 2011).

Em *Cryptococcus neoformans* foi verificada que a adesina Cfl1p é sintetizada somente durante a fase de hifa deste fungo, possuindo papel na transição levedura para hifa durante o processo de *mating*, bem como na aglutinação célula-célula e formação de biofilme. Como *T. asahii* apresenta perfis fenotípicos diferentes durante a invasão tecidual e por possuir ancestralidade genética compartilhada com *C. neoformans*, supõe-se que este patógeno também possua síntese diferenciada de proteínas nas suas diferentes morfologias (WANG; ZHAI; LIN, 2012; WANG et al., 2013; LIU et al., 2015).

Fungos dimórficos também sintetizam proteínas diferentes na superfície de cada morfologia agindo tanto como adesinas, como outros fatores de virulência, a exemplo de Drk1p em *Histoplasma capsulatum* e *Blastomyces dermatitidis* que é

responsável pela transição levedura-hifa na penetração de tecidos e regulação da expressão de fatores de virulência, e a Sid1p responsável pelo crescimento em ambientes pobres em ferro. Em *Talaromyces marnefei* a DrkAp auxilia na adaptação em ambientes de estresse osmótico e transição dimórfica (BRANDHORST et al., 1999; BOYCE et al., 2011; NEMECEK, WÜTHRICH e KLEIN, 2006; BOYCE e ANDRIANOPOULOS, 2015).

Um outro tipo de mudança fenotípica é conhecido por *switching* e consiste na mudança morfológica na cor da colônia, que passa de branca para opaca, de forma espontânea e que está ligada à mudança morfológica das células fúngicas (RIKKERINK, MAGEE e MAGEE, 1988).

O *switching* pode prover aos fungos a diversidade fenotípica que se espera de microrganismos invasivos, aumentando sua capacidade de aderir-se e invadir diferentes tecidos. Já foi visto *in vitro* que as células brancas de *C. albicans* possuem um volume de 33 μm^3 enquanto as células opacas possuem um volume de 114 μm^3 , de forma que as primeiras corpos menores podem reduzir de forma mais eficiente o espaço entre a levedura e as células epiteliais, aumento a adesão. Ainda, o *switching* está envolvido na regulação da transcrição de genes relacionados à resistência aos antifúngicos (SLUTSKY, BUFFO e SOLL, 1985; SLUTSKY et al., 1987; RIKKERINK, MAGEE e MAGEE, 1988; VARGAS et al., 2000; JAIN, HASAN e FRIES, 2008)

Em *C. albicans*, o *switching* é amplamente conhecido e pode manifestar-se na mudança da cor da colônia de branca para opaca. As células brancas são capazes de formar hifas que invadem os tecidos do hospedeiro, sendo estas mais virulentas, enquanto que as células opacas têm a função de realizar *mating* com outras células opacas e produzir uma população recombinante. As células brancas e opacas também diferem na expressão de diversos genes não relacionados ao *mating*, tal como as adesinas, sugerindo que estes dois tipos celulares estão adaptados para colonizar diferentes tecidos do hospedeiro. As células opacas também são mais sensíveis ao ataque por neutrófilos do que células brancas (RIKKERINK, MAGEE e MAGEE, 1988; KOLOTILA e DIAMOND, 1990; FORCHE et al., 2008; BERMAN, 2012; SASSE et al., 2013).

Trichosporon asahii também apresenta *switching* fenotípico em colônias cultivadas em laboratório após a passagem dos isolados em modelo murino. Os isolados ambientais de *T. asahii* crescem como colônias rugosas compostas por mais de 99% de hifas, enquanto os isolados clínicos crescem como colônias pulverulentas

compostas por mais de 90% de arthroconídios e blastoconídios (KARASHIMA et al., 2002). No estudo realizado por Ichikawa e colaboradores (2016) também foi demonstrado que os isolados clínicos de *T. asahii* possuíam maior virulência quando comparados aos isolados ambientais, visto que as células das colônias que obtiveram maiores taxas de adesão em material abiótico apresentaram em sua maioria morfologia de hifas e arthroconídios. Embora os mecanismos dessas mudanças fenotípicas não sejam conhecidos em *Trichosporon* spp. sugere-se que sirvam para evadir das defesas do hospedeiro (ODDS, 1997; KARASHIMA et al., 2002; ICHIKAWA et al., 2004; ICHIKAWA et al, 2016).

Assim como em outros microrganismos as espécies do gênero *Trichosporon* produzem e secretam enzimas no ambiente para retirada de nutrientes e que lhes permitem aumentar a patogenicidade ao quebrar proteínas e romper a membrana celular das células do hospedeiro. Em estudo realizado por Bentubo e Gompertz (2014) foram analisadas a atividade de enzimas líticas em 44 isolados de *Trichosporon* spp. Nos 18 isolados de *T. asahii* foi detectada atividade de protease (66,7%), fosfolipase (33,3%), lipase (100%) e DNase (44,4%). A produção dessas enzimas extracelulares está relacionada a fatores de estabilidade fisiológica desse fungo como a temperatura, na qual a atividade enzimática foi mais eficiente quando os isolados foram incubados a 37°C (COLOMBO, PADOVAN e CHAVES, 2011; BENTUBO e GOMPERTZ, 2014).

Outro fator associado a virulência apresentado por *T. asahii* é a produção do componente de parede celular Glicoronoxilomanana (GXM). Esse polissacarídeo é semelhante ao produzido pelos fungos do gênero *Cryptococcus*, nos quais promove a evasão da atividade fagocítica e proteção contra a resposta imune do hospedeiro. Em estudo de Fonseca e colaboradores (2009) foi realizada a análise estrutural e funcional da GXM produzida por *T. asahii* e comparou-se com as propriedades da GXM produzida por *C. neoformans*. As similaridades estruturais encontradas entre a GXM produzida por *C. neoformans* e *T. asahii* sugerem que a GXM de *T. asahii* possui os mesmos aspectos funcionais da GXM produzida por *C. neoformans*, conferindo-lhe maior resistência à fagocitose e modulação da resposta imune do hospedeiro. O estudo feito por Karashima et al. (2002) mostrou que em isolados clínicos de *T. asahii* as concentrações de GXM eram maiores do que em isolados ambientais e após passagem dos isolados ambientais *in vivo* os níveis de GXM ficaram semelhantes aos

dos isolados clínicos (KARASHIMA et al., 2002; FONSECA et al., 2009; URAI et al., 2016).

Um dos fatores de risco para o desenvolvimento de uma infecção sistêmica causada por *T. asahii* é a presença de dispositivos invasivos, como catéteres intravenosos ou urinários e próteses ortopédicas ou estéticas. Esses dispositivos servem como substrato para a adesão de células de *T. asahii* e desenvolvimento de biofilmes, a partir dos quais dispersam-se para outros locais do hospedeiro causando tricosporonose sistêmica (DI BONAVENTURA et al., 2006; COLOMBO, PADOVAN e CHAVES, 2011).

Uma vez diagnosticada a infecção invasiva por *T. asahii* o tratamento torna-se difícil pela alta capacidade de formação de biofilme, levando a se desenvolver em diversos órgãos e tecidos como rins, cérebro, meninges, válvulas cardíacas, inclusive em superfícies abióticas que estejam em contato com o paciente de onde pode se disseminar para outras partes do organismo (SIDAROUS, O'REILLY e CHERUBIM, 1994; HESLOP et al., 2011; CHAITANYA et al., 2015).

A arquitetura de um biofilme maduro de *T. asahii* se caracteriza por um agregado celular com diferentes morfologias, hifas metabolicamente ativas entrelaçadas com leveduras, mergulhado em uma matriz extracelular polissacarídica (*Extracellular Polysaccharide* - EPS) composta de manose e resíduos de glicose presentes na parede celular e que lhe confere estabilidade estrutural e fisiológica (DAVEY e O'TOOLE, 2000; DI BONAVENTURA et al., 2006).

Como apresentado por outros fungos, *T. asahii* tem a capacidade de formar biofilmes a partir da adesão ao substrato, crescimento da colônia e maturação do biofilme, indo de uma monocamada celular até uma multicamada estruturada (DI BONAVENTURA et al., 2006; ITURRIETA-GONZÁLES et al., 2014).

A matriz tem a função de imobilizar e manter próximas as células do biofilme, protegendo-as da dessecação, oxidação e do sistema imune do hospedeiro. A matriz também serve como barreira à ação dos antifúngicos utilizados no tratamento contra infecções, pois dificulta o acesso dos fármacos às células do biofilme. Essa função de barreira da matriz explica a alta resistência do biofilme aos antifúngicos em comparação com as células planctônicas (BROWN, 1993; HAWSER e DOUGLAS, 1994; AL-FATTANI e DOUGLAS, 2004; FONSECA et al., 2009; FLEMMING e WINGENDER, 2010).

Os biofilmes conferem ao *T. asahii* resistência aos antifúngicos apresentando CIMs pelo menos mil vezes maiores do que as apresentadas por células planctônicas, conforme pode ser observado nos estudos de Iturrieta-González e colaboradores (2014). Em estudo realizado por Liao e colaboradores (2014) em biofilmes com combinações de antifúngicos, a combinação Voriconazol/Anfotericina B teve maior porcentagem de efeito sinérgico (87,5%). As combinações Anfotericina B/Caspofungina e Voriconazol/Caspofungina não apresentaram efeito sinérgico (93,75% e 81,25% respectivamente) (ITURRIETA-GONZÁLES et al., 2014; LIAO et al., 2014).

Outro mecanismo, que junto com o biofilme promove maior resistência dos fungos à ação dos fármacos, é a presença das bombas de efluxo. Estas bombas são compostas por diversas famílias de proteínas que realizam o transporte de compostos tóxicos para fora da célula. Em fungos, as duas principais famílias são a Cassete de Ligação a ATP (ABC) e a Superfamília dos Facilitadores Maiores (MFS) (HIGGINS, 1992; WHITE, MARR e BOWDEN, 1998; SORBO, SCHOONBEEK e DE WAARD, 2000).

A família ABC hidroliza ATPs para transportar os solutos através da membrana celular e as proteínas dessa bomba são sintetizadas a partir dos genes *CDR1*, *CDR2*. Esses genes estão ligados a resistência aos azólicos *in vitro* conforme foi descrito nos estudos de Prasad et al., (1995), Sanglard et al., (1997) e Mukherjee et al., (2003). As bombas ABC são transportadores primários pois podem transportar solutos mesmo contra gradinetes eletroquímicos. A família MFS utiliza a força proto-motora para transportar solutos através da membrana e o gene de maior importância clínica em fungos é o *MDR1* expresso em *C. albicans* (FLING et al., 1991). Esse gene também foi relacionado à resistência aos azólicos *in vitro* (FLING et al., 1991; PRASAD et al., 1995, 2006; SANGLARD et al., 1996, SANGLARD et al, 1997; WHITE, MARR e BOWDEN, 1998; SORBO, CHOONBEEKS e DE WAARD, 2000; MUKHERJEE et al., 2003; AL-FATTANI e DOUGLAS, 2004; CANNON et al., 2009).

2.4 Interação patógeno-hospedeiro

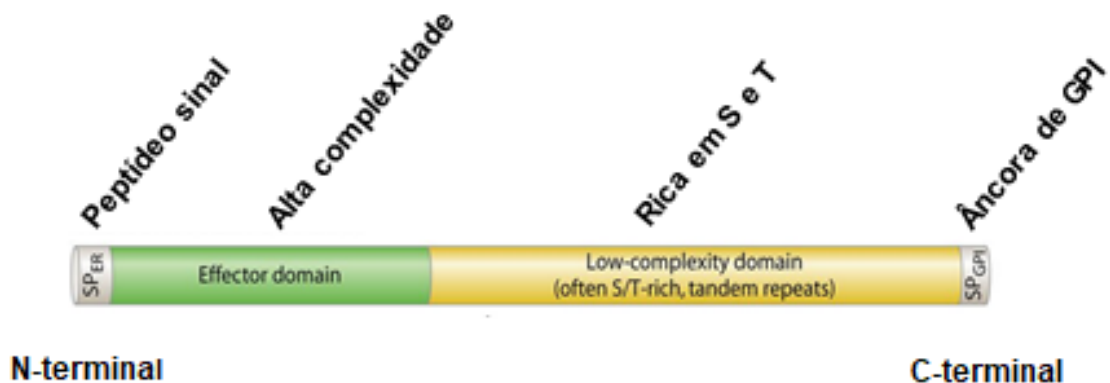
Proteínas expressas na superfície celular de fungos são responsáveis pela interação do patógeno com o substrato em que se dará o início da infecção. Essas proteínas medeiam interações proteína-proteína, proteína-açúcar ou outros tipos de

interação com o substrato e com moléculas do hospedeiro. As proteínas de superfície responsáveis pela interação inicial com o hospedeiro são amplamente conhecidas em leveduras e em fungos filamentosos, sendo o modelo mais estudado *Candida* sp. que possui diversas semelhanças com *T. asahii*. Contudo, nada se conhece sobre esses tipos de proteínas em *T. asahii* e se as mesmas participam ou não da formação de biofilmes (SUNDSTROM, 1999; HOYER, 2001; VERSTREPEN, REYNOLDS e FINK, 2004; GROOT et al., 2013; DUARTE-OLIVEIRA et al., 2017).

Para que *Candida* sp. possa iniciar a invasão e disseminação em tecidos deve realizar a adesão à células e moléculas diversas do hospedeiro. Essa etapa inicial da invasão é feita por meio de diferentes adesinas presentes na parede celular (KARKOWSKA-KULETA, RAPALA-KOZIK e KOZIK, 2009).

As adesinas clássicas (Figura1) são proteínas que apresentam um peptídeo sinal de endereçamento celular, localizado em sua porção N-terminal, seguida por um domínio efetor de alta complexidade, responsável pela interação com outras proteínas do ambiente, uma região repetitiva de baixa complexidade e rica nos aminoácidos serina e treonina e, finalmente, uma âncora de GPI na porção C-terminal, que é a região responsável por fixar a adesina na membrana fúngica (Groot et al., 2013).

Figura1 - Modelo de adesina fúngica clássica



Fonte Adaptado de Groot et al., 2013

Em *Candida* spp. as adesinas mais conhecidas incluem as famílias *ALS* (*Agglutinin-Like Sequence*), *HWP* (*Hyphal Wall Protein*), *IFF/HYR* (*IPF Family F/Hyphally Regulated Protein*) e a *EPA* que são membros da classe de proteínas de parede celular dependentes de glicosilfosfatidilinositol (GPI-CWP), que possuem

peptídeo sinal na porção N-terminal, permitindo a entrada no retículo endoplasmático e posterior secreção por via clássica (SUNDSTROM, 2002; DE GROOT et al., 2013).

A família ALS possui oito genes codificadores de glicoproteínas de superfície, cujos domínios da região N-terminal são semelhantes à imunoglobulina (Ig). As proteínas possuem afinidade a diferentes substratos como a Als1p, Als3p e Als5p que ligam-se ao colágeno, fibronectina, laminina e células epiteliais e endoteliais, enquanto que a Als6p se liga ao colágeno e a Als9p à laminina. A Als4p medeia a adesão ao endotélio, a Als5p é responsável pela agregação célula-célula do fungo e a Als7p tem afinidade por superfícies abióticas (HOYER, 2001; FILLER, 2006; GROOT et al., 2013).

A família HWP possui dois genes que sintetizam proteínas de superfície responsáveis pela adesão aos tecidos do hospedeiro. A Hwp1p possui a região N-terminal rica em resíduos de glutamina que servem de substrato para as transglutaminases presentes na superfície de células epiteliais, facilitando a interação de *Candida* sp. com tecidos revestidos por este tipo celular. A Hwp2p é responsável pela ligação a tecidos epiteliais e pela formação de biofilme (CHAFFIN, 2008; YOUNES et al., 2011; GROOT et al., 2013).

Ainda, foi verificado que proteínas do tipo Eap1, a princípio identificadas em *Saccharomyces cerevisiae*, são sintetizadas por *Candida* sp. tanto na forma de levedura quanto de hifa, e contribuem na formação de biofilme, adesão a epitélios, superfícies abióticas e adesão célula-célula (CHAFFIN, 2008; DE GROOT et al., 2013).

A segunda maior família de genes que produzem proteínas de superfície em *Candida* spp. é a IFF/HYR, que contém 12 genes (*HYR1*, *IFF1-IFF11*). Dez genes dessa família possuem âncoras de GPI e somente dois, o IFF10 e IFF11, não possuem sequências dessas âncoras. O gene *HYR1* medeia a resistência a morte por neutrófilos e o anticorpo anti-Hyr1p promove imunidade contra infecção disseminada em modelo murino. O gene *IFF11* é necessário para a integridade da estrutura da parede celular visto que a deleção desse gene torna a parede mais sensível a agentes perturbadores, além de ser necessário para a manutenção da virulência desse fungo. Pouco foi elucidado sobre essa família, não se conhecendo os ligantes moleculares bióticos ou abióticos das proteínas sintetizadas por esses genes (BAILEY et al., 1996; BATES et al., 2007; RICHARD e PLAINE, 2007; LUO et al., 2010; GROOT et al., 2013).

A família *EPA*, com 17 genes, é encontrada em *C. glabrata*, sendo os genes mais estudados o *EPA1*, *EPA6* e *EPA7*. Conforme trabalhos realizados por Zupancic et al. (2008) e Maestre-Reyna et al. (2012), as proteínas Epa1, Epa6 e Epa7 são capazes de ligarem-se a oligosacarídeos que possuem resíduo de galactose terminal. Essa capacidade permite que se liguem às glicoproteínas de superfície das células epiteliais do hospedeiro. A especificidade de glicanos que essas proteínas podem se ligar varia entre elas, sendo a Epa6p a que possui maior gama de ligantes, seguida da Epa1p e depois a Epa7p (CORMACK, GHORI e FALKOW, 1999; ZUPANCIC et al., 2008;; KUHN e VYAS, 2012; MAESTRE-REYNA et al., 2012; GROOT et al., 2013).

Até o momento foram descritas duas adesinas no filo Basidiomycota, no qual está classificado o gênero *Trichosporon*. Essas adesinas foram encontradas em *C. neoformans* e trata-se de uma proteína secretada com função de adesão denominada de Cfl1 (cell flocculin 1) (WANG, ZHAI e LIN, 2012) e uma proteína de parede denominada MP84 (TEIXEIRA et al., 2014). A secreção da proteína Cfl1 é necessária para a realização de sua função reguladora da morfologia da colônia, adesão célula-célula, formação de biofilme e adesão ao hospedeiro. Essa adesina, diferente de outras conhecidas, não possui na porção C-terminal peptídeo de ancoragem dependente de GPI nem peptídeo de ligação na porção N-terminal, sendo única em sua estrutura (GROOT et al., 2013; GYAWALI et al., 2017). Já a MP84 é responsável por mediar a adesão entre as células de *C. neoformans* e as células epiteliais do pulmão humano (TEIXEIRA et al., 2014)

No estudo foi demonstrado que a Cfl1p é altamente induzida durante o processo de *mating* para realizar a morfogênese da colônia. Durante este processo essa proteína é liberada no meio extracelular e age de forma parácrina induzindo a síntese de Cfl1p por células vizinhas e transformação para a fase de hifa, aumentando o poder de adesão da colônia como um todo (WANG et al., 2013).

Para o sucesso na infecção, o patógeno deve vencer as barreiras físicas que impedem sua disseminação pelos tecidos do hospedeiro. Entre as principais barreiras físicas encontram-se as camadas de células epiteliais e endoteliais reforçadas por uma matriz extracelular (ECM). Os fungos patogênicos expõem em sua superfície um conjunto de proteínas que interagem com os principais componentes da matriz extracelular como a laminina, fibronectina e plasminogênio (KARKOWSKA-KULETA, RAPALA-KOZIK e KOZIK, 2009; KOZIK et al., 2015).

Além das adesinas, são encontradas na parede fúngica, a exemplo de *Candida* spp., proteínas que presumivelmente deveriam se localizar apenas no citoplasma da célula, a exemplo de enzimas da via glicolítica como: enolase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e aldolase. O papel dessas proteínas fora do citoplasma vem sendo cada vez mais estudado e sabe-se que essas proteínas estão envolvidas nos processos de adesão e imunogenicidade na relação patógeno-hospedeiro. (SWOBODA et al., 1993; SUNDSTROM e ALIAGA, 1994; SUNDSTROM; JENSEN e BALISH, 1994).

A enolase (2-fosfo-D-glicerato hidrolase) é a proteína glicolítica mais abundante da parede celular de *Candida* spp. e é encontrada em grandes quantidades em sobrenadantes de *C. albicans*. Essa proteína possui papel ativo na interação entre o fungo e as células do hospedeiro por sua capacidade de adesão ao plasminogênio e à plasmina. Além da adesão às proteínas do hospedeiro, a enolase tem papel imunogênico como demonstrado no trabalho de Li e colaboradores (2013) ao detectar *in vitro* anticorpos IgG para enolase recombinante de *Candida* spp. SUNDSTROM e ALIAGA, 1994; JONG et al., 2003; LI et al., 2013; SILVA et al., 2014; NIMRICHTER et al., 2016).

A GAPDH (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) é outra proteína localizada na face externa da parede celular de *Candida* spp. e possui a capacidade de realizar ligação com a laminina e a fibronectina presentes na ECM. A GAPDH foi encontrada no sobrenadante de *C. albicans* em níveis semelhantes aos da Enolase na fase de hifa mas não foi detectada na fase de levedura (SUNDSTROM, 1994). No trabalho de Lau e colaboradores (2013) com *Penicillium marneffeii*, a GAPDH foi regulada positivamente durante a fase micelial realizando a ligação entre os conídios e a ECM de tecido epitelial. Ao contrário da Enolase, a GAPDH possui baixa imunogenicidade e conforme descrito por Gil et al. (2006) a exposição aos anticorpos para essa proteína em modelo murino não conferiram proteção para a candidíase disseminada (SUNDSTROM e ALIAGA, 1994; GIL et al., 2006; LAU et al., 2013).

A aldolase é outra proteína da via glicolítica que se encontra na face externa da parede celular de *Candida* spp., *S. cerevisiae* e *C. neoformans*. e possui a capacidade de ligação ao plasminogênio e conseqüente invasão da ECM. Essa proteína possui capacidade de incitar respostas hiperalérgicas no hospedeiro como demonstrado por Ishiguro et al. (1992), que isolou IgE a partir do soro de pacientes

inoculados com aldolase de *C. albicans* (ISHIGURO et al., 1992; PITARCH et al., 2001; CROWE et al., 2003; STIE, BRUNI e FOX, 2009; LAU et al., 2013).

Em *Malassezia furfur*, fungo dermatófito capaz de crescer tanto como levedura quanto como hifas, também foi observada a presença de enzimas extracelulares a exemplo de lipases e proteases. O fungo é lipodependente adquirindo os ácidos graxos a partir do hospedeiro pela secreção de lipases quando o pH varia de 3,5 a 6,0, com atividade máxima observada em pH 4,5. As proteases de *M. furfur* também são secretadas numa variação de pH de 3,0 a 4,0 com atividade máxima observada em pH 3,5. A secreção de enzimas extracelulares em *M. furfur* varia de acordo com a morfologia apresentada pelo fungo, tendo sido observado que as hifas possuem maior secreção de lipases e proteases do que a forma de leveduras, sugerindo que as hifas de *M. furfur* estão associadas as formas mais graves de infecção (JUNTACHAI e KAJIWARA, 2015; WU et al., 2015; McCOTTER, HORIANOPOULOS e KRONSTAD, 2016; LI et al., 2017).

Nos trabalhos realizados por Puccia e colaboradores (2011) e Puccia, Vallejo e Longo (2017) foram descritas diversas proteínas encontradas na parede celular do fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*, sendo algumas delas com função enzimática como proteases, que degradam proteínas da matriz extracelular do hospedeiro facilitando a invasão e a disseminação pelos tecidos durante o processo infeccioso. Longo e autores (2014) demonstraram que as proteínas de parede são expressas de forma diferencial nas duas fases morfológicas de *P. brasiliensis* e em diferentes isolados oriundos de paracoccidoidomicose crônica.

Em *Trichosporon asahii* foram detectadas proteínas extracelulares com atividade enzimática como proteinases, lipases, fosfolipases, DNases e hemolisinas, com prevalência na atividade de lipases e fosfolipases, embora diferentes isolados tenham apresentado perfis diferentes na produção dessas enzimas extracelulares. A temperatura ótima da atividade cinética de proteases e lipases é cerca de 37°C, de forma que isso favorece a capacidade de *T. asahii* em invadir e disseminar-se pelos tecidos do hospedeiro (SUN et al., 2012; BENTUBO e GOMPertz, 2014; DUARTE-OLIVEIRA et al. 2017; MONTOYA et al., 2017).

Além das proteínas extracelulares que possuem papel na interação com o hospedeiro, diversos fungos podem sobreviver e evadir da ação dos fagócitos. Esses fungos sintetizam eumelanina a partir da diidroxinaftaleno-melanina que em *Aspergillus fumigatus* foi demonstrado inibir a fusão de lisossomos. É sabido que *T.*

asahii realiza deposição de eumelanina na parede celular, possivelmente também apresentando a capacidade de impedir a fusão de lisossomos. Além disso, *T. asahii* possui enzimas antioxidantes, como catalase e superóxido dismutase, protegendo-o da ação das espécies reativas de oxigênio liberadas pelo hospedeiro (THYWIßEN et al., 2011; DA SILVA-DANTAS et al., 2016; ZHANG et al., 2016; DUARTE-OLIVEIRA et al., 2017).

3 OBJETIVOS

Os objetivos fundamentados para o seguinte trabalho estão descritos nos itens 3.1 e 3.2.

3.1 Objetivo Geral

Verificar se potenciais adesinas são expressas em leveduras e hifas de *Trichosporon asahii* e se são encontradas na superfície celular deste fungo.

3.2 Objetivos específicos

- a) Obter antissoros policlonais em modelo murino contra extratos proteicos totais de leveduras e de hifas de *T. asahii* para testar a capacidade de reconhecimento destes antissoros frente as diferentes morfologias;
- b) Realizar modelagem molecular de quatro proteínas preditas como adesinas para seleção e síntese de peptídeos sintéticos com potencial imunogênico;
- c) Gerar anticorpos policlonais em modelo murino utilizando os peptídeos sintéticos a fim de utilizá-los na localização celular das adesinas nativas em leveduras e hifas de *T. asahii*;
- d) Realizar a análise de expressão gênica das quatro adesinas preditas em leveduras e hifas de *T. asahii*;
- e) Realizar ensaio *in silico* de *docking* molecular das quatro adesinas preditas de *T. asahii* com proteínas humanas que possam participar da interação patógeno-hospedeiro.

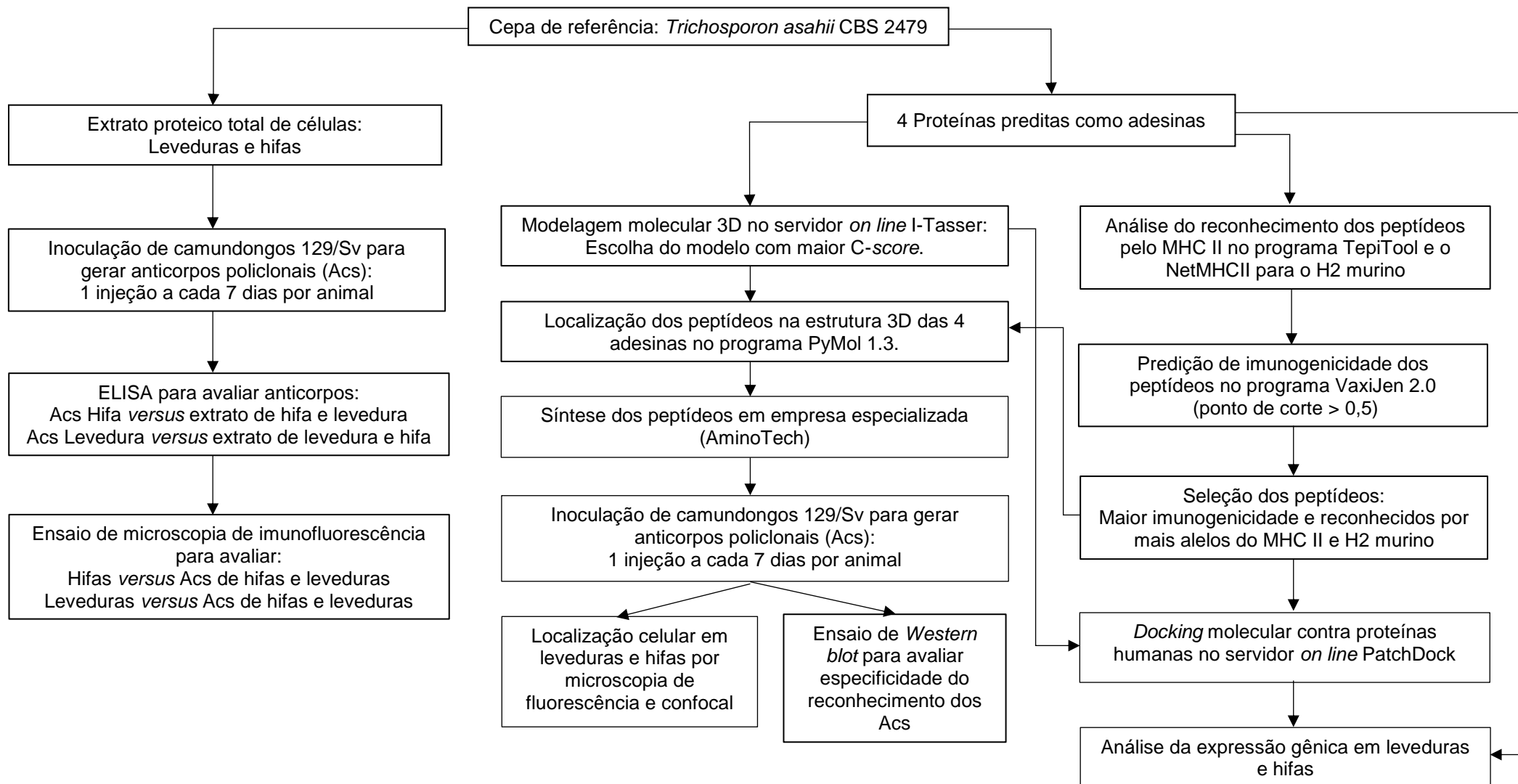
4 MATERIAL E MÉTODOS

Para responder os objetivos propostos foram aplicadas diferentes metodologias descritas nos itens abaixo.

4.1 Delineamento experimental

O presente trabalho foi composto pelas seguintes etapas apresentadas no fluxograma da figura 2.

Figura 2 - Fluxograma do delineamento experimental contendo todas as etapas cumpridas.



Legenda Acs: Anticorpos

4.2 Isolado utilizado

Foi utilizada a cepa referência de *T. asahii* CBS2479, isolado clínico obtido a partir de lesão de psoríase. Seu genoma foi sequenciado e possui anotação de genes com predição de proteínas hipotéticas, podendo ser encontrado no banco de dados de genomas público do NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=trichosporon> (YANG et al., 2012).

4.3 Obtenção dos extratos proteicos de leveduras e hifas e *T. asahii*

4.3.1 Análise da viabilidade e pureza do isolado fúngico

O isolado de *T. asahii* CBS 2479 foi cultivado em placa de meio *Sabouraud* Desxtrose Agar (SDA - Himedia) a partir de uma amostra criopreservada a -80°C, em estufa a 37°C por 24 horas. A pureza foi avaliada através de semeadura do isolado em meio *CHROMAgar*® *Candida* (Difco) crescido por 3 dias em temperatura ambiente, protegido da luz solar. Após a confirmação da pureza do isolado, o mesmo foi repicado em placa de meio SDA em temperatura ambiente, protegido da luz, por sete dias.

4.3.2 Condições de crescimento para indução de leveduras e hifas

O isolado *T. asahii* CBS 2479 foi semeado a partir de uma placa de meio SDA, cultivada em temperatura ambiente, em um Erlenmeyer contendo 25 mL de meio *Sabouraud* líquido (*Sabouraud Dextrose Broth* – Himedia) para indução de leveduras e outro Erlenmeyer contendo 25 mL de meio líquido RPMI 1640 (Cultilab) para indução de hifas, na temperatura de 37°C, com rotação de 180 rpm, por 16 horas. Após este período as culturas foram centrifugadas e lavadas duas vezes com PBS em velocidade de 2.950 g, por 5 minutos. Em seguida, as células foram ressuspensas em 20 mL de PBS para a contagem das leveduras e das hifas em câmara de Neubauer (Marinfeld) em microscópio de luz Nikon Eclipse E2000.

4.3.3 Extração de proteínas totais para inoculação em camundongos

As proteínas totais das leveduras e das hifas de *T. asahii* foram extraídas conforme a metodologia proposta por Von der Haar (2007).

A extração foi realizada a partir das células cultivadas nas condições descritas no item 4.3.2, de forma que a extração foi feita com leveduras crescidas em caldo *Sabauroud* e em hifas crescidas em meio RPMI 1640.

Volumes equivalentes a contagem de 10^8 células/mL foram pipetados em tubos do tipo Falcon e centrifugados em velocidade de 4000 rpm, por 5 minutos para retirada do PBS e ressuspensas em 200 μ L de tampão de lise (0.1 M NaOH, 0.05 M EDTA, 2% SDS e 2% β -mercaptoetanol). Em seguida, as células foram incubadas em banho-maria a 90°C, por 20 minutos. Após esse período, foram adicionados 5 μ L de ácido acético 4 M e incubadas por mais 20 minutos em 90°C, a fim de que as proteínas totais fossem extraídas das células lisadas de leveduras e hifas, separadamente.

Os lisados foram centrifugados e os sobrenadantes foram transferidos para tubos do tipo Falcon. Foi adicionado a cada sobrenadante 4 volumes de metanol, 1 volume de clorofórmio, e 3 volumes de água Milli-Q, sendo misturados em vórtex após a adição de cada reagente. Os lisados foram centrifugados a 4000 rpm por 5 minutos, e a fase aquosa acima da camada de proteínas foi removida.

Foram adicionados mais 3 volumes de metanol e misturado em vórtex, seguido de centrifugação e remoção do sobrenadante. Os *pellets* de proteínas totais foram secos em temperatura ambiente dentro da cabine de fluxo laminar (Labconco Class II) e então ressuspensos em 1 mL de PBS.

4.3.4 Quantificação dos extratos de proteínas totais

A quantificação das proteínas totais foi realizada utilizando o método de Bradford (1976), que consiste em pipetar 0.1 mL de diferentes concentrações crescentes de uma solução de BSA 1mg/mL em cubetas e então adicionar 0.9 mL de reagente de Bradford em cada cubeta. Essas cubetas foram levadas para serem lidas em espectrofotômetro BEL S-2000 a 595 nm e os resultados obtidos foram plotados para montar uma curva padrão. As medições para a curva padrão foram feitas em triplicata.

Para quantificar os extratos de proteínas totais de leveduras e hifas, uma amostra de 50 µL do extrato proteico de levedura ou de hifa foi pipetado em uma cubeta com 950 µL de reagente de Bradford e a absorbância lida em 595 nm. Os resultados foram substituídos na fórmula do gráfico e dada a quantidade de proteínas totais em cada extrato.

Foi feito gel de Poliacrilamida a 10% para corrida das proteínas totais com a finalidade de verificar se as mesmas estavam íntegras para inoculação nos camundongos.

4.4 Imunização dos camundongos com os extratos totais de leveduras e hifas de *T. asahii* e com os peptídeos sintéticos

4.4.1 Animais utilizados

Foram utilizados camundongos isogênicos 129/Sv, machos, com idade de 8 semanas para proceder com as imunizações.

Para os extratos de proteínas totais de leveduras e hifas de *T. asahii* CBS 2479 foram utilizados 6 animais, sendo 3 para cada extrato.

Para os peptídeos sintéticos (item 5.10) foram utilizados 7 animais, sendo 2 para os peptídeos das proteínas CFL1-*like*, Beta-*like* e Mar-*like* e 1 animal para o peptídeo da proteína Restina-*like*.

Os animais foram gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Patrícia Paiva Corsetti de Almeida da Universidade José Rosário Vellano – UNIFENAS. Os mesmos foram mantidos no biotério da UNIFAL-MG na sala D101.

Para a realização desta etapa do projeto, o mesmo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA, sob número de protocolo 53/2017 (Anexo A) da Universidade Federal de Alfenas-UNIFAL, com posterior retificação da linhagem dos animais aceita pelo CEUA (Anexo B).

4.4.2 Imunização dos camundongos

Para as imunizações foi seguido o protocolo de Nunes *et al* (2009). Para obtenção do soro pré-imune os animais foram sedados com 80 µL de uma solução anestésica (200 µL de Ketamina 10%, 50 µL de Xilasina 2%, 500 µL de PBS) por via

intraperitoneal. Após a constatação da sedação, com o auxílio de uma agulha, foi puncionada a veia facial e o sangue foi colhido em tubo do tipo *Eppendorf*. O sangue colhido foi centrifugado a 1.260 g por 10 minutos. O soro foi recolhido e guardado a -20°C.

Na primeira imunização foram injetados em cada animal, por via intraperitoneal, 10 µL de extrato de proteínas totais de leveduras ou de hifas a 1µg/µL ou 10 µg de peptídeos em 10 µL (Item 4.7.5), diluídos com 50 µL de adjuvante completo de Freund (Sigma-Aldrich®) 1mg/mL. Para as duas imunizações subsequentes também foram injetados 10 µL de proteínas totais de leveduras ou hifas a 1µg/µL ou 10 µL dos peptídeos também a 1µg/µL (Item 4.7.5), diluídos com 50 µL de adjuvante incompleto de Freund, com um espaço de sete dias entre as imunizações.

4.4.3 Coleta de antissoro

Para a coleta do antissoro, cada animal foi eutanasiado com injeção letal intraperitoneal de 100 µL dos anestésicos Xilasina 2% e Ketamina 10% na proporção de 1:1. Os movimentos dos animais foram monitorados por estímulo dos reflexos nas patas até a constatação de que cessaram completamente, indicando a sedação profunda.

A caixa torácica de cada animal foi aberta cirurgicamente para exposição do coração. Com auxílio de seringa e agulha de insulina foi feita a punção do sangue por via cardíaca. O sangue coletado foi colocado em tubos do tipo *Eppendorf*, separados por cada animal. Cada tubo foi levado para estufa a 37°C por 30 minutos e posteriormente centrifugados a 1.260 g por 10 minutos.

Os antissoros contra os peptídeos sintéticos e contra os extratos proteicos de leveduras ou hifas de *T. asahii* foram coletados e armazenados em tubos do tipo *Eppendorf* a -20°C.

4.5 Ensaio ELISA

Para o reconhecimento das proteínas totais pelos soros pré-ímmune e os provenientes da imunização por proteínas totais de leveduras e hifas, foi realizado um ensaio por ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Nas placas utilizadas nos

ensaios, cada poço foi sensibilizado com 1 µg de extratos de proteínas totais de leveduras ou hifas diluído em 100 µL de tampão de ligação (para 1 L de tampão: 1,5 g de Na₂CO₃, 2,93 g de NaHCO₃, 1.000 mL de H₂O destilada, pH 9,6) e incubados *overnight* a 4°C,

Passado o período de incubação, as placas foram lavadas cinco vezes em solução de lavagem (para 1 L de solução: 9 g de NaCl, 0,5 mL de Tween 20 e 1.000 mL de H₂O destilada). Em seguida, os poços foram bloqueados com 200 µL de tampão de bloqueio (5% de leite em pó desnatado em PBS + Tween 20 a 0,05%) e as placas foram levadas para incubação por uma hora em estufa a 37°C. Após o período de incubação, as placas foram lavadas cinco vezes na solução de lavagem.

Foram pipetados 100 µL dos antissoros primário diluídos em tampão de incubação (3% de SFB em PBS + Tween 20 a 0,05%) nas seguintes diluições: não-diluído, 1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000 e 1:100.000. As placas foram levadas para incubar por uma hora na estufa a 37°C e depois lavadas cinco vezes em solução de lavagem. Em seguida, foram pipetados 100 µL de anticorpo secundário (conjugado anti IgG com peroxidase *anti-mouse*) na proporção de 1:7.000, diluído em tampão de incubação (3% de SFB em PBS + Tween 20 a 0,05%) e incubado por uma hora em estufa a 37°C e depois lavada cinco vezes em solução de lavagem.

Para a revelação do ELISA, foi misturado um tablete de OPD (Dicloridrato de o-fenilenodiamina – Sigma®) em 40 mL de tampão citrato (para 100 mL: 1,92 g de ácido nítrico, 1,41 g de Na₂HPO₄, 100 mL de de H₂O destilada, pH 4,5) e então adicionados 40 µL de peróxido de hidrogênio à solução. Foram pipetados 100 µL da solução OPD citrato em cada poço. As placas foram cobertas com papel alumínio e deixadas para reagir por 15 minutos em temperatura ambiente. Após esse período, foram pipetados 100 µL de solução H₂SO₄ 2N em cada poço para parar a reação.

Foram feitas duas placas, sendo uma das placas para a titulação dos anticorpos gerados contra proteínas totais de hifas e contra proteínas totais de levedura e outra para realizar o ensaio de reconhecimento de cada anticorpo contra as proteínas totais da morfologia contrária a qual foram gerados. Em cada placa foram testados tanto os anticorpos gerados contra proteínas de leveduras quanto os anticorpos gerados contra proteínas de hifas, sendo que para cada diluição dos anticorpos foram realizadas cinco repetições. As placas foram levadas para serem lidas no leitor de ELISA Anthos Zenyth 200rt, no comprimento de onda de 490 nm e os dados gerados

foram plotados em planilhas no programa GraphPad Prism 7® e transformados em gráficos.

4.5.1 Determinação do valor de *cut-off* dos anticorpos

Para determinar qual seria o *cut-off* acima do qual o reconhecimento das proteínas totais pelos anticorpos gerados seria considerado positivo foi utilizada a seguinte fórmula (FREY, JAMES e ZURAKOWSKI, 1998):

$$\text{Cut - off} = \bar{X} + SD f$$

Onde,

$$f = t \sqrt{1 + (1/n)}$$

Nas quais:

\bar{X} é a média dos soros controle (não-imunes);

SD é o desvio padrão dos soros controle;

t é o percentil de um teste de t-distribuição de uma hipótese com $n - 1$ graus de liberdade;

n é o número de soros controle.

O valor de *cut-off* foi calculado para um nível de confiança de 99,9%.

4.5.2 Determinação do título dos anticorpos

Para determinar o título dos anticorpos foi utilizada a seguinte fórmula proposta por Bertini e colaboradores (2006):

$$\text{Título} = \frac{1}{\text{diluição } x \times 10^n}$$

Onde:

Diluição x – maior diluição com absorbância acima do *cut-off*

E n corresponde a:

$$\log_{FD} [(ODx - \text{cut off}) / (ODx - ODy)]$$

Na qual:

FD – fator de diluição da titulação,

OD_x – OD na diluição x

OD_y – OD na diluição subsequente a diluição x

4.5.3 Afinidade dos anticorpos

Outro ensaio foi realizado para determinar a afinidade dos anticorpos com os extratos proteicos para os quais foram gerados, seja de leveduras ou de hifas. Para esse ensaio, após a incubação com anticorpo primário na diluição 1:100, foi feita uma lavagem nos poços com 100 µL de ureia nas concentrações de 1M até 10M seguida de 4 lavagens com solução de lavagem e então adicionado o anticorpo secundário. As médias dos valores encontrados na análise com diferentes diluições de ureia foram submetidos à uma análise ANOVA para demonstrar se a distribuição de um grupo difere dos demais e ao teste de Tukey ($p < 0,05$) para demonstrar entre quais grupos essa diferença é estatisticamente significativa. Para cada ensaio foi determinado como *cut-off* a média da maior diluição de ureia com diferença estatisticamente significativa entre as diluições.

Para determinar a afinidade dos anticorpos foi feito o cálculo da porcentagem de queda (Q%) da ligação dos anticorpos gerados contra proteínas totais de leveduras e contra proteínas totais de hifas com as proteínas para as quais foram gerados ou contra os quais foram gerados, na diluição de ureia de 7M. A porcentagem de queda foi determinada pela seguinte fórmula:

$$Q\% = 100 - \frac{TU \times 100}{T}$$

Onde:

TU – DO observada com diluição de ureia

T – DO observada sem diluição de ureia

4.6 Microscopias de fluorescência e confocal de leveduras e hifas

Para as imunofluorescências de reconhecimento tanto dos extratos de leveduras e hifas contra células crescidas em cada uma das morfologias, quanto das

proteínas nativas nas células fúngicas utilizando-se antissoros contra os peptídeos sintéticos foram crescidos dois inóculos *overnight*, um em 5 mL de meio *Sabouraud* líquido e outro em 5 mL de meio líquido RPMI 1640, de forma que as culturas crescessem como leveduras e hifas, respectivamente. Após o crescimento, as culturas foram centrifugadas e lavadas duas vezes com PBS estéril. Após as lavagens, as células foram fixadas em solução de formaldeído 3% em PBS estéril e incubadas por uma hora em temperatura ambiente.

Após a fixação, a solução contendo as células foi centrifugada e lavada cinco vezes em PBS e ressuspensas de forma a manter a proporção de 10^6 células/mL. Foram pipetados 10 μ L de células ressuspensas em lâminas limpas e secas em temperatura ambiente. Após este tempo, as lâminas foram lavadas por imersão em PBS estéril por cinco vezes.

Todas as lâminas foram bloqueadas pipetando-se sobre as células secas 20 μ L de solução de BSA a 1% em PBS estéril e incubando-se as lâminas por uma hora, em temperatura ambiente. Após o tempo de incubação as lâminas foram lavadas cinco vezes por imersão em PBS.

Para ligação dos anticorpos policlonais às células na lâmina foram pipetados 20 μ L do soro pré-imune diluído na proporção 1:10 e antissoros policlonais imunes diluídos na proporção de 1:100, gerados contra os extratos totais de leveduras e hifas ou gerados contra os peptídeos sintéticos. As lâminas foram incubadas em câmara úmida por três horas, em temperatura ambiente. Terminada a incubação as lâminas foram lavadas cinco vezes por imersão em PBS estéril.

Anticorpo secundário *anti-mouse* conjugado com FITC (Isotiocianato de fluoresceína, SouthernBiotech) foi preparado na proporção de 1:200 diluído em PBS, para marcação de fluorescência. Foram pipetados 20 μ L dessa mistura sobre todas as células secas nas lâminas e incubadas por uma hora no escuro. Ao fim da incubação, as lâminas foram lavadas cinco vezes por imersão em PBS estéril e colocada uma gota de ProLong™ *Gold Antifade Mountant* com DAPI (4,6 Diamino-2-Fenilindol) sobre as células nas lâminas, que foram finalmente cobertas com lamínulas e seladas com esmalte incolor. A molécula de FITC é excitada pelo comprimento de onda de 488 nm (azul) e emite luz no comprimento de onda de 500 nm (verde) e a molécula de DAPI é excitada pelo comprimento de onda de 405 nm (azul) e emite luz no comprimento de onda de 450 nm (azul). As lâminas foram guardadas a -20°C até

serem observadas no microscópio de fluorescência confocal Nikon C2 do Laboratório de Fisiologia da Universidade Federal de Alfenas e as imagens obtidas pelo programa NIS-Elements AR 4.5.

4.7 Análises *in silico* de proteínas hipotéticas da superfície de *T. asahii* para determinação de peptídeos imunogênicos

Em trabalho prévio em nosso laboratório (JESUS, 2018), foram estudadas e selecionadas quatro sequências de proteínas hipotéticas a partir do genoma de *T. asahii* CBS 2479, depositado no banco de dados do NCBI, as quais possuem características de adesinas de superfície celular fúngica. Essas proteínas foram denominadas de Restina-*like*, com 325 aminoácidos, número de acesso NCBI XP_014176431; CFL1-*like*, com 507 aminoácidos (XP_014178337); Beta-*like*, com 1383 aminoácidos (XP_014181724), e Mar-*like*, com 406 aminoácidos (XP_014183496). As análises *in silico* destas proteínas foram realizadas com a colaboração do Prof. Dr. Nelson José Freitas da Silveira, do Laboratório de Bioinformática da Universidade Federal de Alfenas.

4.7.1 Determinação do peso molecular das proteínas selecionadas

Para determinar o valor do peso molecular das quatro proteínas foi utilizado o software online ExPASy, disponível em <https://web.expasy.org/compute_pi/>.

4.7.2 Predição de imunogenicidade dos peptídeos

As sequências das proteínas hipotéticas foram analisadas pelo *software on-line* TepiTool, disponível em <<http://tools.iedb.org/tepitool/>>, para serem preditos peptídeos hipotéticos com probabilidade de ligação com moléculas do MHC classe II e no *software on-line* NetMHCII 2.3, disponível em <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCII/>, para predição da ligação com moléculas do H2 murino.

Posteriormente, as sequências dos peptídeos dadas pelo TepiTool e pelo NetMHCII foram analisadas pelo *software on line* VaxiJen v 2.0, disponível em <<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>>, de forma a verificar o

potencial imunogenicidade de cada peptídeo, ao ultrapassar o valor de ponto de corte >0.5.

Foram selecionados os peptídeos que apresentaram ligação predita com o maior número de alelos do MHC classe II e H2 em conjunto com o maior valor predito de imunogenicidade.

Os peptídeos selecionados tiveram a sua localização analisada na estrutura 3D das proteínas para que fosse realizada a síntese daqueles que estivessem presentes externamente nas proteínas (Item 4.7.5).

4.7.3 Predição da estrutura terciária das proteínas selecionadas

As sequências de cada uma das quatro proteínas foram analisadas no servidor *on-line* I-Tasser, disponível em <<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>>, para a realização da predição dos modelos tridimensionais das estruturas terciárias das proteínas. Esse servidor utiliza algoritmos para prever a estrutura terciária das proteínas com base na hipótese formulada por Anfinsen (1973) que diz que a estrutura de uma proteína corresponde ao mínimo de energia livre dependente das interações no sistema da proteína (interações iônicas, não-covalentes, hidrofóbicas, proteína-solvente, pontes de hidrogênio e entropia). Esses cálculos fornecem um conjunto de posições dos átomos que compõem a proteína em que há um valor mínimo de energia livre. A previsão da estrutura de uma proteína com base no mínimo de energia livre é denominada de abordagem *ab initio* (KLEPEIS e FLOUDAS, 2003; LIWO et al., 1999; ZHANG, 2008).

Para os cálculos dos modelos 3D, o servidor I-Tasser faz a geração de moldes a partir de *templates* previamente selecionados de forma automática pelo próprio servidor e realiza a recuperação das regiões faltantes a partir de cálculos *ab initio*, resultando sempre em cinco modelos que são classificados quanto aos valores de C-score que variam de -5 a 2, sendo que um valor maior de C-score significa maior confiança do modelo gerado, assim para cada proteína foi escolhido o modelo que apresentou maior valor de C-score (ROY, KUCUKURAL e ZHANG, 2010).

Os modelos tridimensionais das quatro proteínas selecionados foram utilizados também para realização de ensaios *in silico* de *docking* molecular (Item 4.10).

4.7.4 Seleção dos peptídeos imunogênicos

Após a análise da imunogenicidade dos peptídeos (Item 4.7.2), foi realizada a localização de suas sequências na estrutura terciária fornecida pelo I-Tasser utilizando o software PyMol 1.3, sendo selecionados os peptídeos que apresentaram localização próxima à região *N*-terminal da proteína, bem como total exposição na superfície da estrutura terciária.

4.7.5 Síntese dos peptídeos imunogênicos

As sequências de aminoácidos dos peptídeos preditos como imunogênicos foram enviadas para a empresa AminoTech para serem sintetizados com grau de pureza $\geq 85\%$.

4.8 Análise da expressão gênica das adesinas em leveduras e hifas de *T. asahii*

4.8.1 Primers utilizados

Para análise da expressão gênica dos genes das quatro adesinas foram utilizados primer desenhados por Jesus (2018) (Tabela 1), com anelamento na temperatura de 60°C. Para normalização da análise de expressão gênica foi utilizado o gene da actina.

Tabela 1 – *Primers* utilizados para análise da expressão gênica nas condições de crescimento de leveduras e hifas.

Poteínas	Primers	Sequência	Tamanho do fragmento (pb)
Restina- <i>like</i>	<i>Fw</i>	5' CCCTTCTTCCTCCTCCACTC 3'	112
	<i>Rv</i>	5' AGAGGAAGGAGTGGGCTCAG 3'	
CFL1- <i>like</i>	<i>Fw</i>	5' CCAGAAGCAGGACAACACCA 3'	165
	<i>Rv</i>	5' ATCATGCAAGCCTTGAGGTC 3'	
Beta- <i>like</i>	<i>Fw</i>	5' CTCTGCCACTGACGGAGAGT 3'	100
	<i>Rv</i>	5' AATGATGTCTCCCTCCTGGAT 3'	
Mar- <i>like</i>	<i>Fw</i>	5' AACGGTGGAGACAACCAGAC 3'	109
	<i>Rv</i>	5' CCTTGCACTGGTTGTTGTTG 3'	
β -actina	<i>Fw</i>	5' CCTTCGTTCCCTTGGTCTTGA 3'	140
	<i>Rv</i>	5' TCAATGCCGTTGTACATGGT 3'	

Fonte: Jesus (2018).

4.8.2 Síntese de cDNA

Para síntese de cDNA foram utilizados RNAs de leveduras e hifas de *T. asahii* CBS 2479 previamente extraídos pelo protocolo do TRIZOL, seguindo modificações de Jesus (2018), e estocados em -80°C , já quantificados e tratados com DNase. Para realizar a síntese do cDNA foram preparadas duas misturas, sendo a primeira contendo 1 μL de oligo(dT) (50 μM), 1 μL de mix de dNTPs (10 mM) e volume de amostras de RNA suficientes para 1 μg , sendo o volume final da mistura de 13 μL . A mistura foi homogeneizada e aquecida a 65°C por 5 minutos e então incubada em gelo por 1 minuto.

A segunda mistura foi feita usando o kit *Superscript™ IV Reverse Transcriptase* (Invitrogen™) nos seguintes volumes: 1 μL (200U/ μL) de transcriptase reversa, 1 μL de estabilizador de enzima DTT (10 mM) e 4 μL da solução tampão 5X concentrada.

A primeira mistura foi adicionada à segunda e o tubo incubado a 55°C por 10 minutos e após esse período novamente incubado a 80°C por 10 minutos para ativar a enzima. O cDNA sintetizado foi diluído na proporção de 1:10 em água Milli-Q tratada

com DEPC para realizar PCR em tempo real (RT-PCR) ou também chamado de PCR quantitativo (qPCR).

4.8.3 Ensaio de qPCR

Para o ensaio de qPCR foram utilizados por reação 3 μ L de cDNA diluído na proporção de 1:10, 1 μ L de *primer Fw* (Foward) e 1 μ L de *primer Rv* (10mM) e 5 μ L de SYBR® *Green* (Sigma-Aldrich®), em volume final de 10 μ L.

Como controle positivo foi utilizado o gene da actina e como controle negativo foi utilizado somente o mix com *primers* com ausência de cDNA. As reações foram preparadas em placa ótica de 48 poços que foram vedadas com selante plástico para evitar a evaporação. As reações foram feitas e analisadas no equipamento *Step One™ Real-Time PCR System* (Thermo Fischer), tendo sido usada a ciclagem padrão do reagente SYBR® *Green* para 40 ciclos na seguinte configuração: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos seguida de desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento dos *primers* e extensão da fita a 60°C por 1 minuto. A curva de *melting* foi analisada ao final de cada corrida como controle da qualidade da amplificação gênica.

Os ensaios foram realizados em triplicata para cada gene a partir de uma única extração de RNA de leveduras e de hifas.

4.8.4 Análise dos dados da qPCR

Os dados que foram produzidos durante a qPCR foram analisados em planilha Excel (Microsoft®) tendo por base o valor de Ct (*Cycle Threshold*), que é o valor referente ao ciclo no qual a reação entra em fase exponencial e a fluorescência produzida durante a amplificação pode ser detectada, permitindo determinar a quantidade mínima de ciclos necessários para o início da amplificação da sequência do gene-alvo.

A análise de quantificação relativa foi feita utilizando o método comparativo do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($2^{\Delta} - \text{delta delta Ct}$). Por este método, inicialmente foi calculado o valor de ΔCt de cada morfologia de *T. asahii* CBS 2479 com a seguinte fórmula:

$$\Delta Ct = Ct (\text{gene alvo}) - Ct (\text{gene controle})$$

Onde:

Ct (gene alvo): valor de Ct de cada um dos quatro genes alvo (*Restina-like*, *CFL1-like*, *Beta-like* e *Mar-like*);

Ct (gene controle): valor de Ct do gene da β -actina.

Com base no valor de ΔCt de cada morfologia foi calculado o $\Delta\Delta Ct$, considerando a morfologia de levedura como a morfologia de referência, com a seguinte fórmula:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{amostra alvo}) - \Delta Ct (\text{amostra referência})$$

Onde:

Amostra alvo: valor de ΔCt encontrado para a morfologia a ser comparada;

Amostra referência: valor de ΔCt encontrado para a morfologia de levedura.

Encontrados os valores de $\Delta\Delta Ct$ foi possível realizar a comparação da expressão gênica em cada morfologia encontrando-se os valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Após realizar a comparação de expressão gênica entre cada morfologia foram montados gráficos e feita análise estatística no programa GraphPad Prism 7.0.

Para as análises estatísticas foi realizado Teste *t* não pareado e paramétrico. O teste *t* é utilizado para analisar duas amostras ou menos, não pareado pois os grupos de leveduras e hifas não estão correlacionados, visto que os genes são expressos de forma diferente em cada morfologia e paramétrico pois cada indivíduo dentro de um grupo, levedura ou hifa, apresenta uma mesma média de expressão em relação aos outros membros do mesmo grupo.

4.9 Ensaio de *Western blot*

4.9.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida

As amostras de proteínas extraídas de leveduras ou de hifas (item 4.3.3) foram separadas em eletroforese de gel de poliacrilamida. Foi utilizado gel de separação de poliacrilamida a 10% para a marcação das proteínas *Restina-like*, *CFL1-like* e *Mar-like* e a 15% para a marcação da proteína *Beta-like*. Foram utilizados 50 μ g de

proteínas totais de leveduras e 50 µg de proteínas totais de hifas. Para a eletroforese foi utilizado o aparato Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell (BIO-RAD®, EUA) com corrente de 80 V para a passagem das proteínas no gel de entrada e 120 V no gel de corrida. Após a separação e corrida no gel, as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF (GE Healthcare Amersham™ Hybond™) com poro de 0,45 µm de diâmetro, por meio do sistema Trans-Blot Turbo (BIO-RAD®, EUA).

Após a confirmação da transferência por meio da cloração das membranas com solução de *Ponceau* 0,3%, esta foi lavada em solução TBS-*Tween* (TBST) até que a solução *Ponceau* fosse eliminada.

4.9.2 Análise por Western blot

O bloqueio das membranas foi feito com solução de 5% de leite em pó desnatado por 4 horas. Após o período de bloqueio, as membranas foram lavadas cinco vezes, por cinco minutos em cada lavagem, e incubadas *overnight* com o antissoro gerado contra o peptídeo sintético (item 4.4.2) primário específico de cada proteína a ser analisada (*Restina-like*, *CFL1-like*, *Beta-like* e *Mar-like*) na concentração de 1:250.

Após esse período, as membranas foram lavadas cinco vezes, por cinco minutos em cada lavagem, com TBST e incubadas por duas horas com anticorpo secundário anti-*mouse* IgG-HRP (A9044 Sigma-Aldrich®, EUA) na concentração 1:5000. Após o período de incubação as membranas foram novamente lavadas cinco vezes de cinco minutos em TBST.

As membranas foram reveladas por uma reação de quimioluminescência (kit ECL Clarity™ BIO-RAD®, EUA) e analisadas pelo *software* ImageLab (BIO-RAD®, EUA) de acordo com a intensidade da densidade óptica de imunorreatividade no equipamento Bio-Rad ChemiDoc™.

4.10 Docking molecular das proteínas selecionadas

Para o ensaio *in silico* de *docking* molecular foi utilizado o provedor *on line* PatchDock, disponível em <<https://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock>>. O *docking* foi realizado utilizando as estruturas tridimensionais de *Restina-like*, *CFL1-like*, *Beta-like* e *Mar-like* modeladas pelo servidor I-Tasser (item 4.7.3) contra as estruturas

tridimensionais depositadas no banco de dados RCSB PDB de Albumina (1AO6), Colágeno IV (1LI1), Fibrinogênio (3GHG), Fibronectina (1E88), Hemoglobina (1A3N) e Laminina (5XAU) humanas, disponíveis em <<https://www.rcsb.org/>>, e os resultados visualizados no programa PyMol 1.3.

O servidor PatchDock utiliza um algoritmo baseado no reconhecimento e fragmentação da superfície de moléculas. Primeiro é realizado o cálculo de toda a área da superfície em ambas as moléculas seguido da aplicação de um algoritmo de fragmentação no qual a superfície molecular é dividida em áreas com topografia côncava, convexa ou plana. O segundo passo do algoritmo é simular os encaixes das topografias de uma molécula com a outra até encontrar complexos que se encaixem. Esses complexos são analisados e então descartados aqueles que não possuem penetração significativa entre os átomos do receptor com os átomos do ligante. Por último os complexos que não foram descartados são classificados de acordo com a complementariedade da forma geométrica entre as topografias analisadas (DUHOVNY, NUSSINOV e WOLFSON, 2002; SCHNEIDMAN-DUHOVNY et al, 2005).

A partir dos modelos de *docking* gerados, foi verificado se o sítio de ligação de cada proteína com o ligante humano corresponde ao motivo conservado de adesão que cada adesina hipotética possui com outros organismos.

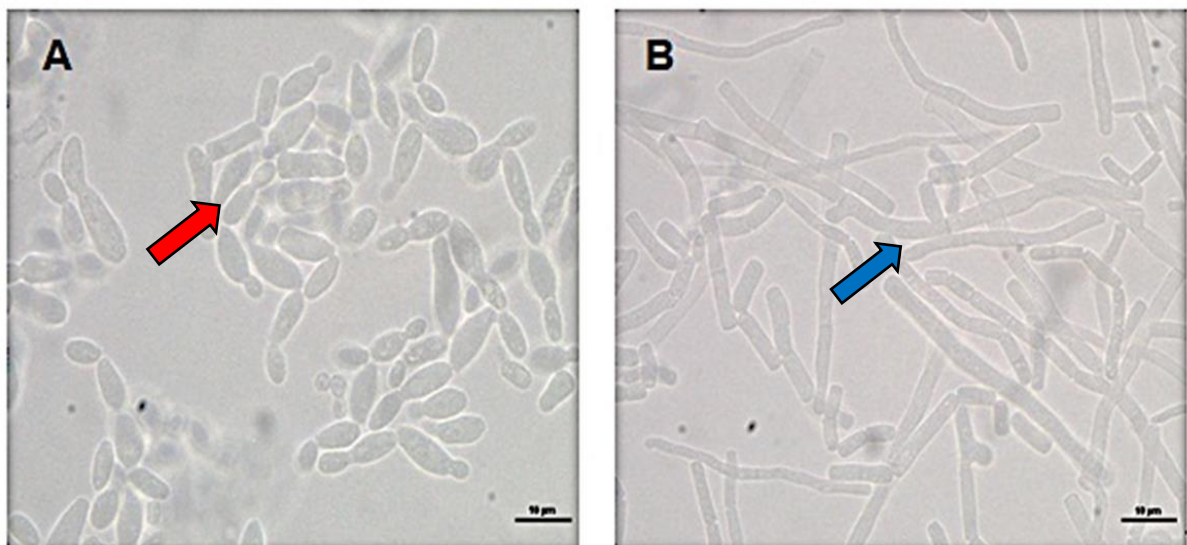
5 RESULTADOS

Os resultados encontrados durante este trabalho são apresentados nos itens subsequentes.

5.1 Crescimento de *T. asahii* CBS 2479 como levedura e hifa induzidas por diferentes meios de cultura

Para avaliar se seria possível obter por crescimento planctônico de *T. asahii* CBS 2479 morfologias distintas utilizando diferentes meios de cultura, o fungo foi crescido em caldo *Sabouraud* e RPMI 1640. Quando cultivado em caldo *Sabouraud*, *T. asahii* CBS 2479 se desenvolveu somente como leveduras (Figura 3A). Quando cultivado em meio RPMI 1640, *T. asahii* se desenvolve na forma de hifas verdadeiras (Figura 3B) apresentando também, artroconídios, com ausência de leveduras. O crescimento de hifas é mais acentuado quando cultivado a partir de colônias crescidas em SDA com tempo de crescimento maior do que 10 dias, abaixo disso há crescimento misto de leveduras e hifas, e quando o tempo de cultivo em SDA é maior do que 15 dias a presença de artroconídios é maior.

Figura 3 - Morfologias de *T. asahii* CBS 2479



Legenda: A) Seta vermelha: leveduras cultivadas em caldo *Sabouraud*.
 B) Seta azul: hifas de *T. asahii* cultivadas em meio RPMI 1640. Aumento de 1000x.
 Fonte: Do autor.

5.2 Extração de proteínas totais de leveduras e hifas de *T. asahii*.

Para análise inicial do perfil proteico de leveduras e hifas de *T. asahii* CBS 2479 foram realizadas extrações de proteínas totais de ambas as morfologias. As extrações de proteínas totais de leveduras e hifas a partir de crescimento planctônico (25 mL de cada, com 10^8 células/mL) seguiu o protocolo de Von der Haar (2007). Após as extrações, foi realizada a quantificação dos extratos proteicos seguindo-se o protocolo de Bradford (1976).

A partir da curva padrão de BSA foram encontradas as absorvâncias de 1,818 e 1,898 para os extratos de leveduras e hifas, respectivamente, com as quantidades calculadas na fórmula de $1.007 \mu\text{g/mL}$ de proteínas no extrato de leveduras e $1.054,4 \mu\text{g/mL}$ de proteínas no extrato de hifa, com volume final de $900 \mu\text{L}$ para o extrato de leveduras e $750 \mu\text{L}$ para o de hifas.

5.3 Avaliação do reconhecimento das proteínas pelos anticorpos de leveduras e hifas gerados em camundongos 129/Sv

5.3.1 Rendimento das coletas dos soros pré-ímmunes e antissoros

A partir de 6 camundongos machos, com idade entre 8 a 10 semanas, mantidos juntos, foram realizadas as coletas de soros pré-ímmunes, com um volume de $400 \mu\text{L}$ finais em *pool*, estocados a -20°C em alíquotas de $20 \mu\text{L}$ até o momento do uso.

Após as imunizações com os extratos de leveduras e hifas em 3 camundongos cada, os antissoros ímmunes obtidos resultaram em um volume de $2.700 \mu\text{L}$ finais em *pool* estocados a -20°C em alíquotas de $20 \mu\text{L}$ até o momento do uso.

5.3.2 Análise dos anticorpos contra extrato de leveduras e hifas por ELISA

Para análise da imunogenicidade dos extratos proteicos totais de leveduras e hifas, foram testados os anticorpos (IgG) de camundongos gerados contra esses extratos em ensaios de ELISA (Figura 4). No ensaio utilizando diferentes diluições do antissoro dos camundongos que foram imunizados com proteínas totais de hifas e poços da placa de ELISA sensibilizados com proteínas de hifas, observou-se que

houve produção de anticorpos contra as proteínas totais de hifas em maiores concentrações, se comparado com os gerados contra leveduras, desde o antissoro não-diluído até a diluição de 1:1.000 (Figura 4A). Nas duas diluições seguintes, de 1:10.000 e 1:100.000 houve queda das ODs de anticorpos produzidos contra as proteínas de hifas, mas ainda com reatividade.

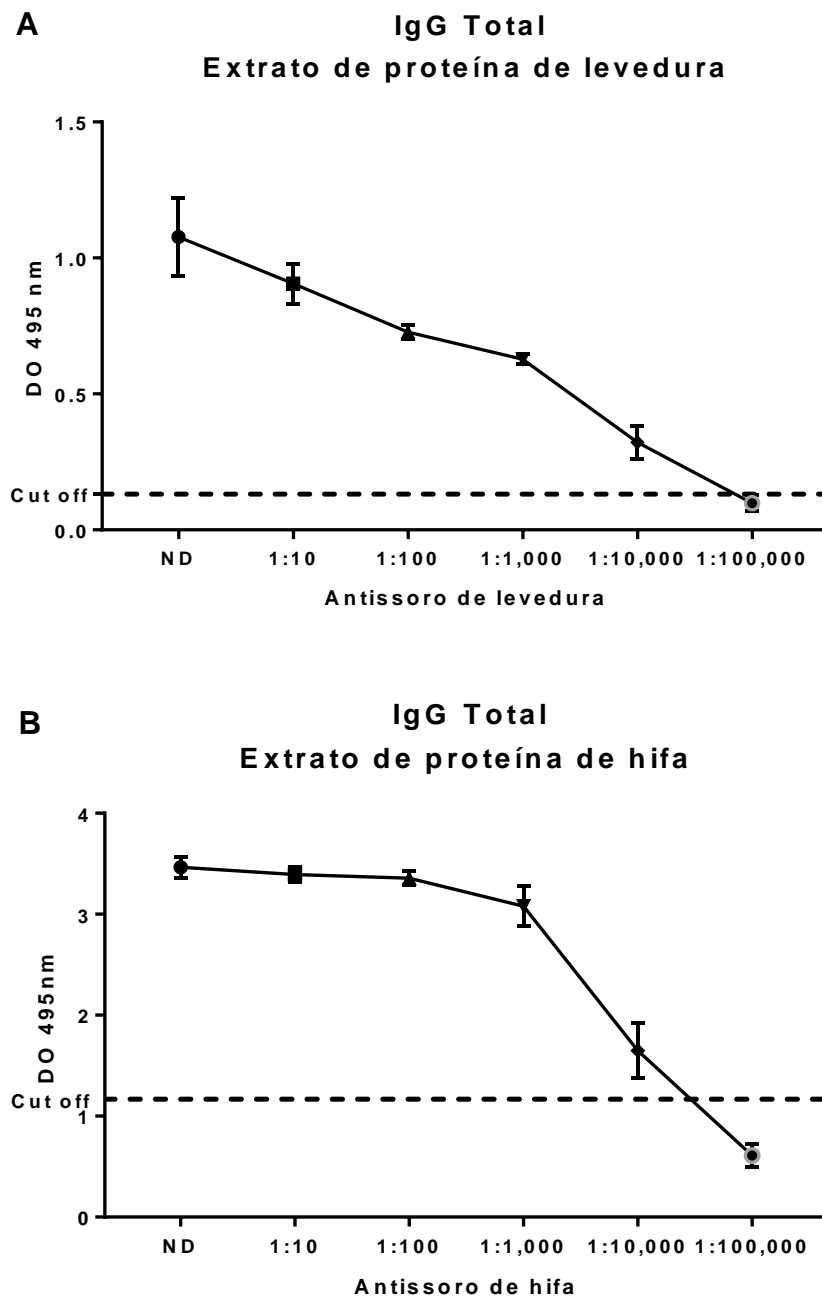
Em seguida, no ensaio utilizando diferentes diluições do antissoro dos camundongos que foram imunizados com proteínas totais de leveduras e poços da placa de ELISA sensibilizados com proteínas de leveduras, observou-se que houve produção de anticorpos contra proteínas totais de leveduras, porém em quantidades inferiores àquelas produzidas contra as proteínas totais de hifas de forma decrescente desde o não-diluído até a diluição de 1:100.000 (Figura 4B).

Pela maior OD no teste de titulação sorológica contra proteínas de hifas do quando comparado com a OD do teste de titulação sorológica contra proteínas de levedura inferiu-se que houve maior produção de anticorpos policlonais contra as proteínas totais de hifas do que contra as proteínas totais de leveduras.

Pela análise com o soro obtido previamente às inoculações com proteínas totais foi determinado um *cut-off* de positividade de 1,167 para proteínas totais de hifas (Figura 3A) e 0,131 para proteínas totais de levedura (Figura 3B), ambos com nível de confiança de 99,9%. As diluições de 1:100.000 ficaram abaixo dos valores de *cut-off* de positividade tanto para os anticorpos produzidos contra as proteínas totais de hifas quanto para os anticorpos produzidos contra as proteínas de leveduras.

A partir dos valores de *cut-off* do ensaio de titulação foi determinado para os anticorpos gerados contra proteínas de hifas o título de 1:46.259 e para os anticorpos gerados contra leveduras o título de 1:85.113.

Figura 4 - Titulação dos anticorpos IgG totais produzidos contra proteínas totais de hifas e contra proteínas totais de leveduras.



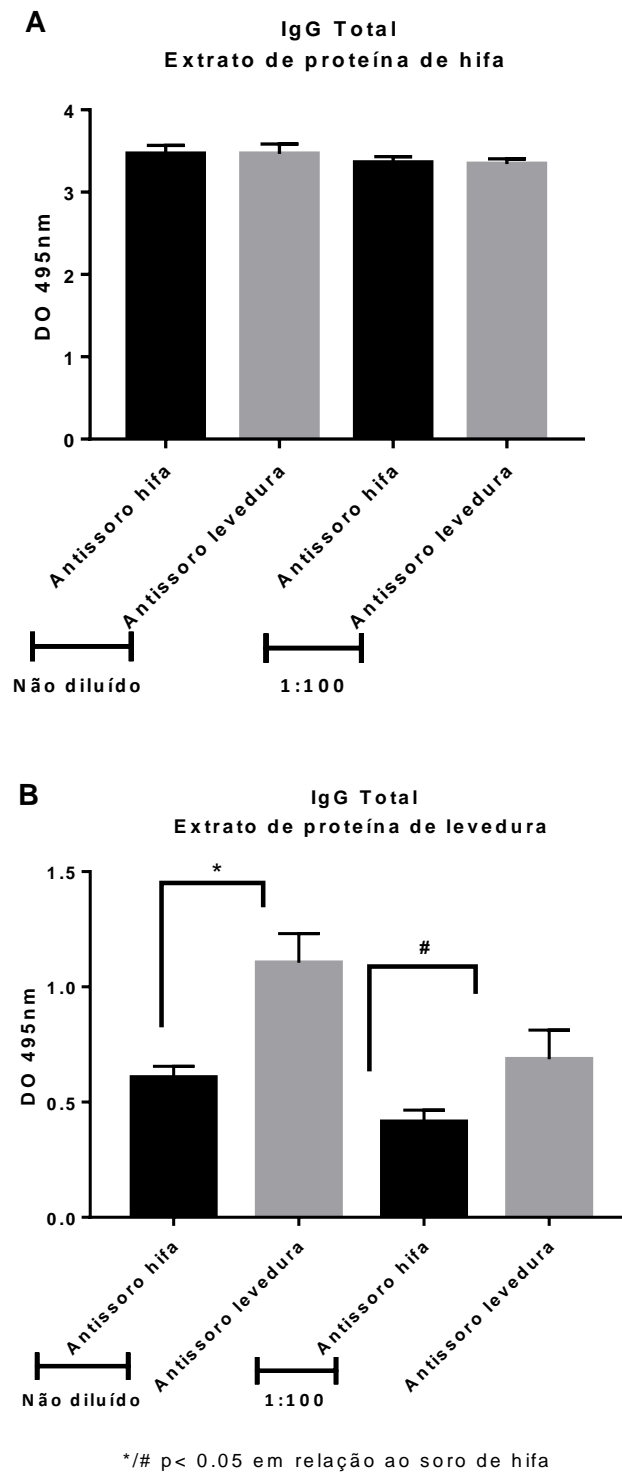
Legenda: Linhas pontilhadas representam os valores referentes ao *cut-off* de 1,167 (A) para hifas e de 0,131 para leveduras (B).

Fonte: Do autor.

No ensaio utilizando antissoro dos camundongos que foram imunizados com proteínas totais de hifas e de leveduras e poços da placa de ELISA sensibilizados com proteínas totais de hifa, observou-se que ambos os anticorpos reconhecem altamente as proteínas totais de hifas, tanto o não-diluído quanto na diluição de 1:100 (Figura 4A).

Já no ensaio em que foram utilizados os antissoros gerados contra proteínas totais de hifas e contra proteínas totais de leveduras e poços da placa de ELISA sensibilizados com proteínas totais de leveduras, observou-se que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre a produção de anticorpos contra proteínas totais de hifas e contra proteínas totais de leveduras que reconheceram as proteínas totais de leveduras, tanto na diluição de 1:100 quanto o não-diluído, visto as diferenças nas absorvâncias (OD) atingidas por cada antissoro (Figura 5 A e B).

Figura 5 - Resultado do reconhecimento das proteínas totais.



Legendas: A) Reconhecimento das proteínas totais de hifas pelos anticorpos IgG totais produzidos contra hifas e leveduras.

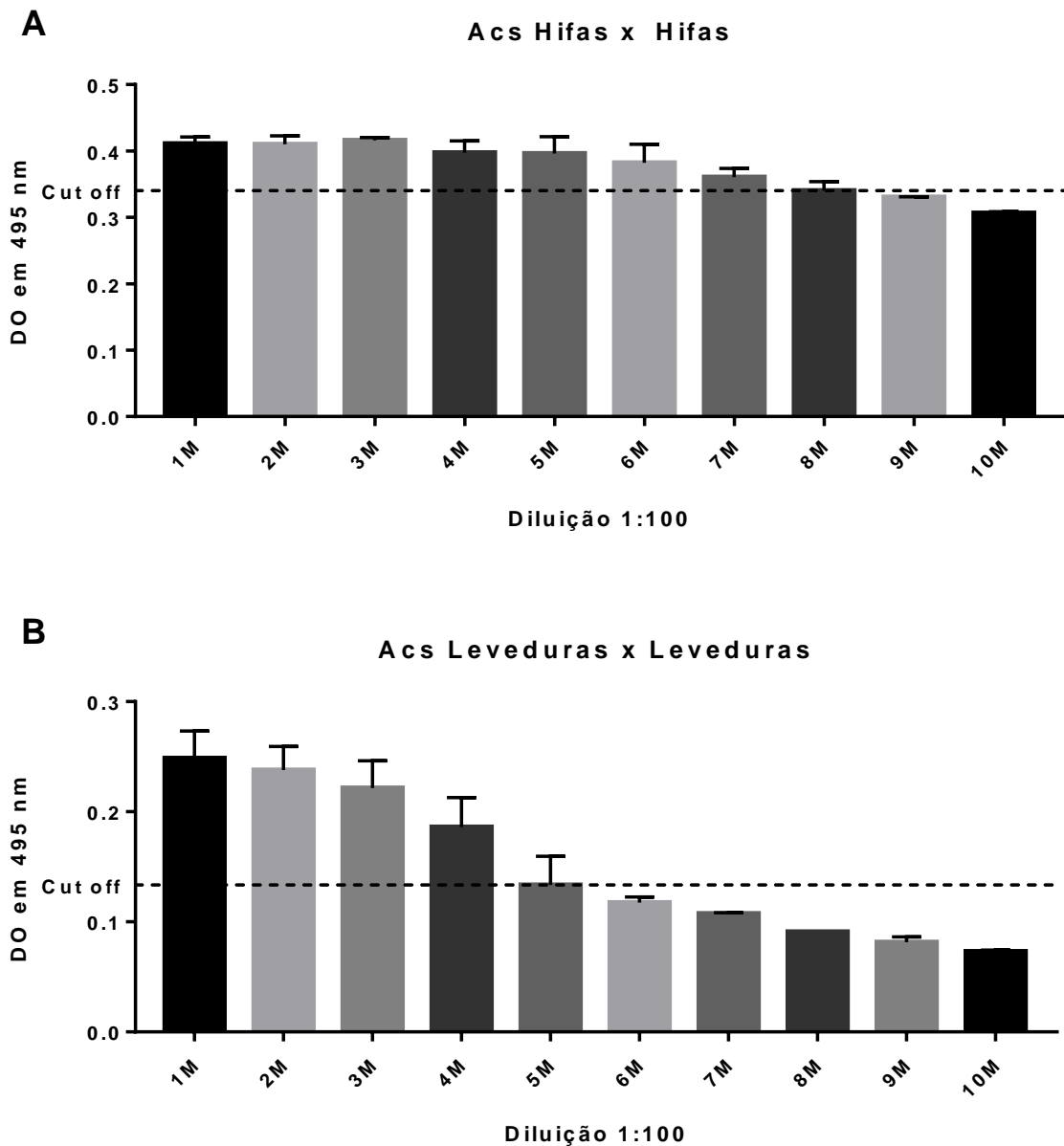
B) Reconhecimento das proteínas totais de leveduras pelos anticorpos IgG totais produzidos contra leveduras e hifas (B).

Fonte: Do autor.

No ensaio de afinidade dos anticorpos foi determinado como valor de *cut-off* para positividade a menor concentração de ureia em que houvesse diferença estatisticamente significativa entre a média das DOs da menor concentração de ureia testada (1M) e as demais concentrações, com $p < 0,05$ no teste de Tukey.

Para a afinidade dos anticorpos gerados contra as proteínas totais de hifas com extrato das proteínas de hifas foi determinado o *cut-off* positivo de 8M de ureia (Figura 6A), e para a afinidade dos anticorpos gerados contra proteínas totais de leveduras com extrato das proteínas totais de leveduras foi determinado o *cut-off* positivo de 5M de ureia (Figura 6B).

Figura 6 - Afinidade de ligação entre os antissoros gerados contra extratos totais de leveduras e de hifas utilizando ureia como agente caotrópico.



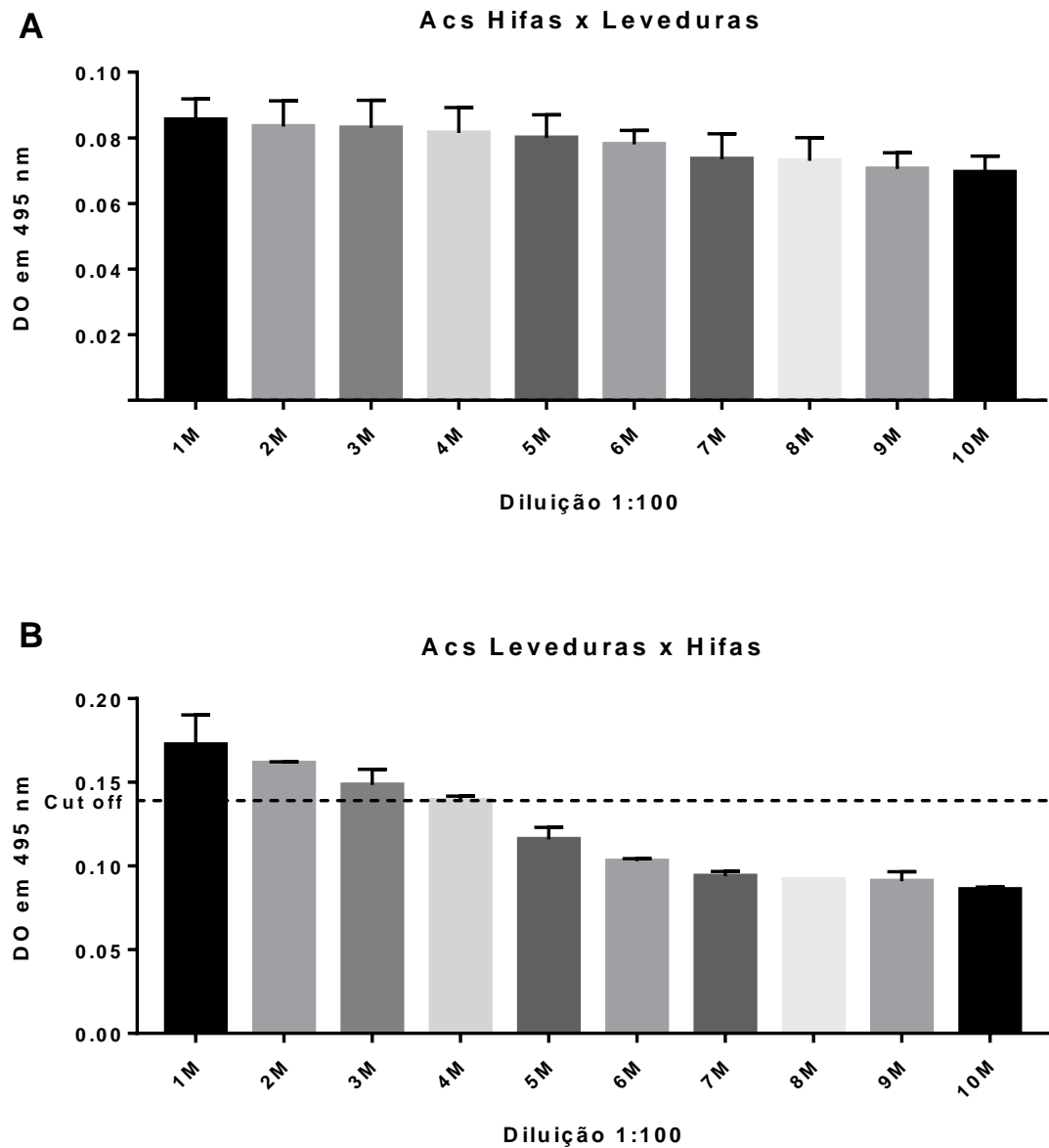
Legendas: A) Afinidade dos anticorpos IgG totais dos antissoros produzidos contra extratos de proteínas totais de hifas testados sobre extrato das proteínas totais de hifas.
 B) Afinidade dos anticorpos IgG totais dos antissoros produzidos contra proteínas totais de leveduras sobre extrato das proteínas totais de levedura utilizando diferentes concentrações de ureia.

Linha pontilhada representa o valor de *cut-off*.

Fonte: Do autor.

Quando a análise foi feita para a afinidade dos anticorpos gerados contra proteínas totais de hifas sobre as proteínas totais de leveduras não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre as médias das diluições, de forma que a maior concentração de ureia (10M) não foi suficiente para desfazer a ligação entre os anticorpos e as proteínas (Figura 7A). Para a afinidade dos anticorpos gerados contra as proteínas totais de leveduras contra as proteínas totais de hifas foi encontrado o *cut-off* de 4M (Figura 7B).

Figura 7- Afinidade de ligação entre os antissoros gerados contra extratos totais de leveduras e de hifas utilizando ureia como agente caotrópico.



Legendas: A) Afinidade dos anticorpos IgG totais dos antissoros produzidos contra extratos de proteínas totais de hifas testados sobre extrato das proteínas totais de leveduras. Não houve *cut off*.

B) Afinidade dos anticorpos IgG totais dos antissoros produzidos contra proteínas totais de leveduras sobre extrato das proteínas totais de hifas, utilizando diferentes concentrações de ureia.

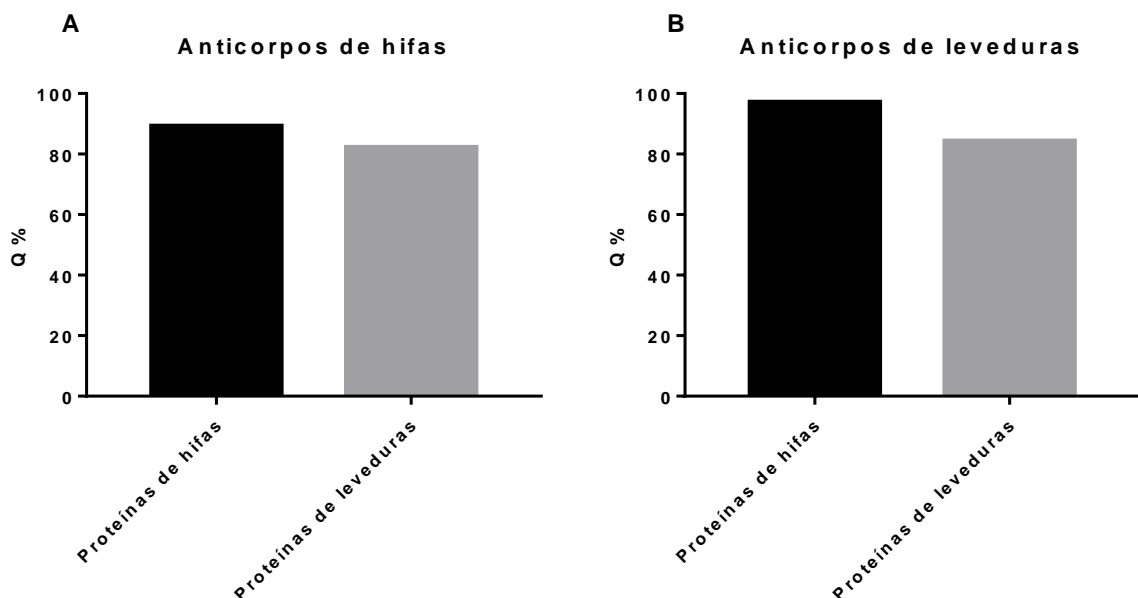
Linha pontilhada representa os valores de *cut-off*.

Fonte: Do autor.

Em conjunto, os ensaios mostraram que a maior concentração de ureia em que os anticorpos gerados contra proteínas totais, sejam de hifas ou de leveduras, com significância estatística está acima de 10M.

Ao analisar a taxa de queda (Q%) da ligação dos anticorpos, na concentração de ureia de 7M, com os anticorpos na diluição 1:100, verificou-se que os anticorpos gerados contra proteínas de hifas têm uma queda de 89,26% para a ligação com proteínas totais de hifas e uma queda de 82,27% para a ligação com as proteínas totais de leveduras (Figura 8A). Para os anticorpos gerados contra proteínas totais de leveduras verificou-se uma queda de 84,34% para a ligação com as proteínas totais de leveduras e de 97,18% para as proteínas totais de hifas (Figura 8B). As taxas analisadas não apresentaram diferença estatisticamente significativas no teste U de Mann-Whitney.

Figura 8 - Taxa de queda (Q%) na ligação entre anticorpos produzidos contra extrato proteico da mesma morfologia e da morfologia contrária para o qual foram gerados.



Legendas: A) Taxa de queda (Q%) na ligação entre os anticorpos produzidos contra proteínas totais de hifas e as proteínas totais de hifas e de leveduras utilizando ureia (7M) como agente caotrópico.

B) Taxa de queda (Q%) na ligação entre os anticorpos produzidos contra proteínas totais de leveduras e as proteínas totais de hifas e de leveduras utilizando ureia (7M) como agente caotrópico.

Fonte: Do autor.

5.3.3 Imunofluorescências das leveduras e hifas de *T. asahii*.

Para confirmar se os anticorpos reconheceriam as células de leveduras e hifas diferencialmente como no ELISA, foram realizados experimentos de

imunofluorescência, com leveduras e hifas permeabilizadas para permitir a entrada de anticorpos e não-permeabilizadas. Nas imagens (Figuras 9 a 16) observa-se em azul as marcações de núcleo de leveduras e hifas e em verde, as marcações referentes aos anticorpos, sejam eles gerados contra extratos de proteínas totais de leveduras ou contra extratos de proteínas totais de hifas.

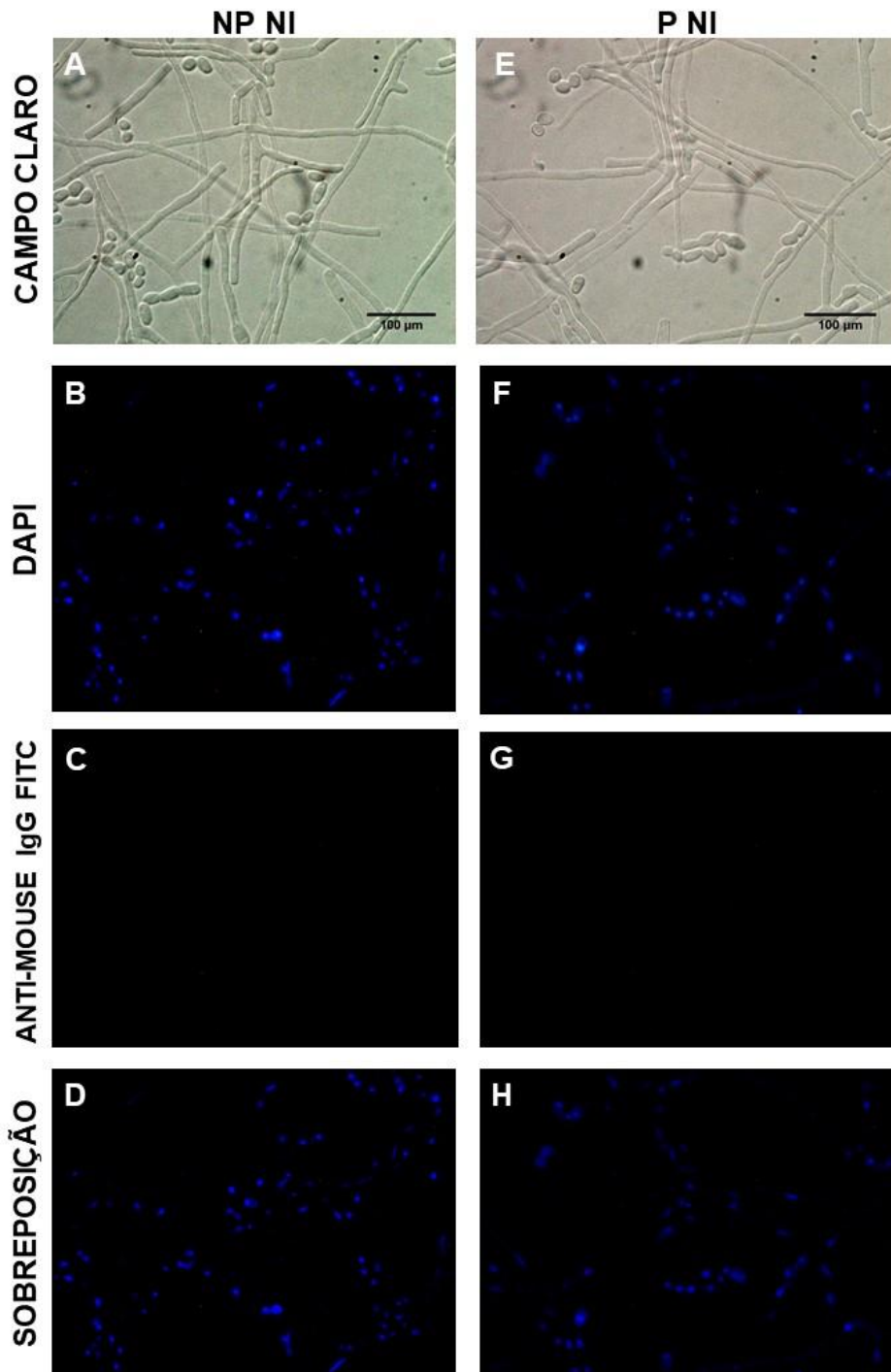
No ensaio dos anticorpos gerados contra extrato de proteínas totais de hifas sobre as hifas observou-se que não houve reconhecimento das células que foram tratadas pelo soro pré-imune (Figura 9), e que houve reconhecimento das hifas que foram tratadas com os anticorpos gerados contra as proteínas totais de hifas (Figura 10), de forma semelhante entre células permeabilizadas e não permeabilizadas.

O mesmo foi observado com anticorpos gerados contra extrato de proteínas totais de leveduras sobre células leveduriformes. Verificou-se que não houve reconhecimento das leveduras que foram tratadas com o soro pré-imune (Figura 11) e que houve reconhecimento das leveduras que foram tratadas com os anticorpos gerados contra as proteínas totais de leveduras (Figura 12), tanto permeabilizadas quanto as células não permeabilizadas., confirmando a as observações da titulação do ensaio de ELISA.

Ao testar-se os anticorpos sobre as morfologias contrárias aos quais foram gerados observou-se que tanto as hifas tratadas com anticorpos gerados contra proteínas totais de leveduras (Figuras 13 e 14) e leveduras tratadas com anticorpos gerados contra proteínas totais de hifas (Figuras 15 e 16), foram reconhecidas pelos anticorpos opostos de forma semelhante, não sendo possível discriminar as diferenças observadas no ELISA quanto a diminuição do reconhecimento dos anticorpos gerados contra extratos proteicos de hifas sobre leveduras.

Como controle para este ensaio, foram realizadas imagens de microscopia de fluorescência para verificar se os antissoros gerados contra proteínas totais de leveduras e hifas de *T. asahii* reconheceriam as proteínas de superfície de leveduras e hifas de *C. albicans* SC5314 não permeabilizadas para a entrada de anticorpos. Conforme pode ser visto nos Anexos C e D, não houve reconhecimento das leveduras e hifas de *C. albicans* SC 5314 por parte dos antissoros gerados contra leveduras e hifas de *T. asahii*, de forma que os antissoros podem ser exclusivos para reconhecer *T. asahii*.

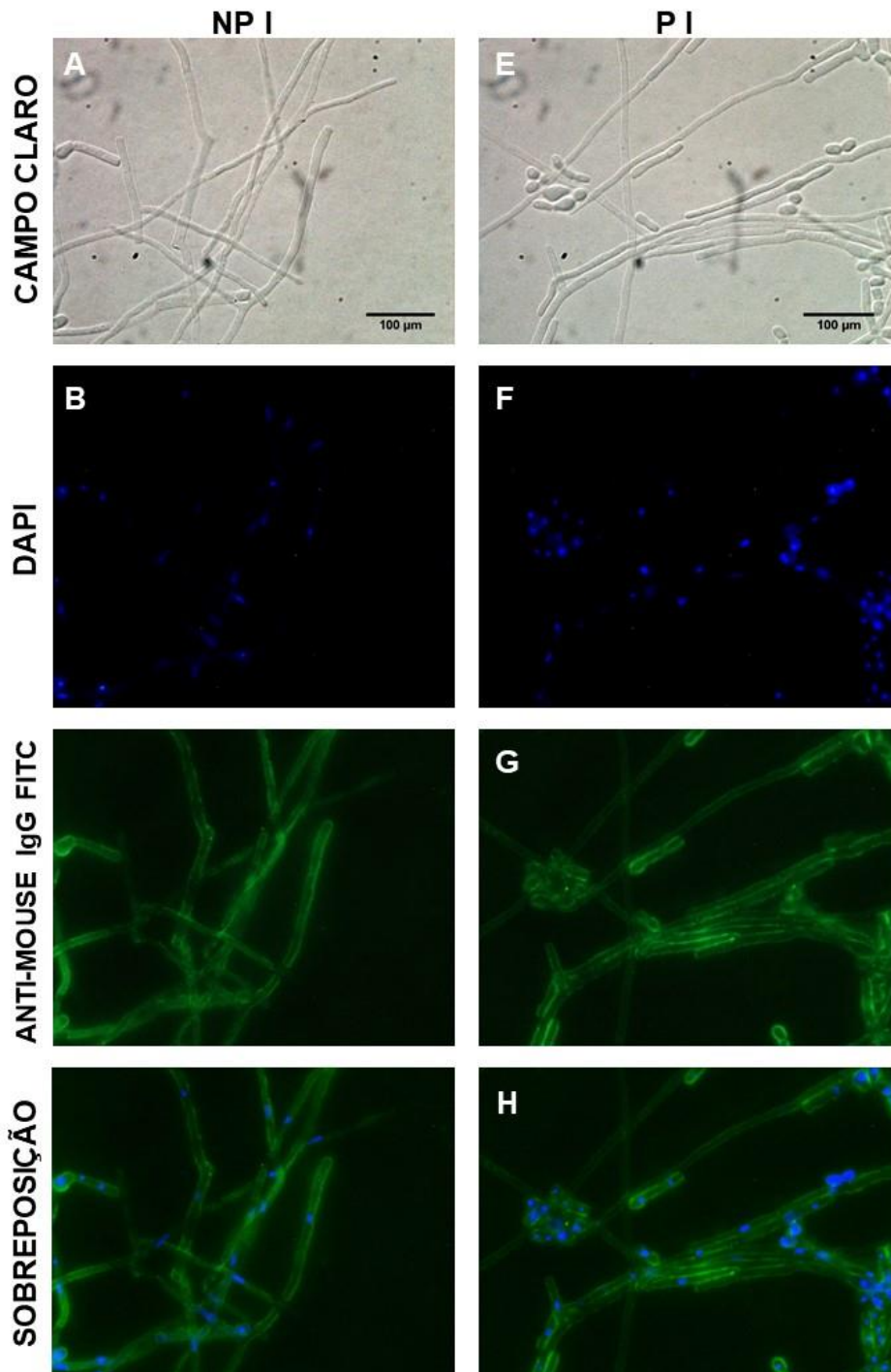
Figura 9 - Imagens de microscopia de fluorescência de hifas tratadas com soro pré-imune.



Legendas A-D: Hifas não permeabilizadas para entrada de anticorpos.
 E-H: Hifas permeabilizadas para entrada de anticorpos. Aumento em 600x.
 Os núcleos celulares estão marcados em azul com DAPI.
 NP NI: Não permeabilizadas não-ímmunes.
 P NI: Permeabilizadas não-ímmunes.

Fonte: Do autor.

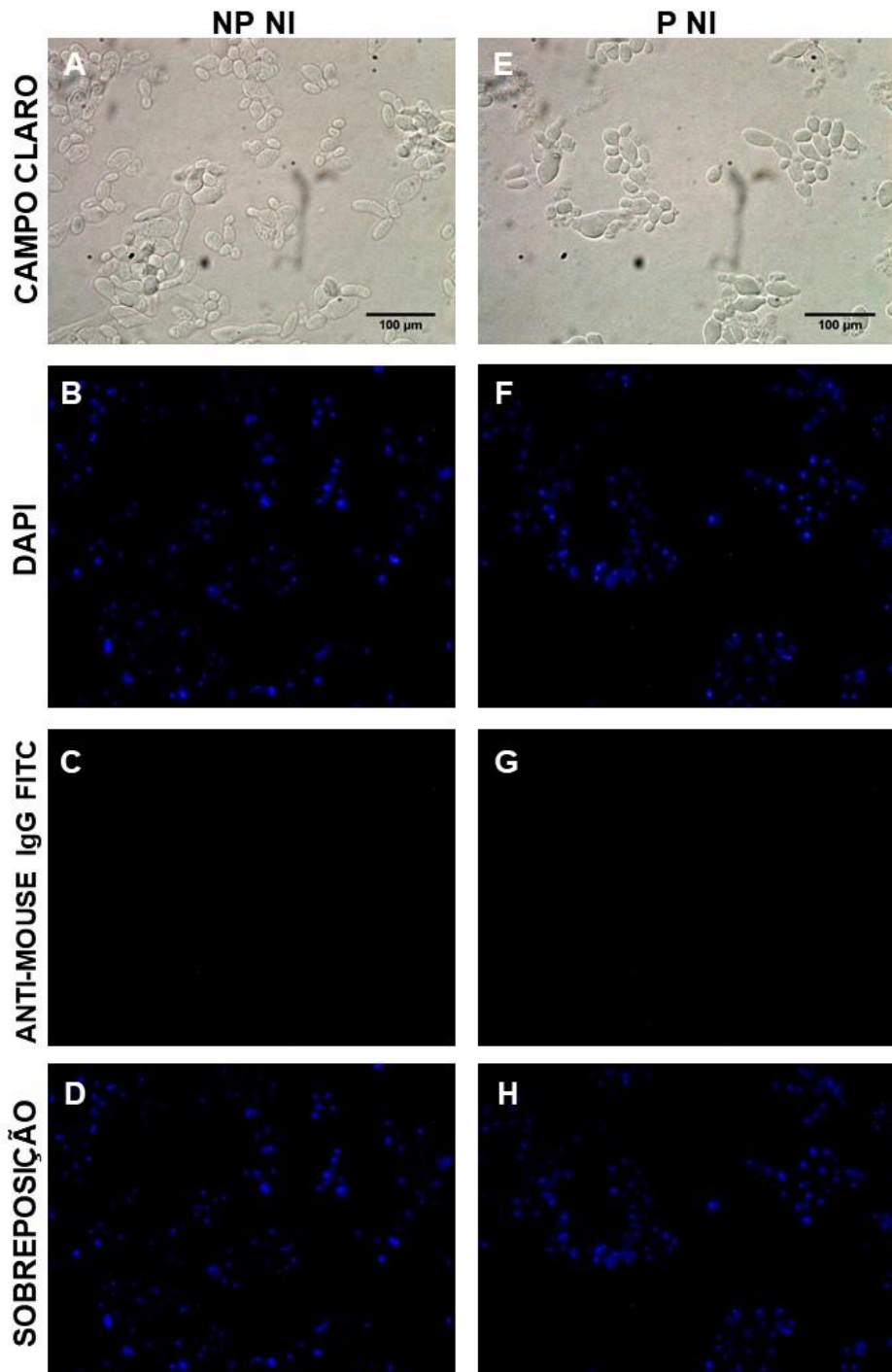
Figura 10 - Imagens de microscopia de fluorescência de hifas tratadas com antissoro gerado contra proteínas totais de hifas.



Legendas A-D: Hifas não permeabilizadas para entrada de anticorpos.
 E-H: Hifas permeabilizadas para entrada de anticorpos.
 Aumento em 600x.
 NP I: Não permeabilizadas imunes.
 PI: Permeabilizadas imunes.
 Os núcleos celulares estão marcados em azul com DAPI. Os anticorpos estão marcados em verde com FITC.

Fonte: Do autor.

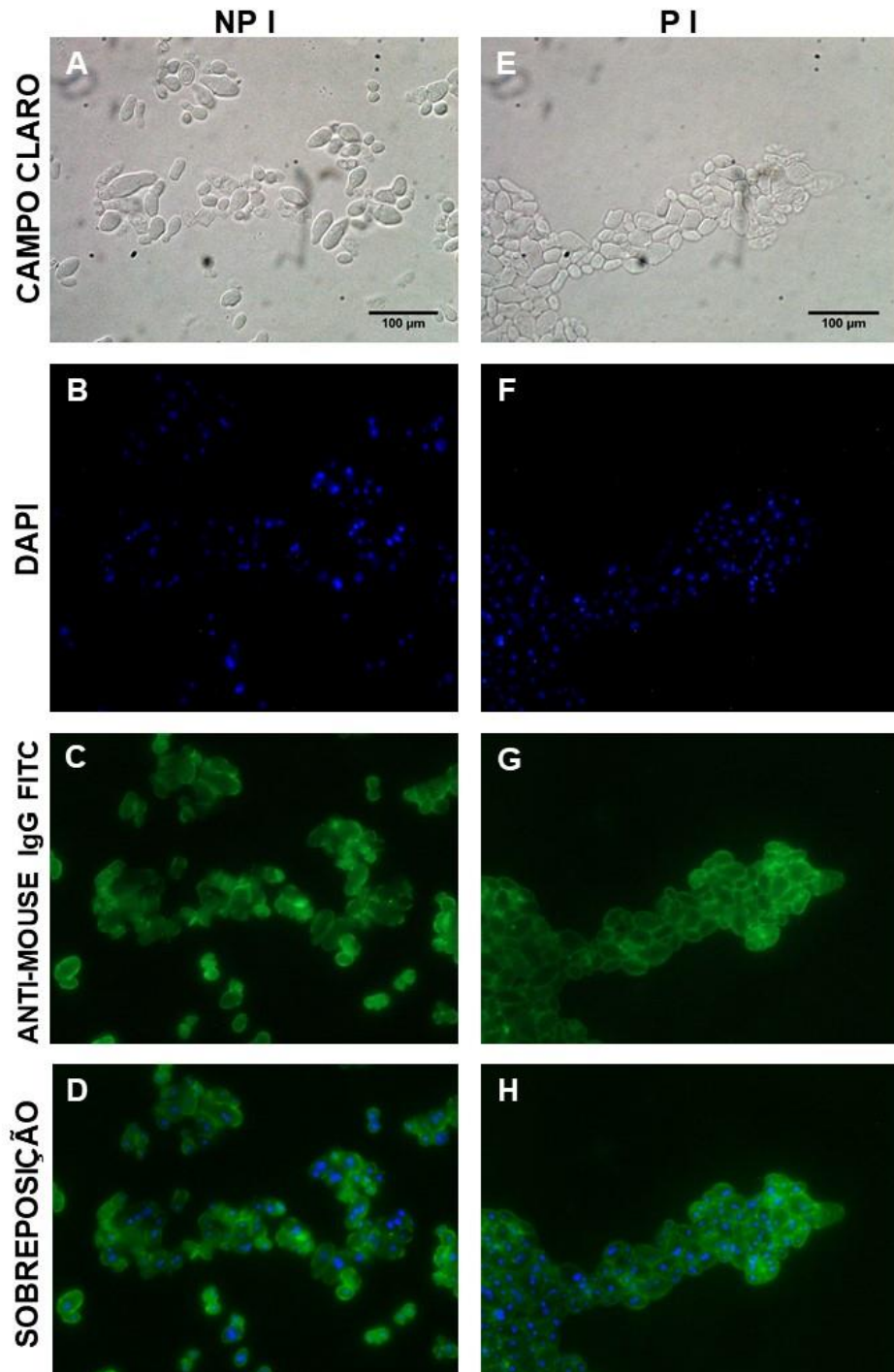
Figura 11 - Imagens de microscopia de fluorescência de leveduras tratadas com soro pré-imune.



Legendas: A-D: Leveduras não permeabilizadas para entrada de anticorpos.
 E-H: Leveduras permeabilizadas para entrada de anticorpos.
 Aumento em 600x.
 Os núcleos celulares estão marcados em azul com DAPI.
 NP NI: Não permeabilizadas não-ímmunes.
 P NI: Permeabilizadas não-ímmunes.

Fonte: Do autor.

Figura 12 - Imagens de microscopia de fluorescência de leveduras tratadas com antissoro gerado contra proteínas totais de leveduras.



Legenda: A-D: Leveduras não permeabilizadas para entrada de anticorpos.

E-H: Leveduras permeabilizadas para entrada de anticorpos.

Aumento em 600x.

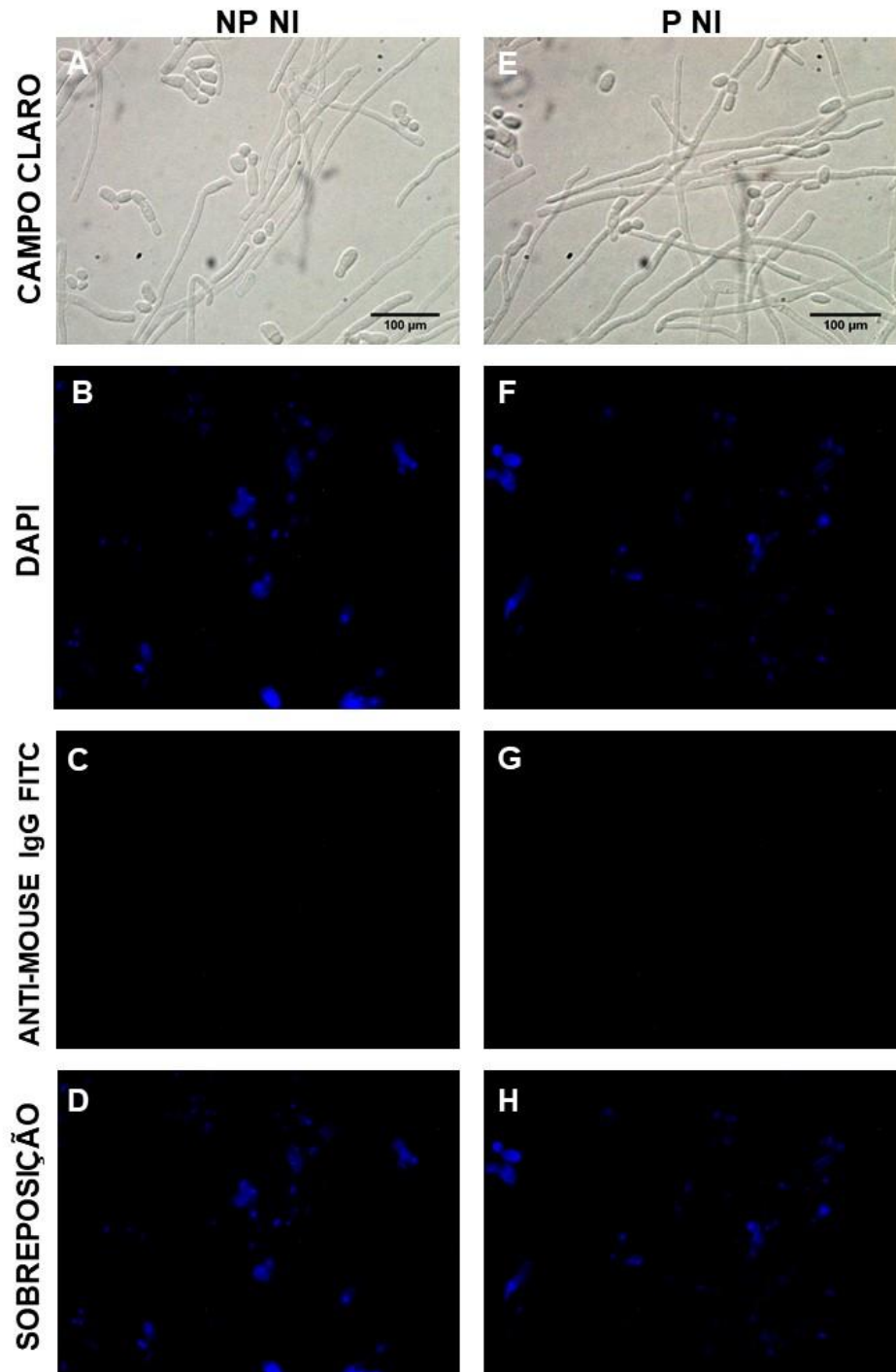
NP I: Não permeabilizadas imunes.

PI: Permeabilizadas imunes.

Os núcleos celulares estão marcados em azul com DAPI. Os anticorpos estão marcados em verde com FITC.

Fonte: Do autor.

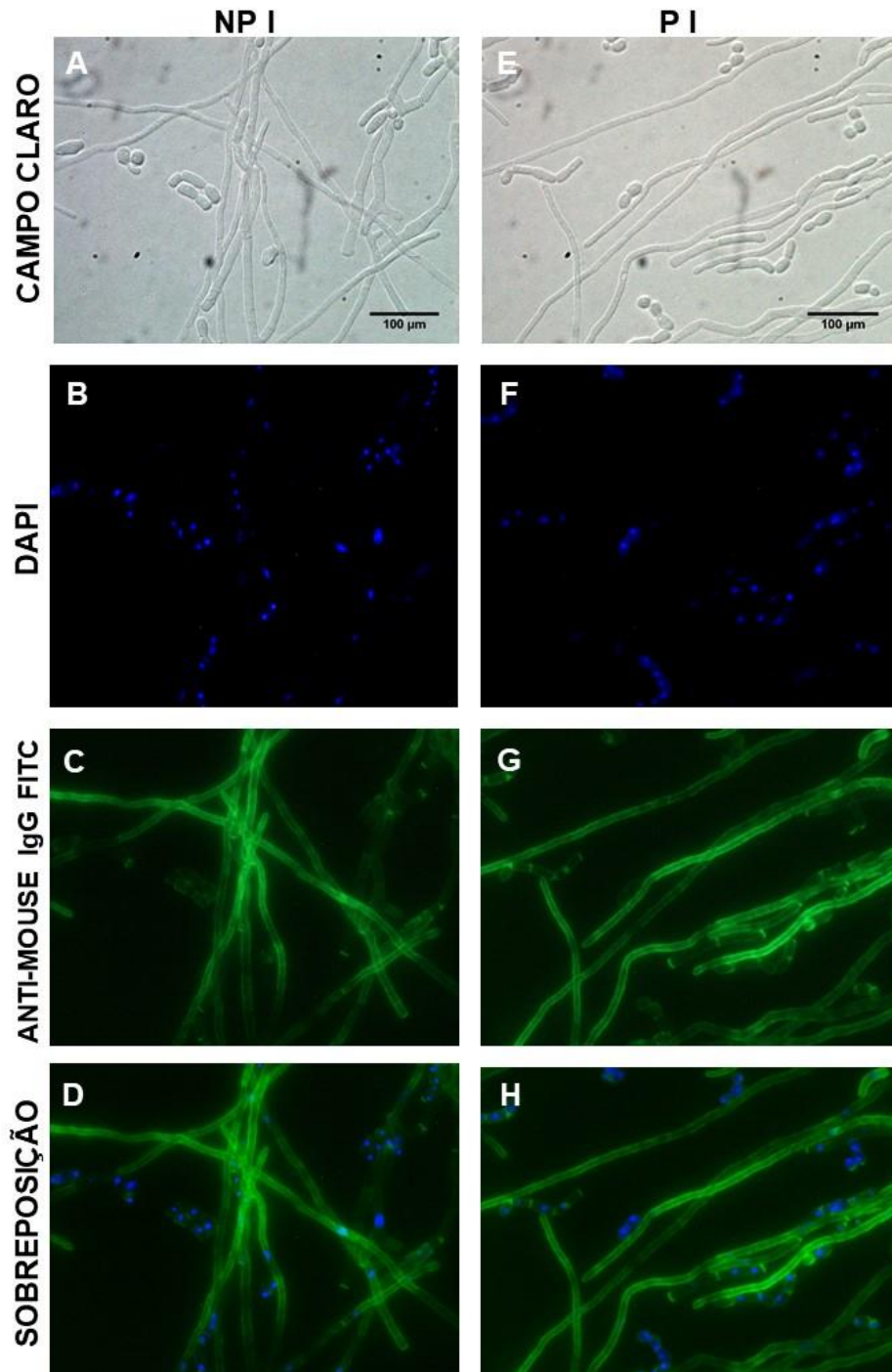
Figura 13 - Imagens de microscopia de fluorescência de hifas tratadas com antissoro pré-imune.



Legenda: A-D: hifas não permeabilizadas para entrada de anticorpos.
 E-H: Hifas permeabilizadas para entrada de anticorpos. Aumento em 600x.
 Os núcleos celulares estão marcados em azul com DAPI.
 NP NI: Não permeabilizadas não-ímmunes.
 P NI: Permeabilizadas não-ímmunes.

Fonte: Do autor.

Figura 14 - Imagens de microscopia de fluorescência de hifas tratadas com antissoro gerado contra proteínas totais de leveduras.



Legenda: A-D: Hifas não permeabilizadas para entrada de anticorpos.

E-H: Hifas permeabilizadas para entrada de anticorpos.

Aumento em 600x.

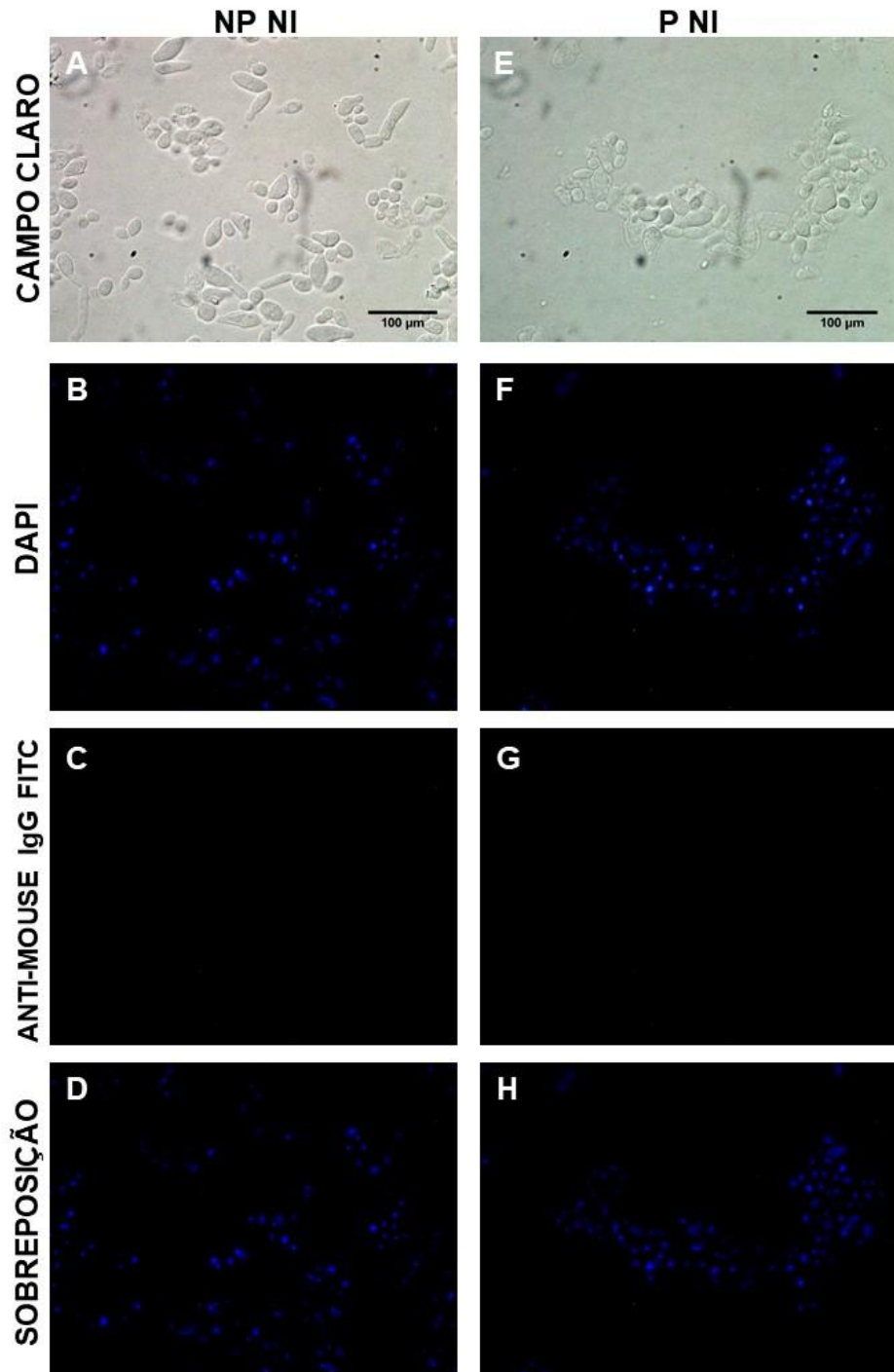
NP I: Não permeabilizadas imunes.

PI: Permeabilizadas imunes.

Os núcleos celulares estão marcados em azul com DAPI. Os anticorpos estão marcados em verde com FITC.

Fonte: Do autor.

Figura 15 - Imagens de microscopia de fluorescência de leveduras tratadas com soro pré-imune.



Legenda: A-D: Leveduras não permeabilizadas para entrada de anticorpos.
E-H: Leveduras permeabilizadas para entrada de anticorpos.
Aumento em 600x.

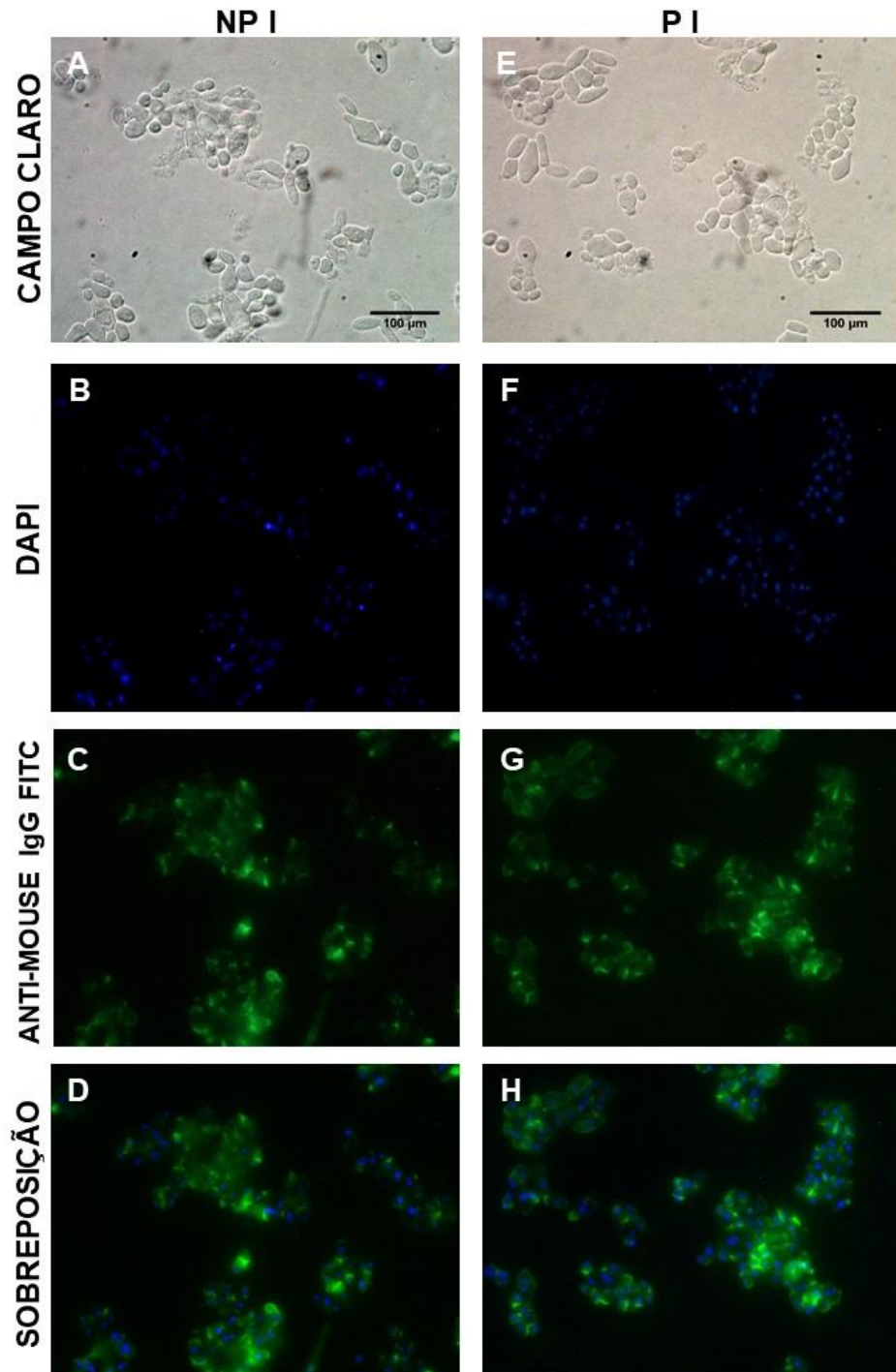
Os núcleos celulares estão marcados em azul com DAPI.

NP NI: Não permeabilizadas não-ímmunes.

P NI: Permeabilizadas não-ímmunes.

Fonte: Do autor.

Figura 16 - Imagens de microscopia de fluorescência de leveduras tratadas com antissoro gerado contra proteínas totais de hifas.



Legenda: A-D: Leveduras não permeabilizadas para entrada de anticorpos.

E-H: Leveduras permeabilizadas para entrada de anticorpos.

Aumento em 600x.

NP I: Não permeabilizadas imunes.

PI: Permeabilizadas imunes.

Os núcleos celulares estão marcados em azul com DAPI. Os anticorpos estão marcados em verde com FITC.

Fonte: Do autor.

5.4 Análises *in silico* de proteínas preditas como adesinas de superfície celular de *T. asahii*

5.4.1 Modelagem tridimensional das proteínas

Nas análises pelo servidor *on-line* I-Tasser para simulação de modelos tridimensionais das proteínas preditas como adesinas foram obtidos cinco modelos de estrutura terciária prováveis para cada proteína, sendo escolhido o modelo com o maior *Confidence score* (*C-score*) entre eles. Dessa maneira, modelos com maior *C-score* representam modelos com maior confiança de terem a estrutura representada. Os valores de *C-score* para cada proteína são mostrados na tabela 2, destacando-se em negrito os modelos selecionados.

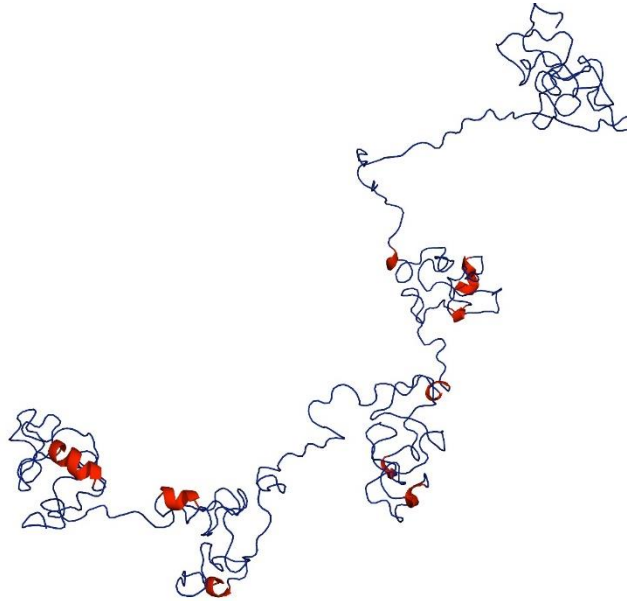
Tabela 2- Valores de *C-score* para cada modelo de proteína.

Proteína	Modelo 1	Modelo 2	Modelo 3	Modelo 4	Modelo 5
Restina- <i>like</i>	-0,85	-2,37	-2,52	-3,68	-3,84
CFL1- <i>like</i>	-3,11	-3,48	-3,71	-4,19	-4,85
Beta- <i>like</i>	0,06	-0,72	-2,22	-4,15	-4,18
Mar- <i>like</i>	-1,16	-1,77	-4,08	-3,27	-3,41

Fonte: do autor.

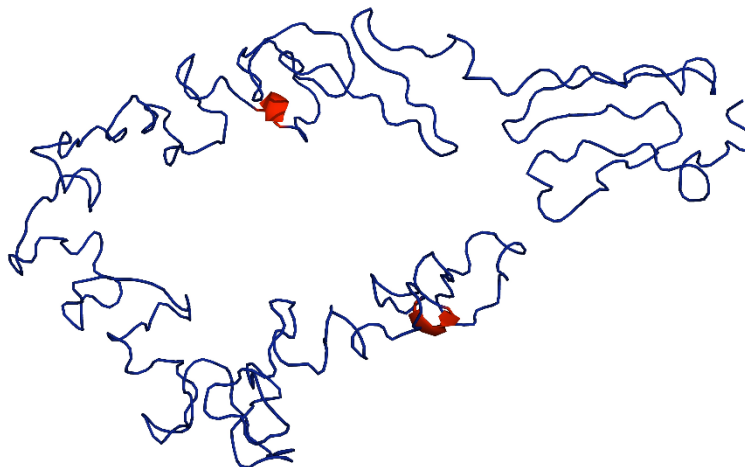
Para a visualização dos arquivos no formato pdb modelos tridimensionais das modelagens geradas pelos servidor I-Tasser das proteínas Restina-*like*, Cfl1-*like*, Beta-*like* e Mar-*like* foi utilizado o programa PyMol 1.3 (Figura 17 a 20), onde pode-se observar que suas estruturas demonstraram integração entre os aminoácidos com presença de α -hélices, que são estruturas mais simples nas quais os aminoácidos ao interagirem maximizam as ligações de hidrogênio entre si estabilizando a proteína, folhas β -pregueadas, onde as interações entre os aminoácidos formam estruturas de zigue-zague que dão resistência à proteína, e *coils* que são conjuntos estruturais com afinidades extremamente baixas entre os aminoácidos dando características de flexibilidade para a proteína.

Figura 17 - Modelo tridimensional da estrutura terciária da proteína Restina-*like*.



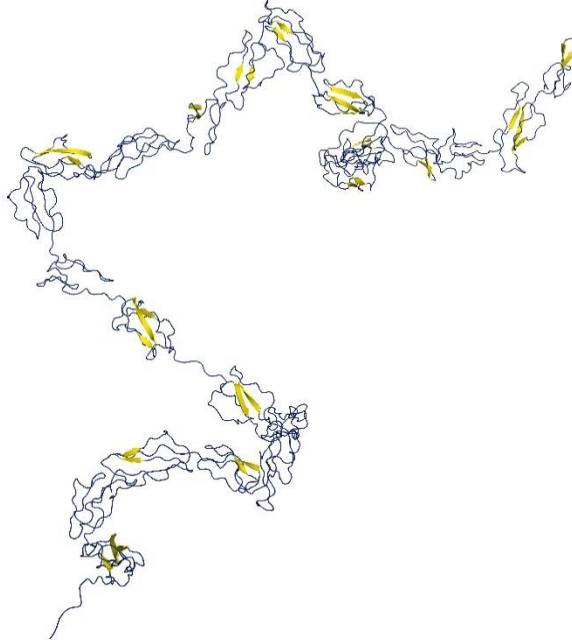
Legenda: Em vermelho as interações do tipo α -hélices e em azul as interações do tipo *coils*.
Fonte: Do autor.

Figura 18 - Modelo tridimensional da estrutura terciária da proteína CFL1-*like*.



Legenda: Em vermelho as interações do tipo α -hélices e em azul as interações do tipo *coils*.
Fonte: Do autor.

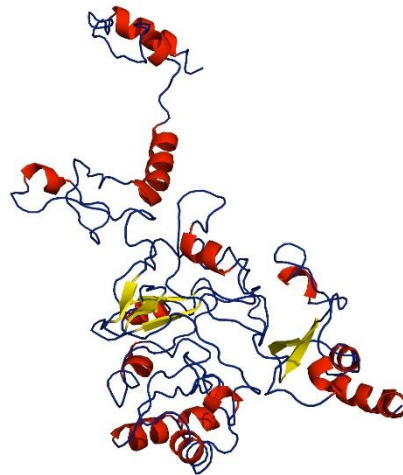
Figura 19 - Modelo tridimensional da estrutura terciária da proteína *Beta-like*.



Legenda: Em amarelo as interações do tipo folhas β -pregueadas e em azul as interações do tipo *coils*.

Fonte: Do autor.

Figura 20 - Modelo tridimensional da estrutura terciária da proteína *Mar-like*.



Legenda: Em vermelho as interações do tipo α -hélices, em amarelo as interações do tipo folhas β -pregueadas e em azul as interações do tipo *coils*.

Fonte: Do autor.

Com a modelagem molecular foi possível analisar as estruturas secundárias das quatro proteínas selecionadas. Observou-se que a proteína *Restina-like* possui regiões de α -hélice e nenhuma região de folhas β -pregueadas (Tabela 3), sendo observada a presença de *coils* nas regiões N e C-terminal. Para a proteína *Restina-like* foi predito um peso molecular de 52,75 KDa.

Tabela 3 - Estruturas secundárias encontradas na proteína *Restina-like*, evidenciando os aminoácidos iniciais e finais de cada uma delas.

α-hélices		Folhas β-pregueadas		<i>Coils</i>	
Aminoácido inicial	Aminoácido final	Aminoácido inicial	Aminoácido final	Aminoácido inicial	Aminoácido final
-	-	-	-	1 MET	60 LEU
61 ARG	73 THR	-	-	74 PRO	120 GLY
121 ALA	126 ALA	-	-	127 ALA	143 ARG
144 ASP	148 ILE	-	-	149 LEU	246 SER
247 VAL	249 ALA	-	-	250 GLU	286 GLY
287 GLU	289 LYS	-	-	290 GLU	327 GLU
328 TYR	336 ALA	-	-	337 ASP	507 LEU

Fonte: do autor.

Já na proteína *Beta-like* foram observadas integrações entre os aminoácidos em estrutura rica em folhas β -pregueadas, porém, sem nenhuma estrutura do tipo α -hélice, conforme mostrado na tabela 4. Nessa proteína também é possível encontrar *coils* nas regiões N e C-terminal. Foi predito para a proteína *Beta-like* o peso molecular de 133,5 KDa.

Tabela 4 - Estruturas secundárias encontradas na proteína Beta-*like*, evidenciando os aminoácidos iniciais e finais de cada uma delas. (Início)

α-hélices		Folhas β-pregueadas		Coils	
Aminoácido inicial	Aminoácido final	Aminoácido inicial	Aminoácido final	Aminoácido inicial	Aminoácido final
-	-	-	-	1 MET	24 PRO
-	-	25 SER	35 LYS	36 ILE	55 ALA
-	-	56 SER	59 GLU	60 ALA	69 ALA
-	-	70 SER	76 SER	77 VAL	91 SER
-	-	92 SER	96 ASP	97 ALA	142 SER
-	-	143 SER	145 THR	146 THR	150 VAL
-	-	151 PRO	155 ALA	156 ASN	158 THR
-	-	159 ALA	161 SER	162 LEU	201 ALA
-	-	202 SER	207 SER	208 VAL	209 SER
-	-	210 SER	213 SER	214 LYS	234 PRO
-	-	235 SER	237 ASP	238 ALA	247 LYS
-	-	248 ALA	253 THR	254 ILE	270 VAL
-	-	271 THR	274 SER	275 ILE	316 VAL
-	-	317 THR	320 VAL	321 ILE	332 TRP
-	-	333 ASP	335 ALA	336 VAL	397 SER
-	-	398 SER	402 GLY	403 GLY	410 ASN
-	-	411 GLU	416 PRO	417 ALA	426 ILE
-	-	427 SER	429 THR	430 ALA	459 HIS
-	-	460 GLN	462 ASP	463 LYS	476 PRO
-	-	477 ALA	480 GLY	481 GLY	547 GLY
-	-	548 ASP	552 PRO	553 ALA	561 GLU
-	-	562 ALA	565 ALA	566 PRO	610 SER
-	-	611 SER	615 GLY	616 PRO	617 SER
-	-	618 ALA	621 SER	622 ALA	642 PRO
-	-	643 SER	646 ALA	647 GLU	656 THR
-	-	657 SER	660 PRO	661 SER	679 SER
-	-	680 SER	681 ALA	682 GLU	712 ALA
-	-	713 PRO	715 VAL	716 GLU	726 GLU
-	-	727 PRO	734 SER	735 ALA	742 VAL
-	-	743 SER	747 THR	748 VAL	762 ALA
-	-	763 SER	765 ALA	766 GLU	782 SER
-	-	783 ALA	784 SER	785 ALA	850 PRO
-	-	851 SER	852 ALA	853 GLU	854 VAL
-	-	855 SER	856 ALA	857 GLU	877 THR
-	-	878 ALA	882 SER	883 VAL	892 THR
-	-	893 THR	900 THR	901 VAL	915 ALA

Tabela 4 - Estruturas secundárias encontradas na proteína *Beta-like*, evidenciando os aminoácidos iniciais e finais de cada uma delas. (Continuação)

α-hélices		Folhas β-pregueadas		Coils	
Aminoácido Inicial	Aminoácido Final	Aminoácido Inicial	Aminoácido Final	Aminoácido Inicial	Aminoácido Final
-	-	916 SER	918 SER	819 ASP	968 GLY
-	-	969 ASN	972 GLU	973 LEU	984 SER
-	-	985 ALA	988 SER	989 PRO	1080 SER
-	-	1081 PRO	1083 ALA	1084 ASN	1105 PRO
-	-	1106 THR	1108 ASN	1109 VAL	1115 PRO
-	-	1116 SER	1117 PRO	1118 SER	1151 VAL
-	-	1152 THR	1154 ALA	1155 LEU	1163 THR
-	-	1164 SER	1167 GLU	1168 PRO	1170 PRO
-	-	1171 SER	1172 ALA	1173 ASN	1191 SER
-	-	1192 VAL	1194 PRO	1195 SER	1208 PRO
-	-	1209 SER	1212 ALA	1213 ASN	1267 THR
-	-	1268 SER	1270 ALA	1271 SER	1276 PRO
-	-	1277 SER	1283 PRO	1284 SER	1288 SER
-	-	1289 ALA	1290 SER	1291 ALA	1324 SER
-	-	1325 ALA	1328 GLY	1329 SER	1347 GLU
-	-	1348 PRO	1352 ASP	1353 GLY	1359 ASP
-	-	1360 TYR	1361 THR	1362 ASP	1383 GLN

Fonte: do autor.

Para a proteína *Mar-like* foi possível observar que seus aminoácidos formam tanto estruturas do tipo α -hélice quanto estruturas do tipo folhas β -pregueadas, porém sendo mais rica em estruturas do tipo α -hélices, conforme mostrado na Tabela 5. Nesta proteína também é possível encontrar estruturas do tipo *coil* tanto na região N-terminal como na C-terminal. Foi predito para a proteína *Mar-like* o peso molecular de 39,64 KDa.

Tabela 5 - Estruturas secundárias encontradas na proteína *Mar-like*, evidenciando os aminoácidos iniciais e finais de cada uma delas.

α-hélices		Folhas β-pregueadas		Coils	
Aminoácido inicial	Aminoácido final	Aminoácido inicial	Aminoácido final	Aminoácido inicial	Aminoácido final
-	-	-	-	1 MET	3 PHE
4 SER	14 ALA	-	-	15 MET	-
32 LEU	35 ARG	-	-	36 ALA	-
42 GLU	54 LYS	-	-	55 ARG	-
76 PRO	80 CYS	-	-	81 ASN	-
-	-	100 HIS	102 GLY	103 ASP	105 GLY
-	-	106 CYS	108 GLU	109 CYS	120 SER
-	-	121 ASN	122 THR	123 GLY	141 HIS
-	-	142 GLY	143 GLY	144 ASP	158 GLY
159 GLN	164 GLY	-	-	165 ASN	180 PRO
181 THR	185 SER	-	-	186 THR	188 ASN
189 GLY	196 SER	-	-	197 ASN	211 THR
212 PRO	218 PRO	-	-	219 LYS	239 HIS
240 THR	244 GLY	-	-	245 ASP	300 THR
301 SER	303 GLY	-	-	304 GLY	332 SER
333 SER	336 GLU	-	-	337 ALA	358 GLY
-	-	359 ALA	363 ASP	364 GLY	365 GLN
-	-	366 ASP	370 GLY	371 LYS	374 VAL
375 LYS	383 GLY	-	-	384 SER	389 GLN
390 GLU	406 ALA	-	-	-	-

Fonte: do autor.

Finalmente, em *CFL1-like*, por ser uma proteína menor, foram encontradas as mesmas quantidades de estruturas do tipo α -hélice e folhas β -pregueadas, ambas construídas com baixas quantidades de aminoácidos, conforme visto na Tabela 6, enquanto as estruturas do tipo *coil* são mais abundantes e constituídas por maior número de aminoácidos, sendo inclusive encontradas nas regiões N e C-terminal. Para a proteína *CFL1-like* foi predito o peso molecular de 36,2 KDa.

Tabela 6 - Estruturas secundárias encontradas na proteína CFL1-*like*, evidenciando os aminoácidos iniciais e finais de cada uma delas.

α-hélices		Folhas β-pregueadas		Coils	
Aminoácido inicial	Aminoácido final	Aminoácido inicial	Aminoácido final	Aminoácido inicial	Aminoácido final
-	-	-	-	1 MET	86 ALA
-	-	87 SER	90 LEV	91 PRO	96 GLN
-	-	97 ARG	99 THR	100 CYS	129 PHE
130 TRP	133 GLU	-	-	134 GLY	275 ALA
276 GLU	278 CYS	-	-	279 GLY	325 ALA

Fonte: do autor.

5.4.2 Peptídeos imunogênicos

Após a modelagem tridimensional das proteínas de interesse, foram realizadas análises nos programas TepiTool e *software* VaxiJen 2.0 para seleção de peptídeos imunogênicos dessas proteínas. A tabela 7 mostra os peptídeos selecionados como imunogênicos obtidos para as quatro proteínas, sendo 32 deles para a Restina-*like*, 12 peptídeos imunogênicos para CFL1-*like*, 165 peptídeos imunogênicos para Beta-*like* e 9 peptídeos imunogênicos para a Mar-*like*.

Tabela 7 – Sequência dos peptídeos imunogênicos das proteínas Restina-*like*, CFL1- *like*, Beta-*like* e Mar-*like*. (Início)

Proteínas	Sequência	Início	Fim	VaxiJen v 2.0	Número de alelos do MHC classe II	Mapeamento dos epítopos
Restina-<i>like</i>	FTALAAVASAHPFEA	7	21	0.8474	17	Externo
	AHPFEAIFGRDTCVN	16	30	2.5354	6	Externo
	VVTFVIDNSASNGYA	34	48	0.5539	17	Externo
	AKENIKGSDPNGLRF	48	62	1.9166	5	Externo
	NGLRFDGARKLIAAM	58	72	2.0638	21	Externo
	ARKLIAAMTPGKDQA	65	79	1.4269	15	Externo
	AMTPGKDQASVTFT	71	85	1.7115	1	Externo
	TFTTRSKVLVGNTDV	83	97	1.7307	6	Externo
	KVLVGNTDVGNIHFS	89	103	1.1373	1	Externo
	NTDVGNIHFSNPDIG	94	108	0.8018	1	Externo
	IHFNSNPDIGGLTTME	100	114	0.9414	1	Interno
	PDIGGLTTMEEGVKG	105	119	1.7064	3	Externo
	MEEGVKGGADQLHAA	113	127	0.6803	1	Externo
	GVRIHWAQLNVDGEK	165	179	1.5396	17	Externo

Tabela 7 – Sequência dos peptídeos imunogênicos das proteínas Restina-*like*, CFL1-*like*, Beta-*like* e Mar-*like*.
(Continuação)

Proteínas	Sequência	Início	Fim	VaxiJen v 2.0	Número de alelos MHC classe II	Mapeamento dos epítomos
	NVDGEKRQPPGVAEV	174	188	1.4740	1	Externo
	GGIYAEVNDAASLTK	193	207	1.4532	8	Externo
	THGICSNNVQAVYTY	239	253	0.9856	13	Externo
	VQAVYTYTPQRKEKI	247	261	0.1586	13	Externo
	RKEKIDIDLALLTTK	257	271	1.2130	19	Interno
	IDLALLTTKNKVNLN	263	277	0.8247	14	Externo
	GEKKEGNVNSGNAKQ	286	300	1.1100	1	Externo
	GNVNSGNAKQTISVS	291	305	2.2976	2	Externo
	GNAKQTISVSADKGQ	296	310	1.7908	2	Externo
	SVSADKGQQITVTVS	303	317	2.3754	2	Externo
	GQQITVTVSPSNASN	309	323	0.9495	10	Externo
	ECEYTVSLRRTTADST	325	339	1.1512	15	Externo
	STSPEPTTSATSCPA	447	461	1.0071	1	Externo
	PTTQTVTSTVTTVT	465	479	0.9746	4	Interno
	VTSTVTTVTAPAPS	470	484	0.8701	11	Externo
	VTTVTAPAPSSTASV	475	489	0.9578	3	Externo
	APAPSSTASVCICKC	480	494	0.9645	2	Externo
	TASVCICKCDAPGAK	486	500	0.6024	1	Externo
CFL1-<i>like</i>	HWRWRRDISALTGLT	12	26	0.7148	8	Externo
	RDISALTGLTELQLR	17	31	1.2951	4	Externo
	LAASQAEATFGLFQK	49	63	1.1579	4	Externo
	PGFKPNSAATECVAA	61	75	0.6687	1	Externo
	AEATFGLFQKWGSGG	127	141	0.6760	4	Externo
	RGFWCWGNNQQLCSS	178	192	3.5750	1	Externo
	DEFWWVEGKRCCANN	206	220	1.9329	3	Interno
	DNTKNHWRWRRDISA	211	225	2.4553	18	Interno
	CSSQRTCGSPPRQTQ	216	230	1.0263	15	Interno
	CPPGYQWDWNTHCCK	274	288	1.5868	1	Externo
	DAEFCGGCAGKGQNC	291	305	1.0824	1	Externo
	IANAVDVRCKVGACE	311	325	0.5851	5	Externo
Beta-<i>like</i>	MRFPSAGPSLVVLPL	1	15	0.9954	7	Externo
	GPLVEPSSAAAEASS	43	57	0.9968	5	Externo
	PSSAAAEASSAEATV	48	62	1.1424	4	Externo
	AEASSAEATVVSASA	53	67	1.3723	4	Externo
	EATVVSASASASDVA	59	73	0.7826	12	Externo
	ASASDVASASVTSIA	67	81	1.1332	5	Externo
	VASASVTSIAPEVST	72	86	1.2032	7	Externo
	VTSIAPEVSTSANST	77	91	0.7312	4	Externo
	EVSTSANSTSTVADA	83	97	0.9941	2	Externo

Tabela 7 – Sequência dos peptídeos imunogênicos das proteínas Restina-*like*, CFL1-*like*, Beta-*like* e Mar-*like*.
(Continuação)

Proteínas	Sequência	Início	Fim	VaxiJen V 2.0	Número de alelos MHC classe II	Mapeamento dos epítomos
	VADAPEASNATASSG	94	108	0.8493	1	Externo
	EASNATASSGAGTSK	99	113	2.0768	2	Externo
	TASSGAGTSKDSGVW	104	118	0.5434	1	Externo
	AAPEPSSNGTSSAVP	137	151	0.8329	1	Externo
	SSNGTSSAVPIVSAN	142	156	1.9210	3	Externo
	VPIVSANATASSLPV	150	164	1.4341	12	Externo
	ANATASSLPVETSDA	155	169	0.9126	5	Externo
	VETSDATASASAEAS	164	178	1.2313	4	Externo
	ATASASAEASASASA	169	183	1.4108	4	Externo
	SAEASASASASASGE	174	188	1.5935	2	Externo
	ASASASASGEAEAEAP	179	193	0.9315	4	Externo
	SASGEAEAEPSSEAS	184	198	0.5445	3	Externo
	AEPSSEASSAASNAS	191	205	0.8843	2	Externo
	EASSAASNASASVSS	196	210	1.0713	2	Externo
	ASNASASVSSTQSKT	201	215	1.3303	2	Externo
	VSSTQSKTPTPSSSR	208	222	0.6531	1	Externo
	RDNSGDDTIPVAPSH	222	236	0.5962	1	Externo
	VAPSHDAEAVSSVQS	232	246	1.5985	3	Externo
	QQLTQTSAVTSTSI	261	275	0.6161	9	Externo
	TSAVTSTSIMAAAAE	267	281	0.7886	12	Externo
	STSIMAAAAEATGGS	272	286	1.1615	7	Externo
	AAAAEATGGSGDIYA	277	291	2.2617	1	Externo
	ATGGSGDIYAEAQKL	282	296	1.3669	3	Externo
	GDIYAEAQKLAEQYV	287	301	1.0380	14	Externo
	AQKLAEQYVQSMAN	293	307	0.8662	13	Externo
	EQYVQSMANEYGKL	298	312	0.8626	17	Externo
	ANEYGKLLPTVTLNV	306	320	0.8643	17	Externo
	VTLNVILEPTQEADG	316	330	0.8796	10	Externo
	QEADGHWDYAVHLGN	326	340	1.0634	2	Externo
	HWDYAVHLGNDGHT	331	345	1.5152	2	Externo
	LGNDGHTAVPTFVP	338	352	1.2109	1	Externo
	SASKKGPLTATADLS	378	392	1.7010	1	Externo
	ATADLSGPAPSSTGS	387	401	1.0584	1	Externo
	APSSTGSGGKNVPE	395	409	1.4232	1	Externo
	NEENLVPAPSVNPIG	410	424	1.2957	3	Externo
	SVNPIGGISTTANWT	419	433	1.7822	2	Externo
	PKPTVANPKPTTSSS	434	448	0.5399	1	Externo
	APTQDSQKPAPAPAP	497	511	0.6101	1	Externo
	DNEDGGDWVAPAPAP	542	556	0.6917	1	Externo
	GDWVAPAPAPATSSE	547	561	1.0117	3	Externo
	PAPAPATSSEASAAP	552	566	0.6040	2	Externo

Tabela 7 – Sequência dos peptídeos imunogênicos das proteínas Restina-*like*, CFL1-*like*, Beta-*like* e Mar-*like*.
(Continuação)

Proteínas	Sequência	Início	Fim	VaxiJen V 2.0	Número de alelos MHC classe II	Mapeamento de epítomos
	ATSSEASAAPAPTSE	557	571	0.5904	4	Externo
	SAAPAPSNNNGQESSG	578	592	0.5110	1	Externo
	YESSTEQSVVATASA	594	608	1.1262	2	Externo
	EQSVVATASATSSDS	599	613	0.5302	7	Externo
	ATASATSSDSAGPSA	604	618	1.0134	1	Externo
	GPSASESASPSVSAE	615	629	1.3969	2	Externo
	ESASPSVSAEPNVSA	620	634	1.8616	3	Externo
	EPNVSAEPSASVEPS	629	643	1.2612	3	Externo
	AEPSASVEPSVSAEP	634	648	1.8274	3	Externo
	VEPSVSAEPSASAEY	640	654	1.6025	5	Externo
	SAEPSASAEYSTSAE	645	659	1.4956	2	Externo
	SAEYSTSAEPSTSAT	651	665	1.4216	4	Externo
	TSAEPSTSATAEISS	656	670	1.8427	4	Externo
	STSATAEISSKPSAS	661	675	1.3992	2	Externo
	ISSKPSASAEPSSAE	668	682	0.8143	1	Externo
	SASAEPSSAESSASA	673	687	0.8217	1	Interno
	PSSAESSASAEVTES	678	692	1.2234	4	Interno
	AEVTESTGSAIASAS	687	701	1.4445	4	Externo
	STGSAIASASASATP	692	706	0.6647	7	Externo
	IASASASATPSATSS	697	711	0.9138	3	Externo
	ASATPSATSSAPDVE	702	716	0.8082	1	Externo
	SATSSAPDVEQPADP	707	721	0.7347	3	Externo
	QPADPEVSSEPSVSA	717	731	1.4751	1	Externo
	EVSSEPSVSASASAS	722	736	1.9325	2	Externo
	PSVSASASASASDVS	727	741	1.2710	6	Externo
	SASASASDVS SVQVP	732	746	1.2728	4	Externo
	DVSVSVQPTVSASSN	739	753	1.3027	6	Interno
	VQPTVSASSNATASP	744	758	1.1505	4	Interno
	SASSNATASPEPTAS	749	763	0.6885	1	Interno
	EPTASSAEPSAEPSA	759	773	0.6479	3	Externo
	EPSAEPSATASASAE	766	780	1.4287	4	Externo
	PSATASASAEVSASA	771	785	1.6887	4	Externo
	SASAEVSASASAEPS	776	790	1.2763	4	Externo
	VSASASAEPSASASA	781	795	1.2007	4	Externo
	SAEPSASASAEPSAE	786	800	1.1512	4	Externo
	AEPSAEPSASATESA	795	809	1.0924	1	Externo
	ASATESAEPSASATE	803	817	0.9532	3	Externo
	PSASATESAEPSYSA	811	825	0.7167	3	Externo
	TESAEPSYSAEPSAT	816	830	0.8010	1	Externo
	PSYSAEPSATPSAET	821	835	1.2653	5	Externo

Tabela 7 – Sequência dos peptídeos imunogênicos das proteínas *Restina-like*, *CFL1-like*, *Beta-like* e *Mar-like*.
(Continuação)

Proteínas	Sequência	Início	Fim	VaxiJen V 2.0	Número de alelos MHC classe II	Mapeamento de epítomos
	PDDAPSTSAEASATP	836	850	0.8155	1	Externo
	STSAEASATPSAEVS	841	855	1.4296	4	Externo
	ASATPSAEVSAEPSA	846	860	1.2949	4	Externo
	SAEVSAEPSAEPSAT	851	865	1.0430	3	Externo
	PSAEPSATESSAEAS	858	872	0.7446	2	Externo
	VEESEDGISTTYTTS	883	897	1.5981	1	Externo
	DGISTTYTTSWTTVN	888	902	1.3584	6	Externo
	TYTTSWTTVNVTMTR	893	907	0.6553	8	Externo
	WTTVNVTMTRDPQPT	898	912	1.3351	1	Externo
	TMTRDPQPTGNASAS	904	918	1.0686	1	Externo
	PQPTGNASASDSSVV	909	923	1.0850	1	Externo
	LPETEPTVSSNSTEL	929	943	1.8267	1	Externo
	ELPSPTGNSTELPSV	942	956	2.3156	1	Externo
	TGNSTELPSVSGNST	947	961	2.3156	1	Externo
	LPSVSGNSTEVPTST	953	967	2.1004	1	Externo
	GNSTEVPTSTGNWTE	958	972	0.8695	1	Externo
	TGNWTELPIETGNIT	967	981	0.5367	1	Externo
	IETGNITEPSASASP	975	989	0.9395	1	Externo
	PSSNATASAEPTPSA	989	1003	0.8571	4	Externo
	TASAEPTPSANATSV	994	1008	1.0644	1	Externo
	PTPSANATSVLPEPS	999	1013	0.5058	4	Externo
	SVLPEPSANVTSSVE	1007	1021	1.0721	2	Externo
	PSANVTSSVEPSPSA	1012	1026	1.1050	2	Externo
	SSVEPSPSANVTSAL	1018	1032	1.5169	2	Interno
	SANVTSALPSPSANV	1025	1039	1.3669	12	Interno
	SALPSPSANVTSSVE	1030	1044	1.5853	1	Interno
	NVTSSVEPSPSANAT	1038	1052	0.9943	1	Interno
	VEPSPSANATSALPS	1043	1057	0.8975	2	Externo
	SANATSALPSPSANA	1048	1062	0.7941	4	Externo
	SALPSPSANATASAE	1053	1067	1.1019	2	Externo
	PSANATASAEPSPSA	1058	1072	0.8972	4	Externo
	TASAEPSPSANATSV	1063	1077	1.0862	1	Externo
	SPSANATSVLPSPSA	1069	1083	0.7415	3	Externo
	TSVLPSPSANATSSV	1075	1089	0.5711	4	Externo
	SPSANATSSVEPSPS	1080	1094	1.0481	2	Externo
	SSVEPSPSANATASA	1087	1101	1.2120	1	Externo
	SPSANATASAEPSPPT	1092	1106	0.9430	4	Externo
	ATASAEPSPPTGNVTA	1097	1111	1.5527	1	Externo
	PTGNVTAPIEPSPSA	1105	1119	1.3777	2	Externo
	TAPIEPSPSASASAN	1110	1124	0.8814	2	Externo

Tabela 7 – Sequência dos peptídeos imunogênicos das proteínas Restina-*like*, CFL1-*like*, Beta-*like* e Mar-*like*.
(Continuação)

Proteínas	Sequência	Início	Fim	VaxiJen V 2.0	Número de alelos MHC classe II	Mapeamento de epítomos
	PSPSASASANATISA	1115	1129	1.6249	2	Externo
	SASANATISAEPPSPS	1120	1134	1.3370	4	Externo
	ATISAEPPSPSPSANA	1125	1139	1.2218	1	Externo
	SPSPSANASASVEPS	1132	1146	1.2764	4	Externo
	ANASASVEPPSPSANV	1137	1151	1.5133	3	Externo
	SANVTALPSPSANA	1148	1162	0.9594	11	Externo
	SALPSPSANATSSVE	1153	1167	1.1629	1	Externo
	SVEPPSPSANATITPS	1165	1179	1.2211	1	Externo
	NATITPSPSTSASAN	1173	1187	1.0062	4	Interno
	PSPSTSASANVTSSV	1178	1192	1.7117	2	Interno
	NVTSSVEPPSPSASAN	1187	1201	0.9123	1	Externo
	VEPPSPSASANVTSSV	1192	1206	1.4039	2	Externo
	NVTSSVEPPSPSANAA	1201	1215	0.9029	1	Externo
	VEPPSPSANAAISASA	1206	1220	1.2728	2	Externo
	SANAAISASASASPS	1211	1225	0.9550	6	Externo
	ISASASASPPSPSANA	1216	1230	1.0034	2	Externo
	SASPPSPSANATSSVE	1221	1235	1.2638	1	Externo
	ANATSSVEPPSPSANV	1228	1242	1.4348	2	Externo
	SVEPPSPSANVTSSVL	1233	1247	1.2510	1	Externo
	PSPSASSSAEASSSA	1248	1262	1.0160	2	Externo
	SSSAEASSSASASAT	1253	1267	1.2328	2	Externo
	ASSSASASATSSASA	1258	1272	1.4309	2	Externo
	SASATSSASASPPSPS	1263	1277	0.8204	2	Externo
	TPSPSSSESASASAS	1280	1294	0.9941	1	Externo
	SSESASASASSSASA	1285	1299	1.3871	2	Externo
	ASSSASASASASESA	1293	1307	1.1013	4	Externo
	SASASASESASASES	1298	1312	0.9224	4	Externo
	SASASESASASSFAS	1306	1320	1.2109	3	Externo
	SASASSFASVSASAS	1312	1326	0.8787	11	Externo
	SFASVSASASASSSA	1317	1331	0.7586	11	Externo
	SASASSSAEASASAS	1324	1338	1.2754	3	Externo
	SSAEASASASPSATS	1329	1343	0.9939	2	Externo
	SASASPSATSSGAEP	1334	1348	0.5786	1	Externo
	PSATSSGAEPSATDG	1339	1353	0.6190	1	Externo
	EEYEEIWWVEDEIQE	1363	1377	0.6132	7	Externo
Mar-<i>like</i>	LFSVLGAMAGQVVAK	8	22	0.7168	17	Externo
	RRAEMIQTEEDLLVA	34	48	1.4717	10	Externo
	IQTEEDLLVARDQLD	39	53	1.3065	9	Externo
	GAMAGQVVAKPAAEI	13	27	1.0372	5	Externo
	QVVAKPAAEIGELEL	18	32	0.7574	5	Externo

Tabela 7 – Sequência dos peptídeos imunogênicos das proteínas Restina-*like*, CFL1-*like*, Beta-*like* e Mar-*like* (Fim)

Proteínas	Sequência	Início	Fim	VaxiJen V 2.0	Número de alelos MHC classe II	Mapeamento de epítomos
	VNVIVSPICGCNNGG	70	84	1.0608	1	Externo
	CGCNGGGGGGPGGTG	78	92	4.4653	1	Externo
	GGGGPGGTGGGDHG	83	97	3.0043	1	Externo
	KDGQDGAPGKDAVCP	362	373	1.4026	1	Interno

Fonte: do autor.

Os peptídeos foram analisados quanto a posição na estrutura da proteína, tendo sido selecionados os peptídeos que se localizam em posições mais externas na estrutura proteica, próximos a região *N*-terminal. Com bases nesses dados e nos modelos de predição de ligação à alelos de MHC classe II humanos e H2 murinos, foi escolhido um peptídeo de cada proteína estudada com base na maior predição de imunogenicidade e maior número de alelos de MHC classe II aos quais se ligam conforme pode ser observado na tabela 8.

Tabela 8 - Peptídeos selecionados de cada proteína para serem sintetizados.

Proteínas	Sequência	Início	Fim	VaxiJen v 2.0	Número de alelos do MHC classe II
Restina- <i>like</i>	NGLRFDGARKLIAAM	58	72	2.0638	21
Cfl1- <i>like</i>	HWRWRRDISALTGLT	211	225	2.4553	18
Beta- <i>like</i>	VPIVSANATASSLPV	150	164	1.4341	12
Mar- <i>like</i>	RRAEMIQTEEDLLVA	34	48	1.4717	10

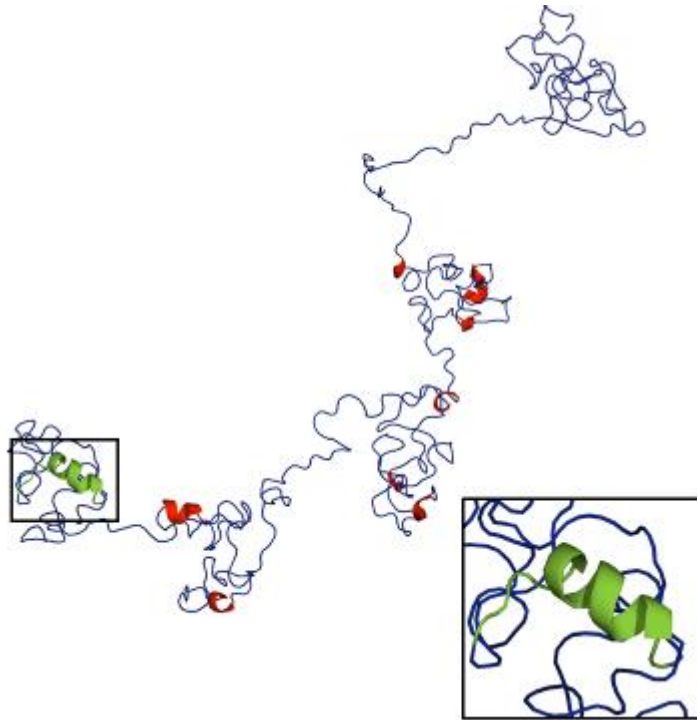
Fonte: do autor.

Os peptídeos selecionados para o MHC II também foram reconhecidos por todos os sete alelos disponíveis no banco de dados do NetMHCII 2.3, a saber: IAb, IAd, IAK, IAs, IAU, IEd e IEK.

Na visualização dos peptídeos selecionados nos modelos 3D foi possível observar que na proteína Restina-*like* o peptídeo selecionado localizou-se em porção α -hélice, entre os aminoácidos 58 e 72 (Figura 21) e o peptídeo selecionado para a proteína CFL1-*like* encontrou-se numa porção *coil*, entre os aminoácidos 211 e 225 (Figura 22). Já na proteína Beta-*like* foi selecionado o peptídeo que se encontrou entre os aminoácidos 150 e 164, também localizado em uma porção *coil* (Figura 23) e na

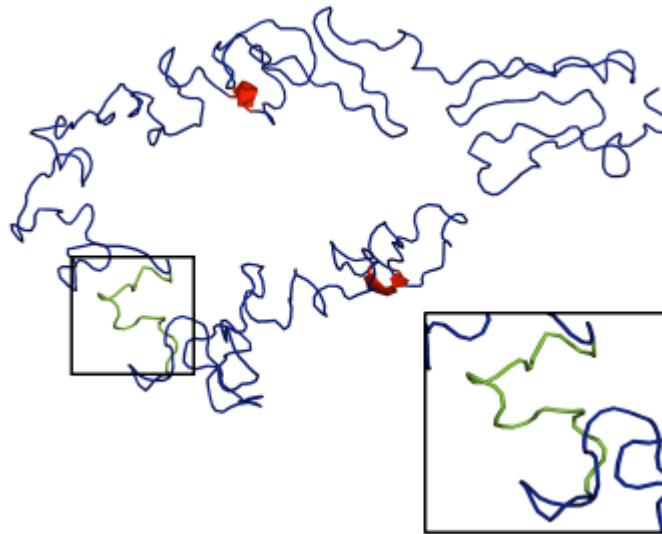
proteína *Mar-like* (Figura 24), o peptídeo selecionado encontrou-se entre os aminoácidos 34 e 48, localizado em uma porção mista de α -hélice e *coil*.

Figura 21 - Localização do peptídeo selecionado na estrutura tridimensional de *Restina-like*.



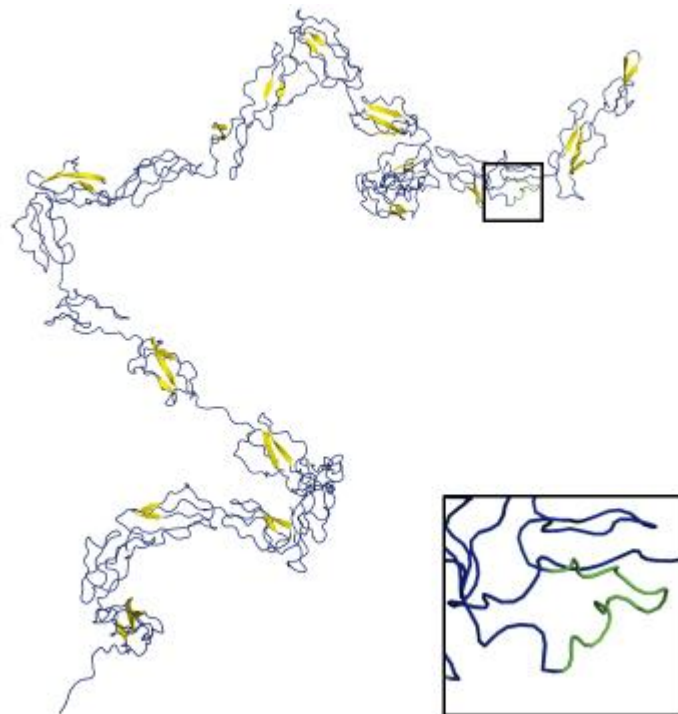
Legenda: Peptídeo selecionado destacado em verde.
Fonte: Do autor.

Figura 22 - Localização do peptídeo selecionado na estrutura tridimensional de CFL1-*like*.



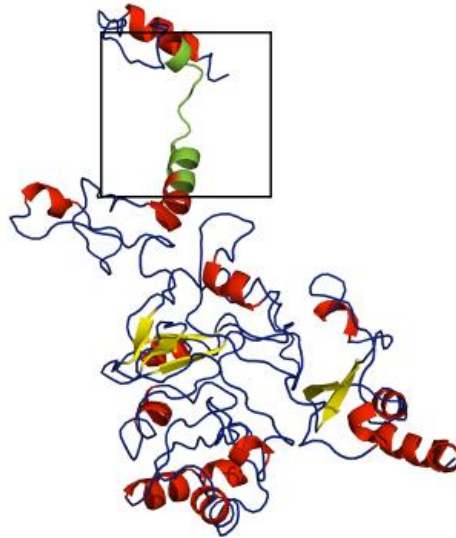
Legenda: Peptídeo selecionado destacado em verde.
Fonte: Do autor.

Figura 23 - Localização do peptídeo selecionado na estrutura tridimensional de Beta-*like*.



Legenda: Peptídeo selecionado destacado em verde.
Fonte: Do autor.

Figura 24 - Localização do peptídeo selecionado na estrutura tridimensional de Beta-like.



Legenda: Peptídeo selecionado destacado em verde.
Fonte: Do autor.

5.5 Avaliação do reconhecimento das proteínas pelos anticorpos gerados com os peptídeos sintetizados

5.5.1 *Rendimento das coletas dos soros pré-ímmunes e antissoros*

A partir de 6 camundongos machos, com idade entre 8 a 10 semanas, mantidos juntos, foram realizadas as coletas de soros pré-ímmunes, com um volume de 640 μL finais em *pool*, estocados a -20°C em alíquotas de 20 μL até o momento do uso.

Após as imunizações com os peptídeos foram obtidos 150 μL de antissoro contra o peptídeo de Restina-like, 380 μL de antissoro contra o peptídeo de CFL-like, 360 μL de antissoro contra o peptídeo de Beta-like e 400 μL de antissoro contra o peptídeo de Mar-like. Os antissoros foram estocados a -20°C em alíquotas de 20 μL até o momento do uso.

5.5.2 Microscopia de imunofluorescência confocal das adesinas na superfície fúngica

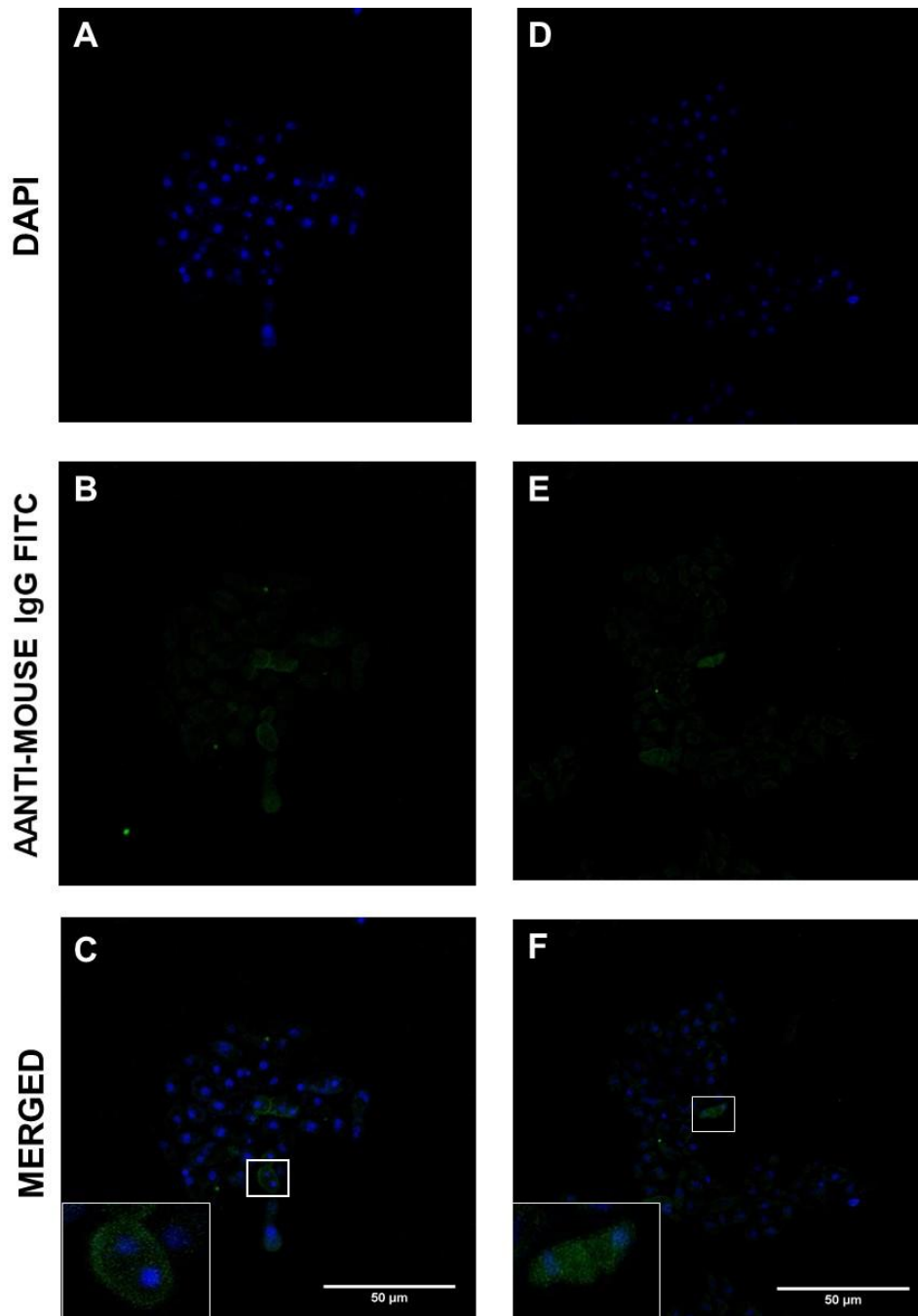
A partir de células de leveduras e hifas de *T. asahii* CBS 2479 não permeabilizadas para entrada de anticorpos foram feitas imagens de microscopia confocal para avaliar a presença das quatro proteínas na superfície celular fúngica.

Verificou-se que houve a presença das quatro proteínas na superfície das leveduras de *T. asahii*, porém como visto nas figuras 27 e 28 a presença de cada uma das proteínas variou em intensidade e uniformidade na superfície de leveduras, não havendo um padrão definido para a distribuição de cada proteína.

As proteínas *Restina-like* (Figura 25 A-C) e *CFL-like* (Figura 25 D-F) não apresentaram presença significativa na superfície de leveduras, com poucas células marcadas em que houve maior quantidade de anticorpos reconhecendo essas proteínas. Em contrapartida, as proteínas *Beta-like* (Figura 26 A-C) e *Mar-like* (Figura 26 D-F) apresentaram presença expressiva na superfície de leveduras, com mais células em que os anticorpos reconheceram essas proteínas e em maior quantidade na superfície das leveduras.

Diferentemente do observado para as leveduras, as hifas de *T. asahii* apresentaram presença de marcação das proteínas *Restina-like* (Figura 27 A-C), *Beta-like* (Figura 28 A-C) e *Mar-like* (Figura 28 D-F) em todas as hifas, uniformemente distribuídas por toda a superfície, tendo sido notadas através da fluorescência emitida pelo anticorpo secundário. Com exceção de *CFL1-like* (Figura 27 D-F) que não apresentou presença significativa na superfície de hifas quando comparada às outras três proteínas.

Figura 25 - Imagens de microscopia confocal de proteínas na superfície de leveduras de *T. asahii*.

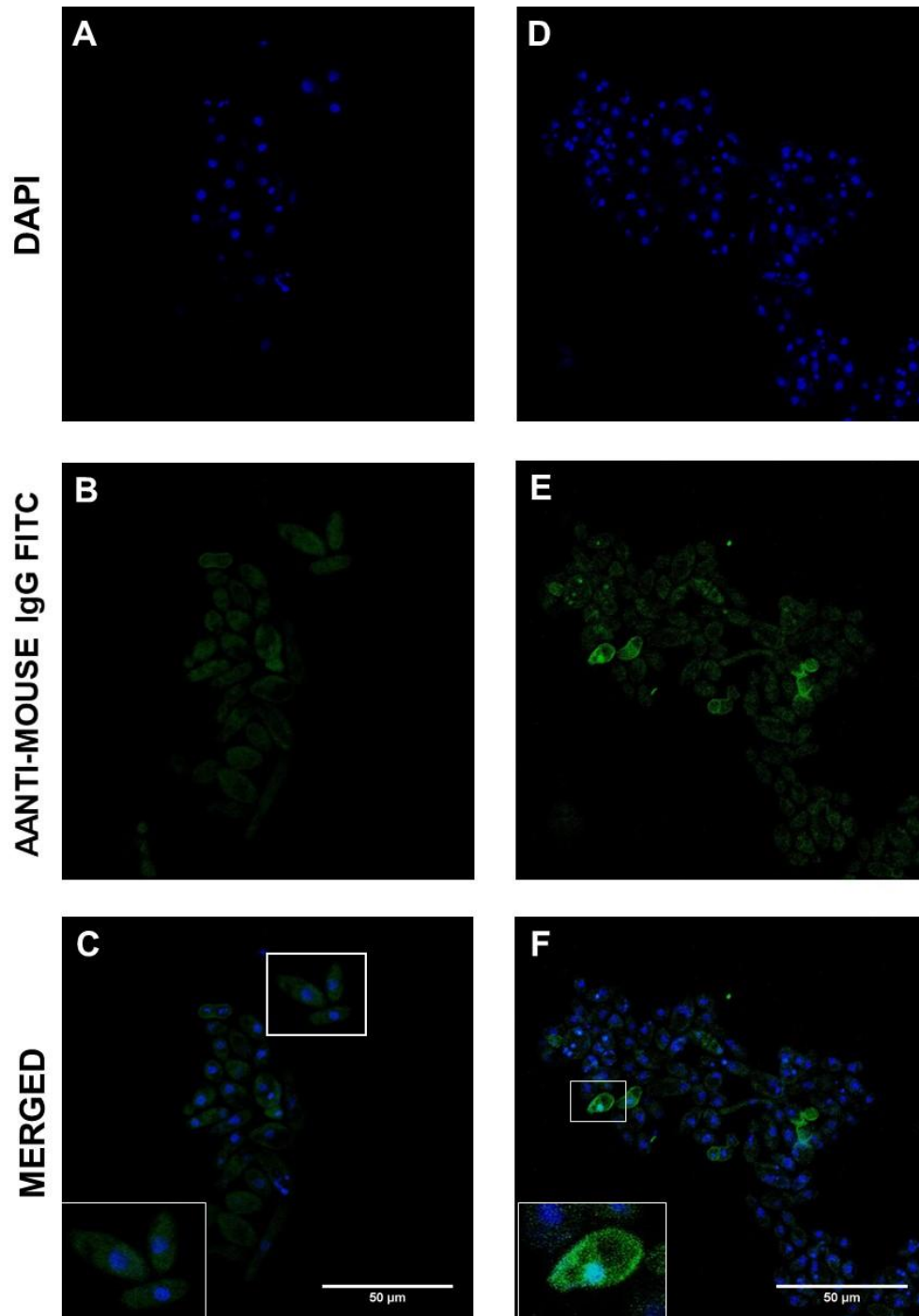


Legenda: Núcleos celulares marcados em azul com DAPI.
 A-C: Reconhecimento da proteína *Restina-like* por anticorpos IgG anti-mouse marcados com FITC.

D-E: Reconhecimento da proteína *CFL-like* por anticorpos IgG anti-mouse marcados com FITC.

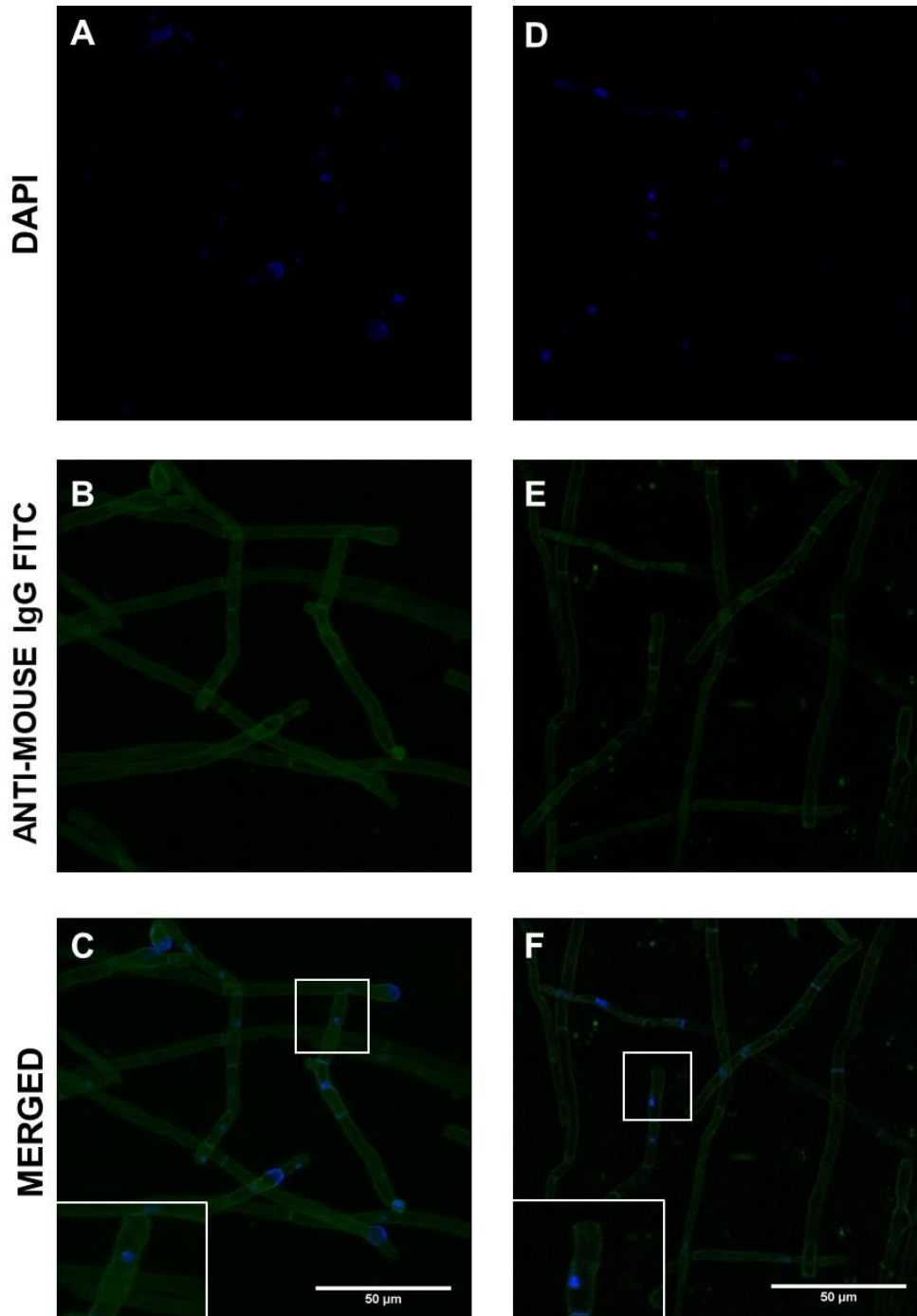
Fonte: Do autor.

Figura 26 - Imagens de microscopia confocal de proteínas na superfície de leveduras de *T. asahii*.



Legenda: Núcleos celulares marcados em azul com DAPI.
 A-C: Reconhecimento da proteína *Beta-like* por anticorpos IgG anti-mouse marcados com FITC.
 D-E: Reconhecimento da proteína *Mar-like* por anticorpos IgG anti-mouse marcados com FITC.
 Fonte: Do autor.

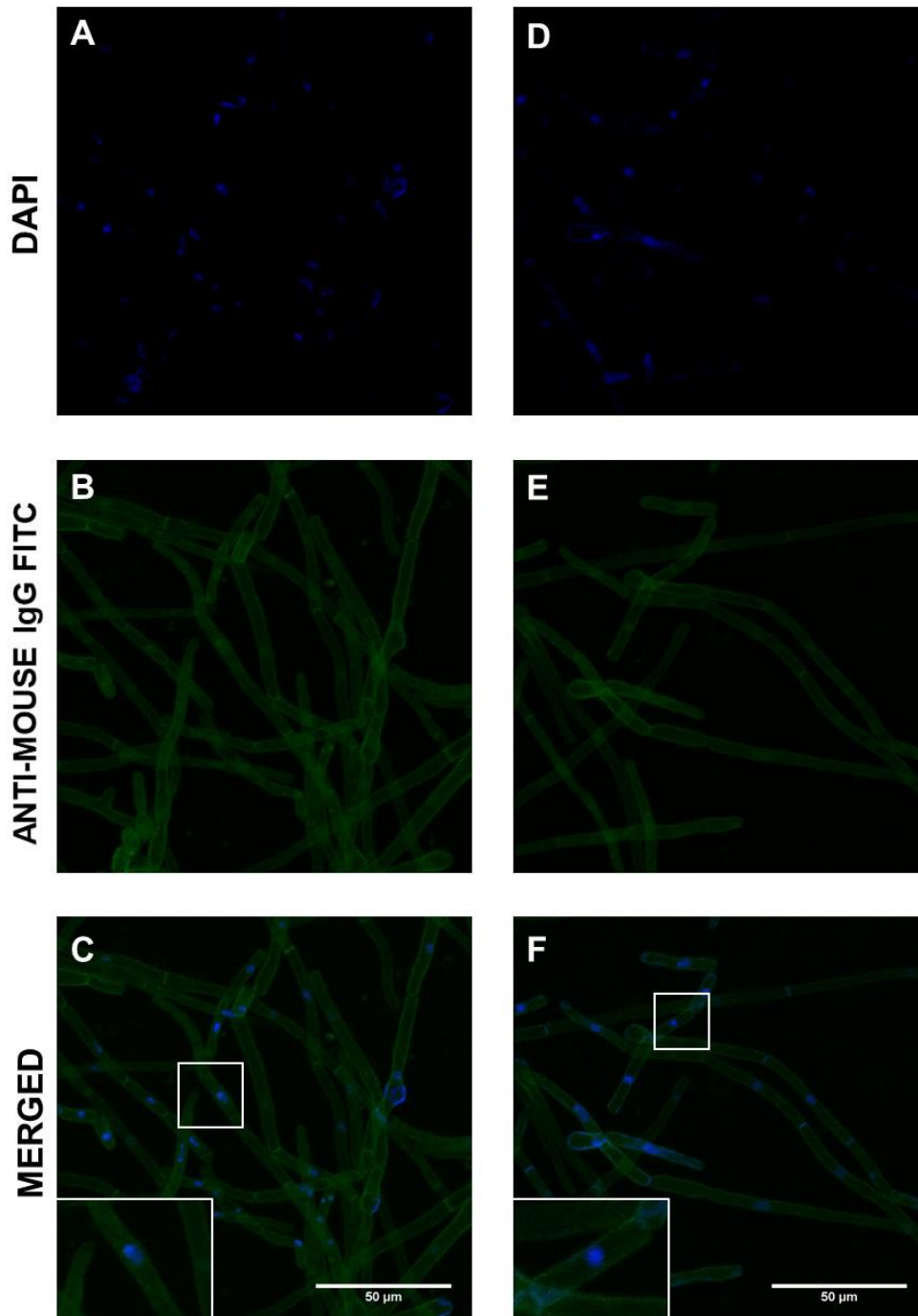
Figura 27 - Imagens de microscopia confocal de proteínas na superfície de hifas de *T. asahii*.



Levedura: Núcleos celulares marcados em azul com DAPI.
 A-C: Reconhecimento da proteína Restina-like por anticorpos IgG anti-mouse marcados com FITC.
 D-E: Reconhecimento da proteína CFL-like por anticorpos IgG anti-mouse marcados com FITC. Do autor.

Fonte: Do autor.

Figura 28- Imagens de microscopia confocal de proteínas na superfície de hifas de *T. asahii*.



Legenda: Núcleos celulares marcados em azul com DAPI.
 A-C: Reconhecimento da proteína *Beta-like* por anticorpos IgG anti-mouse marcados com FITC.
 D-E: Reconhecimento da proteína *Mar-like* por anticorpos IgG anti-mouse marcados com FITC.

Fonte: Do autor.

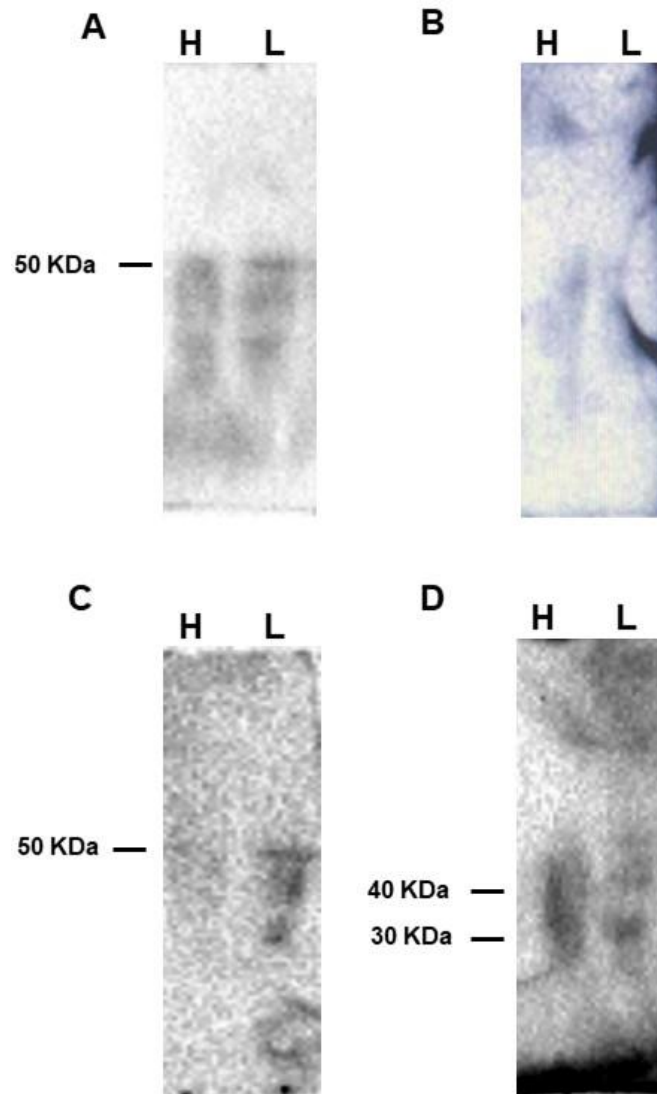
5.5.3 Reconhecimento das proteínas pelos anticorpos por Western blot

Para avaliar se os antissoros gerados contra os peptídeos sintéticos obtidos através da modelagem molecular predita das quatro adesinas de interesse, foi realizado um ensaio piloto por *Western blot* (Figura 29).

Na figura 29A foi observado o reconhecimento da proteína *Restina-like*, que possui peso molecular predito de 52,75 KDa, com peptídeo sinal, tanto nas proteínas totais de hifas quanto nas proteínas totais de leveduras. Para *CFL1-like* (Figura 29B), com peso molecular de 36,2 KDa, não foi observado nenhuma banda reconhecida. No ensaio da *Beta-like* (Figura 29C), com peso molecular predito de 133,5 KDa com peptídeo sinal, observou-se uma banda marcada na altura de 50 KDa, também seguida de uma sombra de arraste, na corrida das proteínas totais de leveduras, o que diferiu da localização esperada para esta proteína na membrana. Ainda, nada foi observado para a corrida de proteínas totais de hifas. Finalmente, na figura 29D, foi realizado o ensaio para a proteína *Mar-like*, que possui peso molecular predito de 39,64 KDa com peptídeo sinal, no qual observou-se para a corrida de proteínas totais de hifas um arraste iniciando-se abaixo da altura de 50KDa até aproximadamente 30 KDa. Para a corrida das proteínas totais de levedura, foi observado um arraste iniciando-se próximo de 50KDa, seguida da formação de uma banda próxima da altura de 40 KDa e continuando o arraste até aproximadamente a altura de 30 KDa.

Desta forma, com exceção da *Restina-like*, não houve reconhecimento de bandas indicativas das proteínas nativas de *T. asahii*, tanto em leveduras quanto em hifas, sendo necessário a realização de ensaios adicionais padronizados para as demais proteínas.

Figura 29- Ensaios piloto de *Western blot* do reconhecimento das proteínas.



Legenda: A) *Restina-like*
 B) *CFL1-like*
 C) *Beta-like*
 D). *Mar-like*
 H – Hifas
 L - Leveduras

Fonte: Do autor.

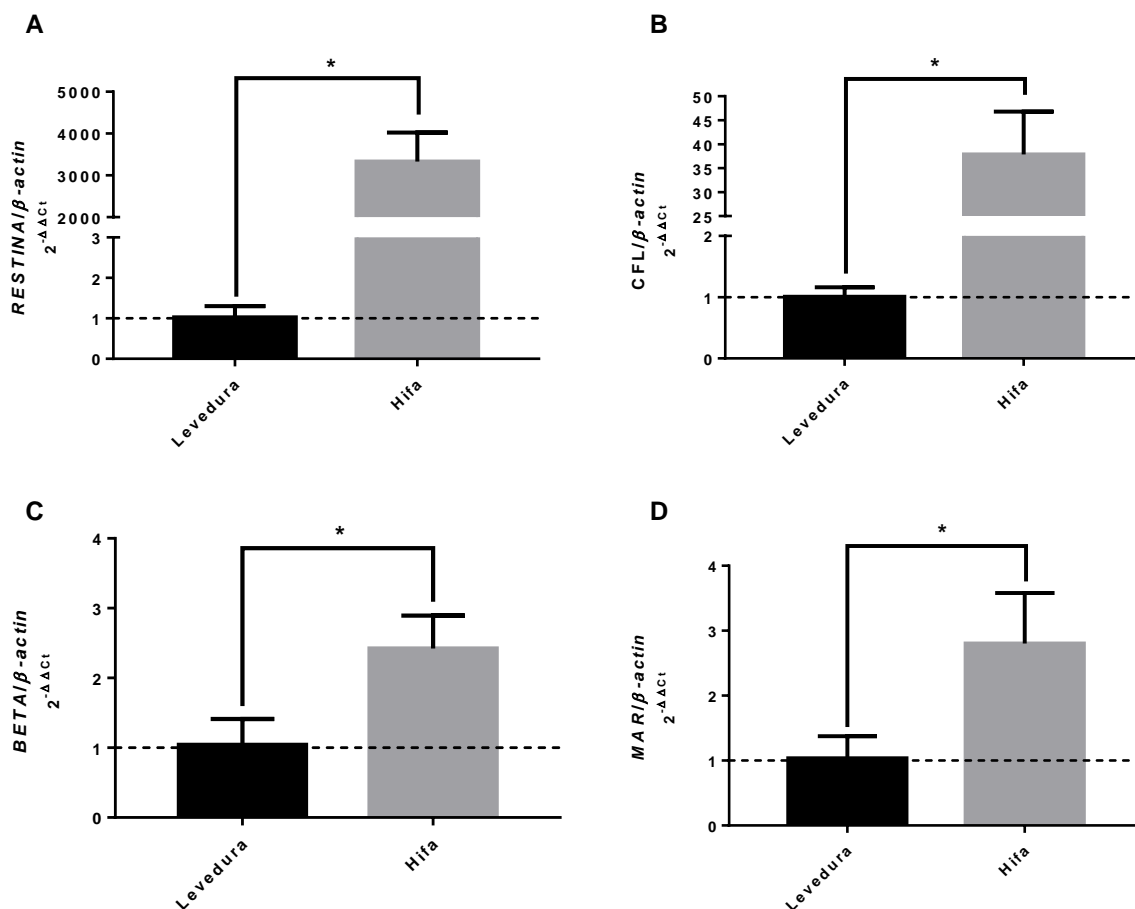
5.6 Avaliação da expressão gênica das quatro adesinas em leveduras e hifas

Para análise da expressão gênica foi estabelecido como critério de comparação as duas morfologias, levedura e hifa, que são encontradas em *T. asahii* CBS 2479.

Através dos dados em triplicata, foi realizada a análise das médias de expressão gênica relativa comparando-se as duas morfologias. Foi demonstrado que para todos os quatro genes analisados houve nível de expressão maior na morfologia de hifa do que na morfologia de leveduras (Figura 30), sendo essas diferenças de expressão estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

O primeiro gene analisado, o da *Restina-like* (Figura 30A), foi expresso 3.285 vezes mais em hifas em relação a leveduras e *CFL-like* foi 37 vezes mais expresso na morfologia de hifas do que na morfologia de leveduras (Figura 30B). Já os genes da *Beta-like* e *Mar-like* (Figuras 30C e 30D), apresentaram níveis de expressão 2,5 vezes maiores em hifas quando comparado com as leveduras. Todas as comparações obtiveram diferenças estatisticamente significativas.

Figura 30- Comparação da expressão gênica em leveduras e hifas de *T. asahii* CBS 2479.



Legenda: A) Restina-like
 B) CFL1-like
 C) Beta-like
 D) Mar-like.

* diferença de expressão gênica estatisticamente significante, $p < 0,05$.

Fonte: Do autor.

5.7 Avaliação do *docking* molecular das quatro adesinas

A análise de *docking* molecular do tipo proteína-proteína feita pelo servidor *online* PatchDock forneceu 20 prováveis modelos tridimensionais de *docking* para cada ensaio realizado entre cada uma das quatro adesinas e as seis proteínas simuladas como ligantes hipotéticos. Entre os modelos apresentados para cada simulação foi escolhido aquele que apresentou o maior valor de *score* entre eles. Assim, o modelo com maior *score* representa o modelo com maior confiança de ligação entre duas proteínas. Durante o processo *in silico* de *docking* é calculada a energia atômica livre

(ACE), sendo esta uma estimativa da energia de dessolvatação entre duas proteínas, para sair do estado de não-ligação para o estado de ligação, de forma que o menor o valor de ACE implica em uma energia de dessolvatação mais baixa e portanto, mais favorável. O valor de ACE é dado em kcal/mol. Outro valor estimado durante o *docking* é o da área total da superfície de ligação entre duas proteínas, sendo os valores apresentados em Å (Ångstroms). Os valores do *score*, da área total de ligação entre os complexos geométricos das topografias das proteínas e o valor de energia atômica livre (ACE) de cada modelo escolhido estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Valores de docking fornecido pelo servidor PatchDock.

	Restina-like			CFL1-like		
	Score	Área (Å)	ACE (kcal/mol)	Score	Área (Å)	ACE (kcal/mol)
Colágeno IV	18.240	3.480,80	-362,63	19.082	2.612,30	317,39
Albumina	18.046	2.838,30	347,58	21.870	3.436,20	414,95
Fibrinogênio	21.426	4.338,50	85,65	16.282	3.569,80	57,11
Fibronectina	17.712	2.790,00	-468,17	19.722	3.041,40	210,06
Hemoglobina	19.762	3.540,70	-0,62	18.100	2.942,50	221,84
Laminina	17.006	3.148,80	-8,4	19.698	2.665,90	19,94
	Beta-like			Mar-like		
	Score	Área (Å)	ACE (kcal/mol)	Score	Área (Å)	ACE (kcal/mol)
Colágeno IV	20.384	2.780,50	191,7	17.696	3.144,20	143,92
Albumina	26.552	4.718,40	-58,03	18.564	4.227,80	460,09
Fibrinogênio	22.162	3.663,10	111,99	17.544	4.136,10	481,5
Fibronectina	19.402	2.679,60	-277,35	18.634	2.984,80	130,37
Hemoglobina	23.366	3.247,30	87,55	18.184	3.335,50	499,32
Laminina	19.356	2.432,70	40,11	18.090	4.523,10	267,41

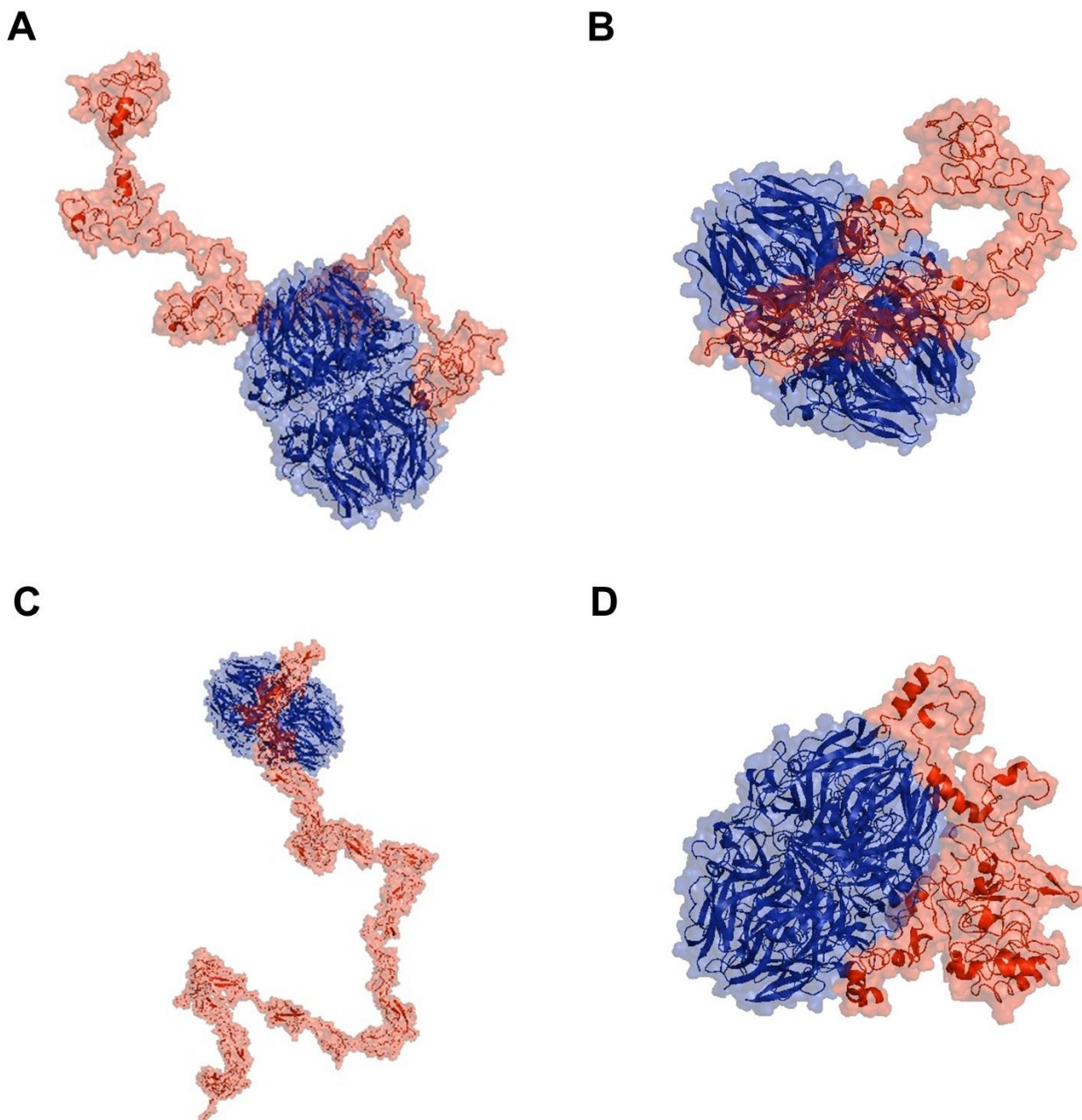
Fonte: do autor.

Para a visualização dos arquivos no formato pdb dos modelos tridimensionais escolhidos para os complexos formados pelo *docking* entre as adesinas e seus ligantes-teste foi utilizado o programa PyMol 1.3, onde pode-se observar os prováveis sítios de ligação das interações existentes entre as proteínas do complexo.

Na figura 31 são mostradas as prováveis ligações ente o Colágeno IV, representado em azul, e as adesinas Restina-like, CFL1-like, Beta-like e Mar-like, representadas em vermelho. É possível notar que os sítios de interação entre os aminoácidos mudam de um complexo para outro.

O Colágeno IV liga-se próximo da região C-terminal da Restina-*like* em sítios contendo estruturas do tipo *coils* (Figura 31A) e possui a maior área de ligação, com 3.480,8 Å e a menor ACE, com -362,63 kcal/mol, sendo esta a melhor interação entre o Colágeno IV e as quatro adesinas. A interação entre CFL1-*like* e o Colágeno IV ocorre nas regiões de *coils* (Figura 31B) tanto da porção N-terminal quanto C-terminal da CFL1-*like*, tendo uma superfície de contato de 2.612,2 Å e uma ACE de 317,39 kcal/mol, sendo a maior ACE entre o Colágeno IV e as quatro adesinas e, portanto, a menos estável. Observa-se para a que a ligação do Colágeno IV com a Beta-*like* acontece próximo à região N-terminal desta em sítios contendo *coils* (Figura 31C), com área de contato de 2.780,5 Å e ACE de 191,7 kcal/mol e a ligação entre o Colágeno IV e a Mar-*like* ocorre tanto na região N-terminal quanto na C-terminal, em sítios contendo α -hélices e *coils* (Figura 31D), apresentando superfície de contato de 3.144,2 Å e ACE de 143,92 kcal/mol.

Figura 31- Representação tridimensional do melhor modelo de *docking* molecular entre Colágeno IV e as adesinas.



Legenda: Colágeno IV em azul
Adesinas em vermelho

A) *Restina-like*

B) *CLF1-like*

C) *Beta-like*

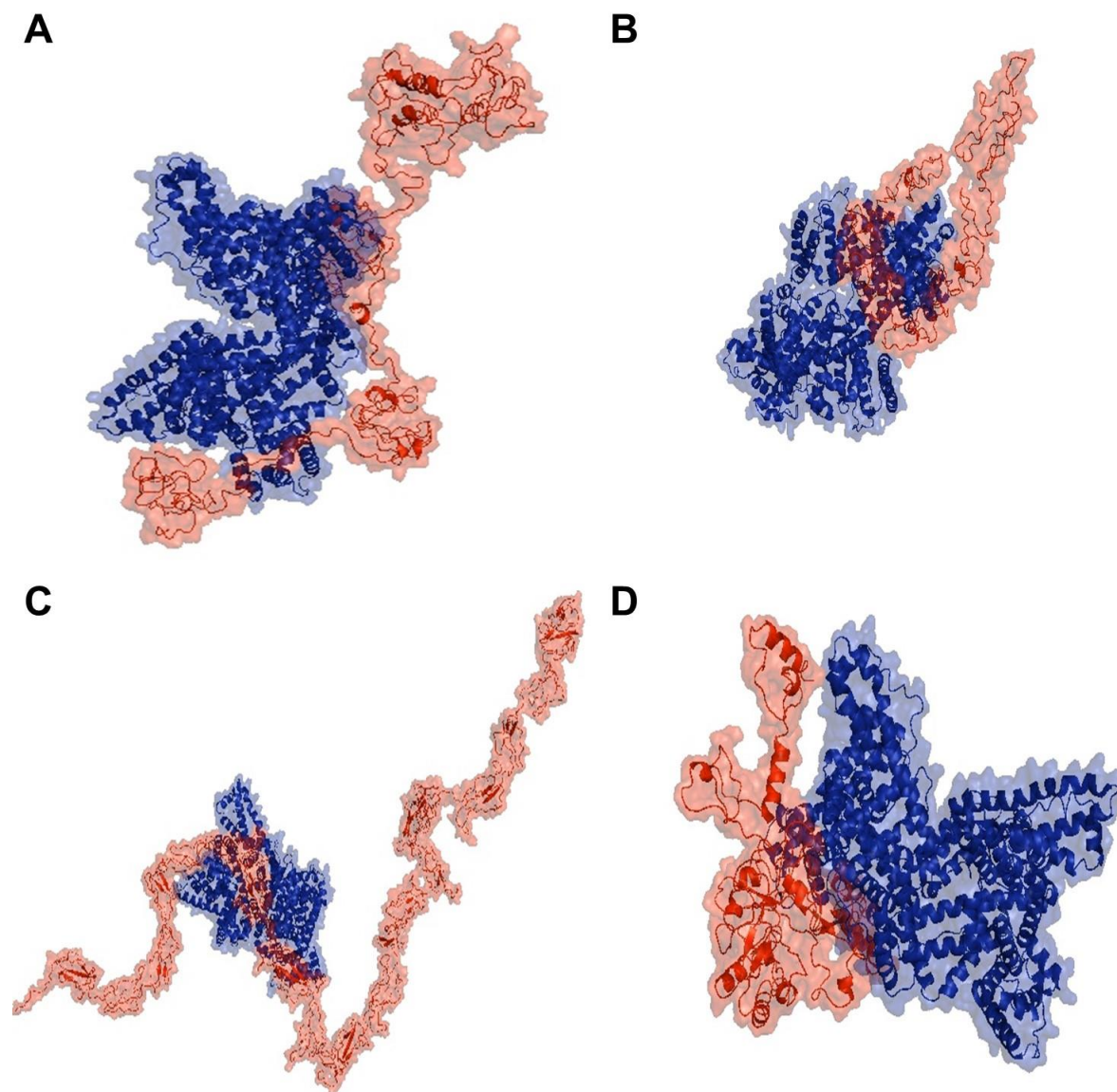
D) *Mar-like*

Fonte: Do autor.

Na figura 32 são mostrados os modelos selecionados das prováveis interações existentes entre a Albumina, representada em azul, e as adesinas Restina-*like*, CFL1-*like*, Beta-*like* e Mar-*like*.

A ligação entre a Restina-*like* e a Albumina acontece na região C-terminal em sítios contendo *coils* (Figura 32A), esta ligação possui superfície de contato de 2.838,3 Å e ACE de 347,58 kcal/mol. A CFL1-*like* se liga à Albumina em sítios localizados na região medial da sequência da proteína, entre as porções N e C-terminal, sendo estes sítios formados por *coils* (Figura 32B), apresentando superfície de contato de 3.433,3 Å e a ACE de 414,95 kcal/mol. A ligação da Beta-*like* com a Albumina acontece na região C-terminal, em sítios contendo *coils* e folhas β -pregueadas (Figura 32C), com superfície de contato entre as proteínas de 4.718,4 Å e ACE de -58,03 kcal/mol, sendo esta a adesina com a melhor ligação com a Albumina. A adesina Mar-*like* se liga à Albumina em sítios contendo *coils* e α -hélices próximos da região C-terminal (Figura 32D), apresentando superfície de contato de 4.227,8 Å e uma ACE de 460,09 kcal/mol.

Figura 32- Representação tridimensional do melhor modelo de *docking* molecular entre Albumina e as adesinas.



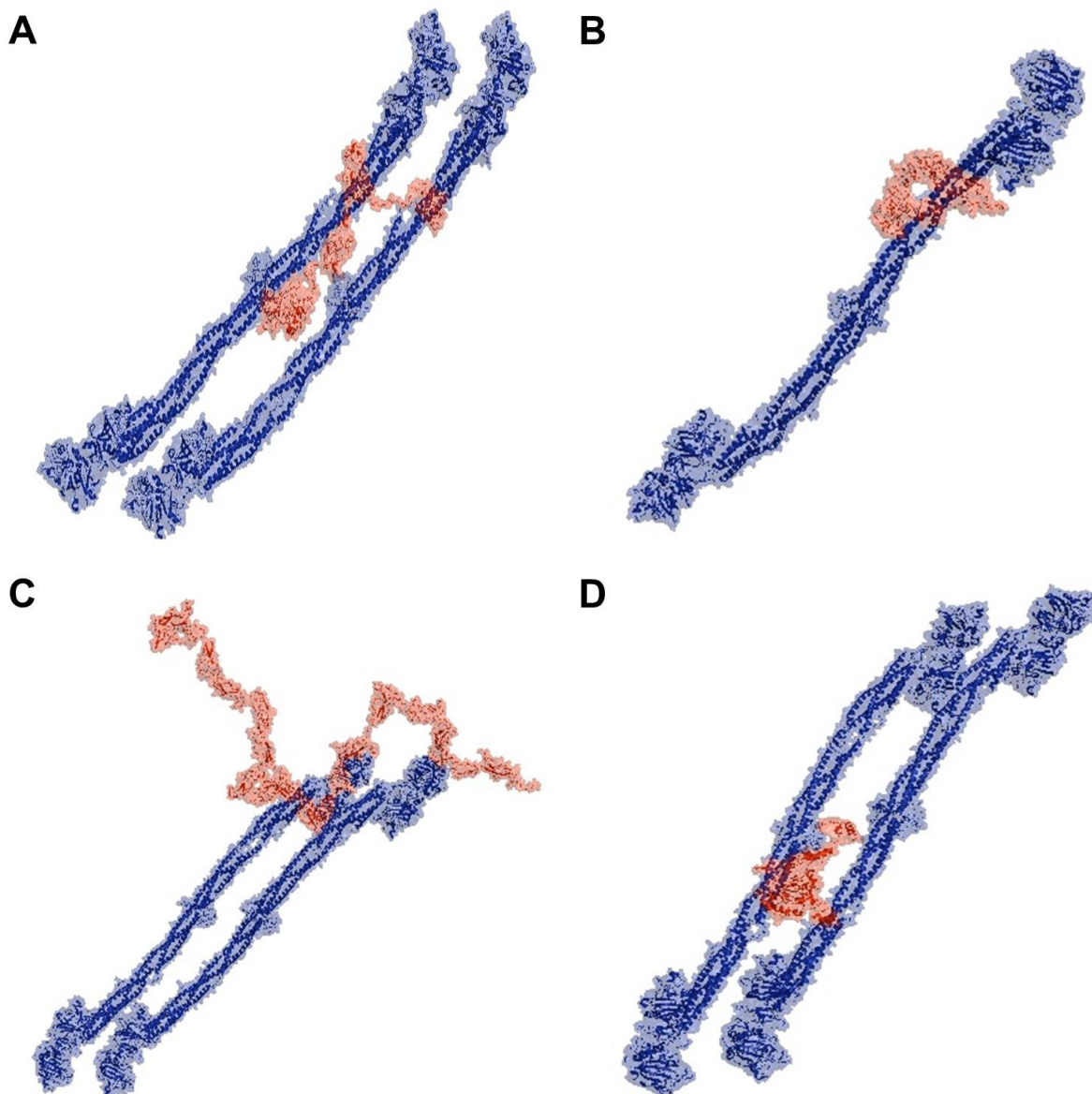
Legenda: Albumina em azul
Adesinas em vermelho
A) Restina-*like*
B) CLF1-*like*
C) Beta-*like*
D) Mar-*like*

Fonte: Do autor.

Na figura 33 estão representados os prováveis modelos de interação entre o Fibrinogênio, em azul, e as proteínas *Restina-like*, *CFL1-like*, *Beta-like* e *Mar-like*.

Pode-se observar que a *Restina-like* faz ligação com duas moléculas de Fibrinogênio através de sítios próximos tanto da região C-terminal quanto da N-terminal, através de estruturas do tipo *coil* (Figura 33A), com superfície de contato de 4.338,5 Å, sendo esta a maior área de ligação entre as adesinas estudadas e o Fibrinogênio, e ACE de 85,65 kcal/mol. A adesina *CFL1-like* se liga a uma molécula de Fibrinogênio por meio de sítios contendo coils situados próximos da região N e C-terminal (Figura 33B), com área de ligação de 3.569,8 Å e ACE de 57,11 kcal/mol, sendo esta a adesina de menor ACE de ligação com o Fibrinogênio. A *Beta-like* se liga a duas moléculas de Fibrinogênio através de sítios localizados na porção medial e na região C-terminal (Figura 33C), com área de contato de 3.663,1 Å e ACE de 111,99 kcal/mol. A adesina *Mar-like* realiza ligação com duas moléculas de Fibrinogênio em sítios contendo *coils* e α -hélices situados na região C-terminal (Figura 33D) e em região medial da estrutura da adesina, apresentando área total de contato de 4.136,1 Å e ACE de 481,5 kcal/mol.

Figura 33- Representação tridimensional do melhor modelo de *docking* molecular entre Fibrinogênio e as adesinas.



Legenda: Fibrinogênio em azul
Adesinas em vermelho

A) Restina-like

B) CLF1-like

C) Beta-like

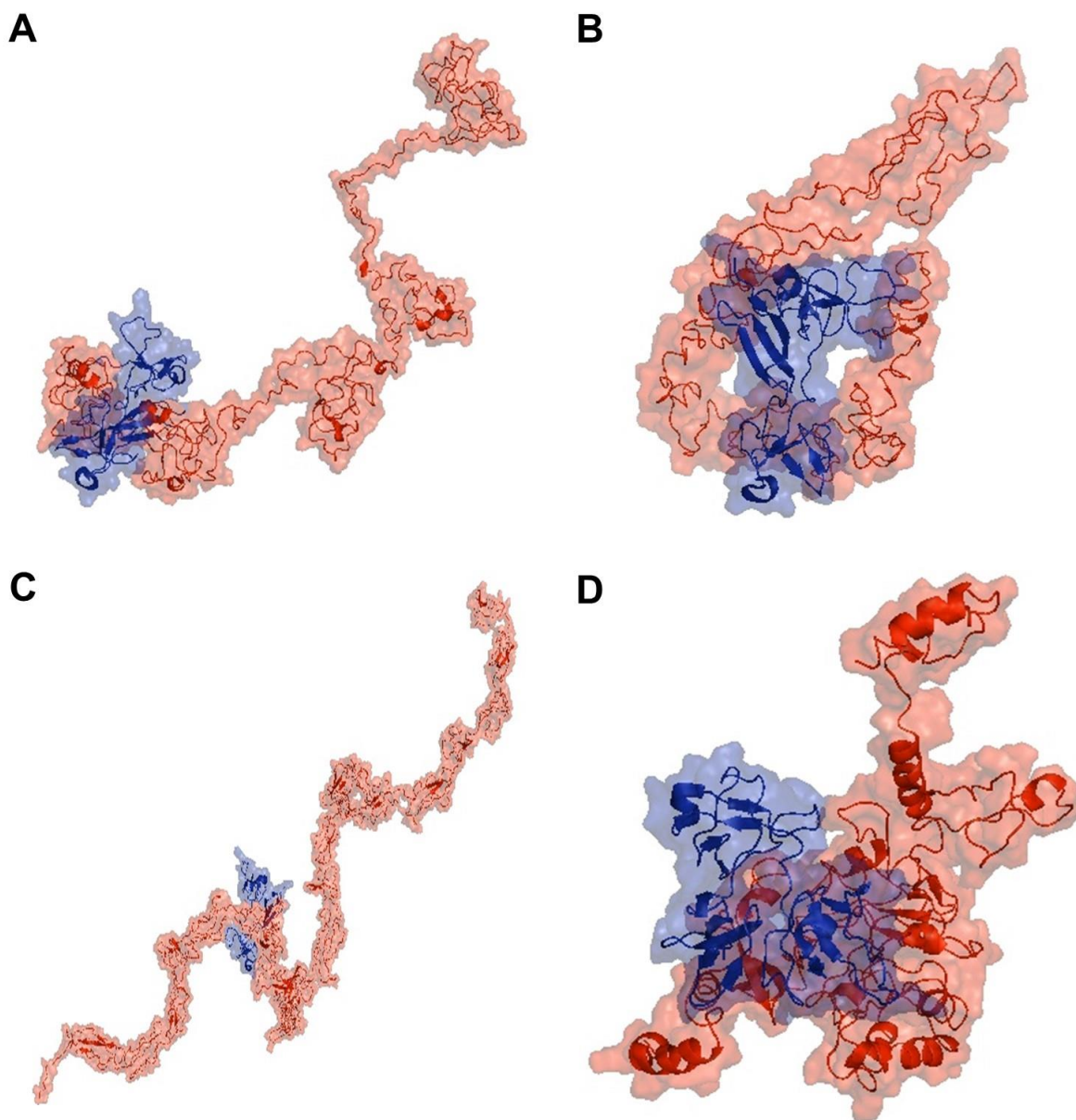
D) Mar-like

Fonte: Do autor.

Os prováveis modelos de interação entre a fibronectina (em azul) e as adesinas Restina-*like*, CFL1-*like*, Beta-*like* e Mar-*like* (em vermelho) estão representadas na Figura 34.

A adesina Restina-*like* se liga à Fibronectina por meio de sítios na região N-terminal contendo *coils* e α -hélice (Figura 34A), apresentando uma superfície de contato de 2.790 Å e uma ACE de -468,17 kcal/mol, sendo a menor ACE de ligação entre as quatro adesinas e a Fibronectina. A CFL1-*like* realiza a ligação com a Fibronectina por meio de sítios localizados na região N e C-terminal bem como na porção medial de sua estrutura (Figura 34B), regiões estas que contêm *coils*, em uma superfície de contato de 3.041,4 Å, sendo a maior superfície de interação das quatro adesinas e a Fibronectina, e uma ACE de 210,06 kcal/mol. A Beta-*like* realiza a ligação com a Fibronectina em sítios da região C-terminal por meio de coils e folhas β -pregueadas (Figura 34C), em uma área de contato de 2.679,6 Å e ACE de -277,35 kcal/mol. A adesina Mar-*like* se liga à Fibronectina por meio de sítio localizado próximo à região C-terminal (Figura 34D), por meio de *coils* e α -hélice, com superfície de contato de 2.984,8 Å e ACE de 130,37 kcal/mol.

Figura 34 - Representação tridimensional do melhor modelo de *docking* molecular entre Fibronectina e as adesinas.



Legenda: Fibronectina em azul
Adesinas em vermelho

A) Restina-like

B) CLF1-like

C) Beta-like

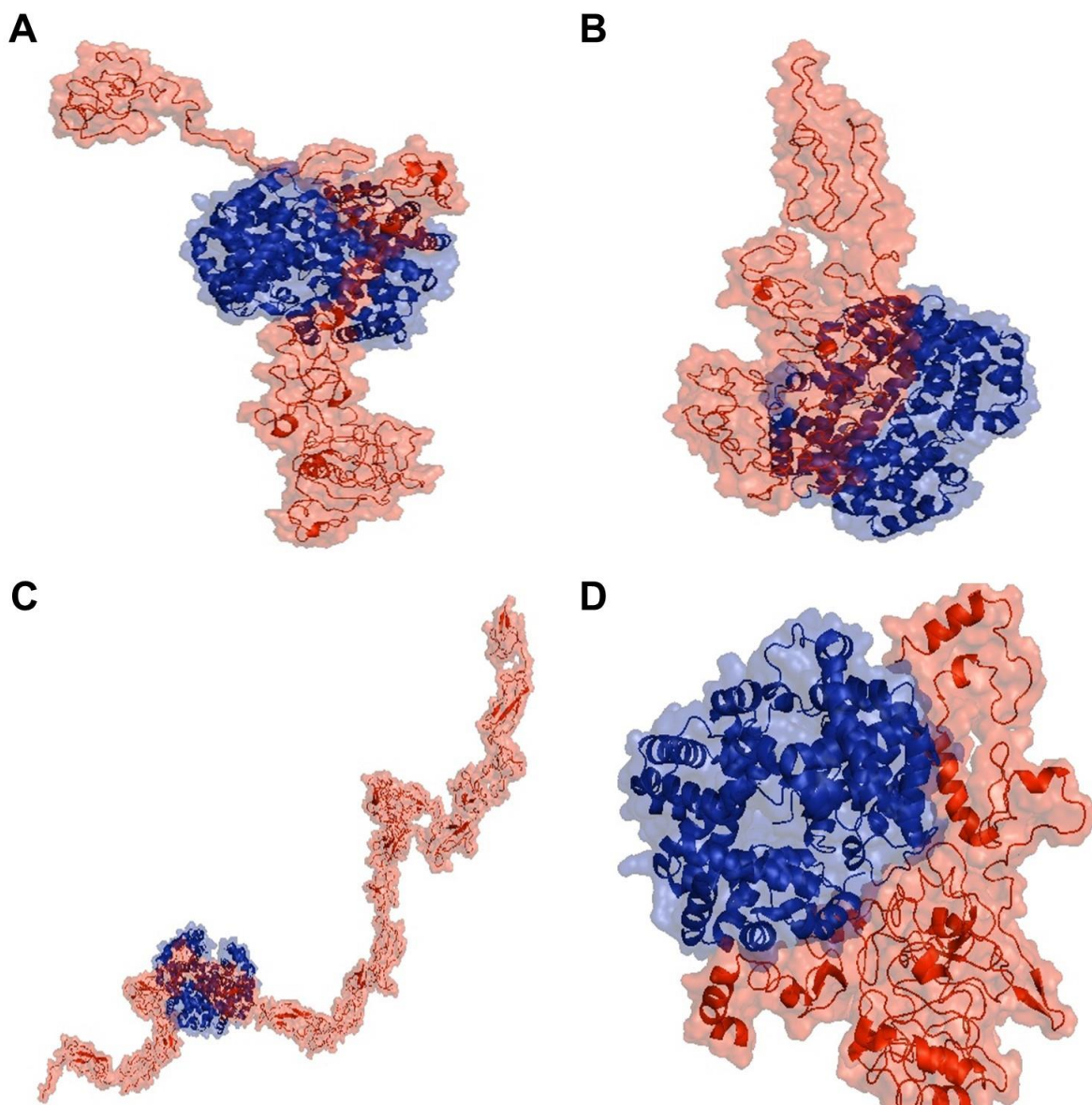
D) Mar-like

Fonte: Do autor.

Na figura 35 estão representadas as prováveis interações entre a proteína Hemoglobina (em azul) e as adesinas *Retina-like*, *CFL1-like*, *Beta-like* e *Mar-like*. Pode-se notar que os sítios de ligação entre os aminoácidos das adesinas e das proteínas mudam de um complexo para outro.

A adesina *Restina-like* faz ligação com a Hemoglobina por meio de sítios localizados na região medial de sua estrutura, através de *coils* (Figura 35A) em uma superfície de contato de 3.540,7 Å e uma ACE de -0,52 kcal/mol, sendo esta adesina a que possui melhor configuração de ligação com a hemoglobina. A *CFL1-like* realiza a ligação com a Hemoglobina em sítios da região medial de sua estrutura, em uma região com *coils* (Figura 35B), apresentando uma superfície de contato de 2.492,5 Å e uma ACE de 221,84 kcal/mol. A adesina *Beta-like* se liga à Hemoglobina por meio de sítios localizados próximos de sua região C-terminal com regiões de *coils* (Figura 35C) e folhas β -pregueadas, apresentando superfície de contato de 3.247,3 Å e uma ACE de 87,55 kcal/mol. A *Mar-like* faz ligação com a Hemoglobina por meio de sítios em suas regiões medial, C e N-terminais, por meio de *coils* e α -hélices (Figura 35D), em uma superfície de contato total de 3.335,5 Å e ACE de 499,32 kcal/mol.

Figura 35- Representação tridimensional do melhor modelo de *docking* molecular entre Hemoglobina e as adesinas.

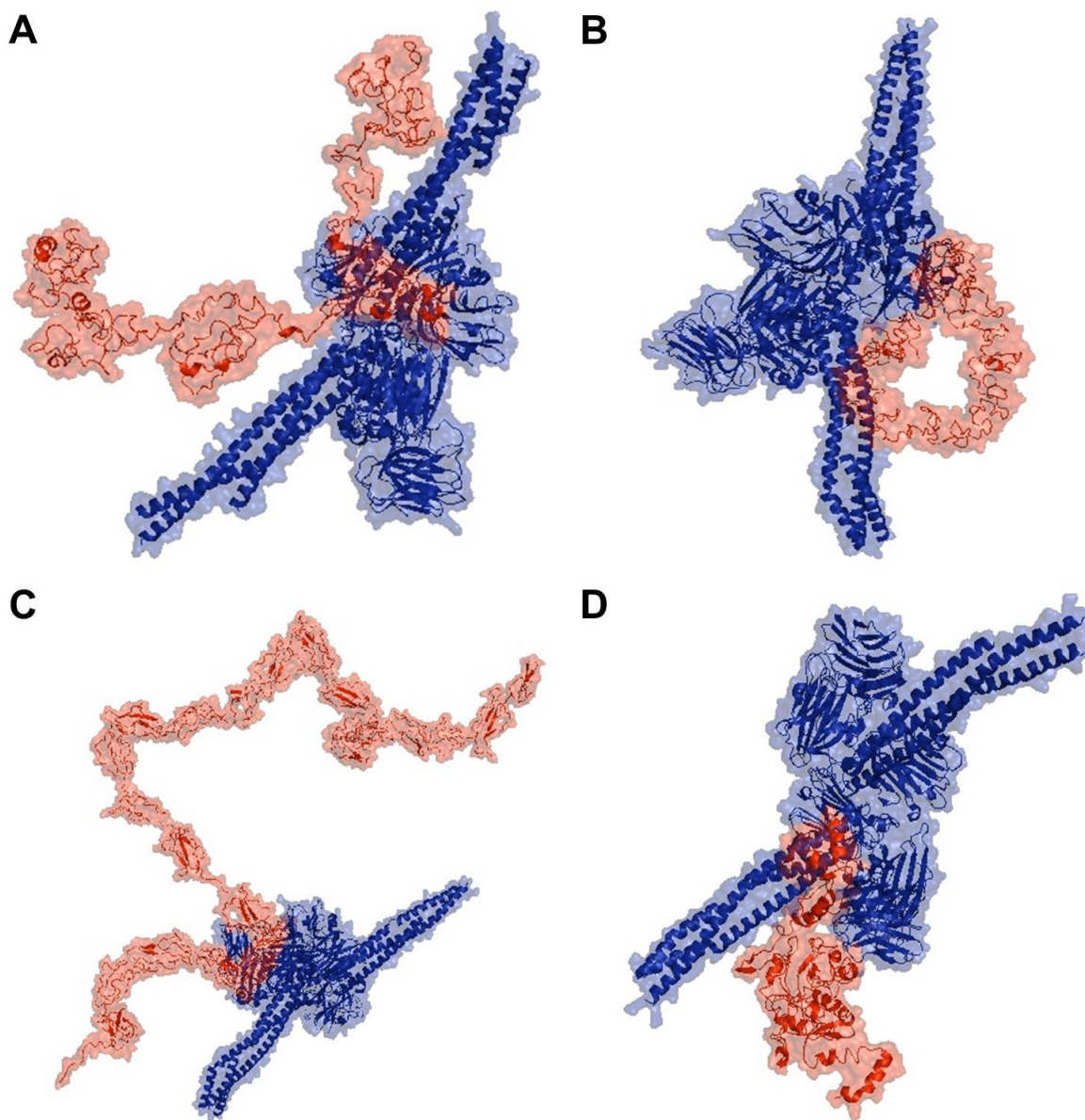


Legenda: Hemoglobina em azul
Adesinas em vermelho
A) Restina-like
B) CLF1-like
C) Beta-like
D) Mar-like
Fonte: Do autor.

As interações entre as adesinas *Restina-like*, *CFL1-like*, *Beta-like* e *Mar-like* e a proteína Laminina estão representadas na figura 36. Os sítios de ligação entre os aminoácidos das adesinas com as proteínas são diferentes entre um complexo e outro.

A adesina *Restina-like* realiza a ligação com a Laminina em sítio localizado na região medial de sua estrutura, por meio de *coils* e α -hélice (Figura 36A), em uma superfície de contato de 3.148,8 Å e uma ACE de -8,4 kcal/mol, sendo esta a menor ACE de ligação entre as adesinas estudadas e a Laminina. A *CFL1-like* se liga à Laminina por meio de sítios em sua região medial e próximos à região C-terminal (Figura 36B), com uma superfície de ligação de 2.665,9 Å e ACE de 19,94 kcal/mol. A *Beta-like* se liga à Laminina através de sítios próximos de sua região C-terminal (Figura 36C) por meio de *coils* e folhas β -pregueadas, com superfície total de contato de 2.432,7 Å e ACE de 40,11 kcal/mol. A adesina *Mar-like* se liga à Laminina por sítios localizados próximos de sua região N-terminal, com *coils* e α -hélices (Figura 36D), em uma superfície de contato de 4.523,1 Å, a maior superfície de contato entre as adesinas estudadas e a Laminina, e ACE de 267,41 kcal/mol.

Figura 36- Representação tridimensional do melhor modelo de *docking* molecular entre Laminina e as adesinas.



Legenda: Laminina em azul
Adesinas em vermelho
A) Restina-*like*
B) CLF1-*like*
C) Beta-*like*
D) Mar-*like*

Fonte: Do autor.

Na tabela 10 pode-se observar os motivos de adesão conservados e os ligantes humanos aos quais se ligam. A proteína *Restina-like* possui dois motivos de adesão conservados, denominados vWA (von Willebrand fator type A) e o motivo da família das Mucinas, sendo que no motivo vWA se liga à Fibronectina e no motivo das Mucinas se ligam a Hemoglobina e a Laminina. A *Mar-like* também possui dois motivos, o BLLF1 (Herpes virus major outer envelope glycoprotein) e o motivo da família das endomucinas, que com exceção da Laminina, todos os outros ligantes estudados se ligam a estes motivos. A proteína *Beta-like* possui somente um motivo de adesão conservado, o BLLF1, que, dos ligantes analisados, somente o Colágeno IV e o Fibrinogênio não se ligam a estes motivos. A *CFL1-like* não possui nenhum motivo de adesão conservado conhecido, porém, como está relacionada à CFL1 de *C. neoformans*, que é uma adesina não-clássica e secretada, a *CFL1-like* de *T. asahii* também pode desempenhar o papel de adesão mesmo sem motivo de adesão conservado conhecido.

Tabela 10 –Ligação entre os motivos de adesão conservados e os ligantes analisados.

	Restina-like		Mar-like		Beta-like	CFL1-like
	vWA	Mucina	BLLF1	Endomucina	BLLF1	Motivos desconhecidos
Albumina	x	x	✓	✓	✓	-
Colágeno IV	x	x	✓	✓	x	-
Fibrinogênio	x	x	✓	✓	x	-
Fibronectina	✓	x	✓	✓	✓	-
Hemoglobina	x	✓	✓	✓	✓	-
Laminina	x	✓	x	x	✓	-

Fonte: do autor.

6 DISCUSSÃO

Trichosporon asahii é um patógeno emergente que tem se destacado pelo alto índice de mortalidade que causa em ambientes hospitalares, principalmente em pacientes imunocomprometidos. A via de infecção em ambientes hospitalares está relacionada a formação de biofilmes nos cateteres dos pacientes. Durante a infecção e formação de biofilmes há a expressão de proteínas na superfície celular, denominadas adesinas, que são responsáveis pela interação entre o patógeno e os tecidos do hospedeiro. Essas proteínas até o momento não foram descritas para *T. asahii* (CHAGAS-NETO; CHAVES e COLOMBO, 2008; DUTTON et al., 2016; FINKEL et al., 2012; PFALLER et al., 2009; SARDI et al., 2014).

É sabido que em outros gêneros de leveduras, as adesinas e outras proteínas extracelulares são diferencialmente expressas pelas leveduras e hifas fúngicas (BAILEY et al., 1996; HOYER et al., 1998; SUNDSTROM, BALISH e ALLEN, 2002; ALMEIDA et al., 2009; BOYCE e ANDRIANOPOULOS, 2015). Como *T. asahii* é capaz de crescer em ambas morfologias, não se conhece como as mesmas interagem com o hospedeiro e tão pouco, quais seus perfis proteicos.

Atualmente, *T. asahii* é uma espécie emergente pois é causador de infecções invasivas com altos índices de mortalidade, principalmente em pacientes imunocomprometidos. Essas infecções têm relação com a capacidade de *T. asahii* formar biofilmes em superfícies abióticas, como cateteres. Para formar biofilmes, *T. asahii* sintetiza proteínas de superfícies denominadas adesinas, sendo estas as responsáveis pela interação entre as células fúngicas com o ambiente e o hospedeiro (PADOVAN et al., 2009; PFALLER et al., 2009; COLOMBO, PADOVAN e CHAVES, 2011; SARDI et al., 2014; DUTTON et al., 2016).

Assim como outros fungos que transitam entre as formas de comensal e patogênico através de modificação de morfologia, *T. asahii* é capaz de crescer em ambas as morfologias. Neste trabalho, a estimulação do crescimento *in vitro* como uma morfologia ou outra foi feito por meio do crescimento de cultura em dois meios diferentes, o RPMI 1640 e o caldo *Sabouraud*.

O meio RPMI 1640 é um meio rico e definido, de pH 7,2 que é próximo ao ideal do sangue humano (pH 7,4) e conforme as especificações dos diversos fabricantes, sendo utilizado para cultura celular, pois possui fonte de carbono, nitrogênio, sais e vitaminas, simulando o ambiente encontrado no corpo humano. A semelhança com o

ambiente encontrado no corpo pode ser o responsável pela estimulação do crescimento da morfologia de hifa de *T. asahii*, visto que este meio também foi utilizado para estimular a filamentação em *C. albicans*, aparecendo nesta morfologia em 44% do total de células após crescimento de 4,5 horas neste meio (NADEEM et al., 2013).

Culturas com mais de 10 dias de cultivo a temperatura ambiente produziram hifas em *T. asahii*, porém inóculos oriundos de uma mesma placa com mais de 10 dias se desenvolvem de forma diferente em meios distintos, de forma que o estresse por exaustão de nutrientes não parece influenciar na filamentação de *T. asahii*, mas sim a estimular. O contrário acontece quando um inóculo é cultivado em caldo *Sabouraud*, que é um meio de cultura de pH 5,6 utilizado para estimular a formação de leveduras, não correspondendo ao pH encontrado no sangue do hospedeiro humano, levantando a hipótese de que esta seja a forma de propagação para esse fungo.

Para analisar a produção das proteínas nas morfologias de leveduras e hifas de *T. asahii* foram feitos extratos proteicos totais de ambas as fases. Esses extratos foram inoculados em camundongos e os anticorpos gerado contra essas proteínas totais foi verificado por ensaio imunoenzimático. O ensaio imunoenzimático demonstrou que houve diferenças no reconhecimento dos anticorpos gerados para as hifas de *T. asahii* contra as proteínas de levedura e nos anticorpos gerados para as leveduras contra as proteínas de hifas. Para outros fungos, por exemplo, as hifas de *C. albicans* possuem maior capacidade de aderência e invasão de tecidos do que as leveduras, sendo que as leveduras ao entrar em contato com o tecido do hospedeiro iniciam o processo de mudança para a fase de hifa, havendo a síntese de diferentes proteínas para cada fase de *C. albicans* (NAGLIK et al., 2006; SUNDSTROM, 2002) O trabalho de proteômica de parede celular de *C. albicans* realizado por Ebanks et al., (2006) demonstrou que existem 5 proteínas que são sintetizadas exclusivamente na fase leveduriforme, 16 proteínas que são sintetizadas exclusivamente na fase de hifa e 10 proteínas que são igualmente sintetizadas nas duas fases. Esses dados também foram corroborados por Martínez-Gomariz et al., (2009) ao realizar a análise proteômica citoplasmática e de parede de leveduras e hifas de *C. albicans*, demonstrando que há pouca diferença na síntese citoplasmática entre as duas fases, mas confirmando a diferença entre as proteínas que são expressas na superfície. Posteriormente, Resende et al., (2011) também encontrou diferenças na síntese de

proteínas nas fases morfológicas de *Paracoccidioides brasiliensis*. Dessa forma pode-se inferir que a maior produção de anticorpos policlonais de *T. asahii* na fase de hifa deve-se a uma diferença na síntese de proteínas nas duas fases, possivelmente tendo maior síntese de proteínas na fase de hifa, podendo ser mais antigênicas do que as que são produzidas na fase de levedura, explicando a maior produção de anticorpos contra proteínas na fase de hifa.

Os dados colhidos demonstram que, além da provável diferença na síntese de proteínas nas diferentes morfologias de *T. asahii*, pode haver síntese de proteínas que são exclusivas na fase hifa de forma que os anticorpos gerados contra hifas não reconhecem a totalidade do extrato proteico de leveduras. Além disso, pode haver síntese de proteínas que são comuns às duas fases, porém, na fase de hifa as proteínas mais imunogênicas são sintetizadas em maior quantidade, o que faz com que os anticorpos gerados contra leveduras tenham reconhecimento equivalente das proteínas do extrato de hifas, mesmo com diluição desses anticorpos. Vale ressaltar que os anticorpos gerados contra hifas reconheceram significativamente menos ($p < 0,05$), cerca de 50% do extrato proteico de leveduras quando comparado ao reconhecimento dos anticorpos gerados contra leveduras utilizado no reconhecimento das proteínas de hifas, enquanto que os anticorpos gerados contra extrato proteico de leveduras reconheceram igualmente as proteínas de hifas quando comparado ao reconhecimento das proteínas de hifas pelos anticorpos gerados contra hifas. Esses achados estão de acordo com o trabalho de Smail e Jones (1984) que haviam mostrado que existem diferenças quantitativas do mesmo antígeno na superfície de leveduras e hifas de *C. albicans*, e com Ollert e Calderone (1990), que mostraram que alguns anticorpos podem agir de forma cruzada com diferentes morfologias de *C. albicans*.

As diferenças encontradas pelo reconhecimento das proteínas totais de leveduras e hifas pelos antissoros sugerem que existe diferença na quantidade de anticorpos que foram produzidos. Embora não apresentando diferença estatisticamente significativa entre as taxas de queda da afinidade desses anticorpos, utilizando a mesma concentração de ureia como agente caotrópico, houve diferença quando utilizou-se diferentes concentrações, sugerindo que os anticorpos produzidos contra proteínas totais de hifas possuem maior força de ligação com as proteínas totais de leveduras e de hifas do que os anticorpos gerados contra as proteínas totais de leveduras.

Pelos resultados encontrados, presume-se que as proteínas de hifas conseguem gerar maior produção de IgG totais em modelo murino. Os trabalhos de Paulovičová e colaboradores (2013, 2016) demonstraram em modelo murino que há maior produção de IgG contra proteínas de hifas de *C. albicans* do que contra proteínas de leveduras. Proteínas de superfície em leveduras e hifas de *C. albicans* podem indicar diferenças morfológicas para o sistema imune do hospedeiro (JACOBSEN et al., 2012). Altos níveis de IgG também foram encontrados para a forma micelial de *Malassezia* sp (ASHBEE e EVANS, 2002) e houve produção diferencial de IgG em modelo murino para hifas e conídios de *Aspergillus fumigatus* (RIVERA et al., 2005).

Esses dados em conjunto com os encontrados por este trabalho apontam para a possibilidade de que o sistema imunológico possa diferenciar as morfologias de leveduras e hifas de *T. asahii* produzindo anticorpos específicos para uma forma ou outra.

Os anticorpos gerados contra proteínas de hifas e leveduras foram utilizados para realização de ensaios de microscopia de imunofluorescência. As lâminas, ao serem observadas no microscópio, mostraram que houve reconhecimento dos anticorpos policlonais produzidos em modelo murino contra as proteínas das formas de levedura e hifa de *T. asahii*. Esse reconhecimento aconteceu tanto com os anticorpos produzidos a partir do extrato proteico de leveduras contra as formas de levedura, como pelos anticorpos produzidos a partir do extrato proteico de hifas contra as formas de hifa. O mesmo foi observado quando foi feito ensaio de microscopia com os anticorpos produzidos com extrato proteico de leveduras contra as formas de hifas e pelos anticorpos produzidos com extrato proteico de hifas contra as formas de levedura. Dessa forma demonstrou-se que os anticorpos possuem alto poder de reconhecimento tanto para a morfologia para os quais foram gerados quanto para as morfologias contrárias aos quais foram gerados conforme visto em trabalhos anteriores em *Candida* spp., em que anticorpos produzidos contra proteínas encontradas em uma morfologia apresentaram reatividade cruzada na morfologia contrária para os quais foram produzidos (OLLERT e CALDERONE, 1990; KANBE et al., 1991; GALE et al., 2001) . Quanto aos diferentes tratamentos pelos quais as células passaram, de permeabilização ou não permeabilização, não foi possível observar nenhuma diferença de maior ou menor reconhecimento. A ausência de diferença visual na imunofluorescência das células fixadas em lâminas pode ser

devido ao fato de que a microscopia de imunofluorescência convencional produz apenas imagens em duas dimensões, não sendo possível observar se houve penetração ou não de anticorpos no interior das células, impossibilitando a quantificação visual do reconhecimento dos anticorpos para as formas morfológicas de *T. asahii* ou a localização dos anticorpos na estrutura da célula.

Em estudo prévio do laboratório (JESUS, 2018), foram identificadas quatro possíveis adesinas de *T. asahii* CBS 2479, as quais foram denominadas de *Restina-like*, *CFL1-like*, *Beta-like* e *Mar-like*. Com base nas sequências dessas quatro adesinas, o próximo passo do estudo foi realizar a modelagem tridimensional das proteínas com potencial de serem expressas na superfície de *T. asahii* como adesinas. Foi realizada uma busca no banco de dados NCBI utilizando o algoritmo PSI-BLAST para encontrar *templates* com similaridade significativa com as proteínas de interesse para realizar modelagem por homologia.

O algoritmo PSI-BLAST pontua as correspondências encontradas no alinhamento múltiplo de pares entre a sequência base e as sequências consultadas no banco de dados selecionado, de forma a utilizar o padrão de conservação do alinhamento como uma matriz de pontuação específica (*PSSM- position-specific scoring matrice*). O PSI-BLAST pesquisa repetidamente o banco de dados selecionado utilizando o alinhamento múltiplo de pares que obteve alta pontuação encontrado em cada pesquisa para gerar um novo PSSM que será utilizado na próxima pesquisa, até que nenhuma nova sequência seja encontrada. O PSI-BLAST é capaz de encontrar similaridades entre sequências distantes ao combinar as informações de conservação encontradas em uma sequência relacionando-as em uma única matriz de pontuação, de forma a reconhecer estruturas tridimensionais de proteínas que estão conservadas mesmo após a perda de sua similaridade entre as sequências de aminoácidos (ALTSCHUL et al., 1997; SCHAFFER, 2001; BHAGWAT e ARAVIND, 2007).

A modelagem por homologia baseia-se em prever a estrutura tridimensional de uma dada proteína ao comparar sua sequência com estruturas tridimensionais de uma ou mais proteínas conhecidas homólogas. Porém, conforme trabalho de Kopp e Schwede (2004) de comparação de métodos de modelagem por homologia, e de Fiser e Šali, (2003) quando a identidade entre os *templates* de proteínas conhecidas e a sequência da proteína a ser modelada é menor do que 40% a modelagem não é confiável por existirem lacunas no alinhamento, que de acordo com Fiser et al. (2000),

essas lacunas devem ser construídas sem um guia no *template*, tornando difícil a predição da conformação estrutural da proteína, de forma que quanto maior o número de lacunas, menor será o grau de confiança no modelo produzido. No presente estudo, as buscas por *templates* para as 4 proteínas não retornaram bons candidatos pois para todas elas, foram encontradas poucas proteínas depositadas no Protein Data Bank <<https://www.rcsb.org/>> com mais de 40% de cobertura e similaridade.

Nesse caso, optou-se por utilizar a modelagem com abordagem *ab initio*, na qual são calculadas as posições dos átomos na estrutura da proteína, com base nas interações energéticas entre eles. Esse tipo de abordagem é a mais indicada para casos em que existe grande número de lacunas no alinhamento dos *templates* (KOPP e SCHWEDE, 2004). Para a modelagem *ab initio* foi utilizado o servidor on-line I-Tasser. A escolha do melhor modelo foi baseada na pontuação do C-score de cada um dos modelos enviados por proteína. Esse escore estima a qualidade dos modelos preditos pelo I-Tasser, sendo calculado com base na significância dos alinhamentos das sequências e na convergência das simulações de montagem de estruturas terciárias tridimensionais. Dessa maneira modelos com maior C-score representam modelos com maior confiança de terem a estrutura representada (ZHANG, 2008; ROY, KUCUKURAL e ZHANG, 2010; YANG *et al.*, 2014).

A Restin-*like* apresentou uma forma com algumas α -hélices e muitos *coils*, ao contrário da CFL1-*like* que apresentou algumas folhas beta e muitos *coils*, enquanto a estrutura da Beta-*like* é rica em folhas beta e a estrutura da Mar-*like* é rica em alfa-hélices. As α -hélices são os elementos da estrutura secundária mais comuns pois são a estrutura mais simples que a cadeia de aminoácidos pode assumir maximizando o uso das ligações de hidrogênio, tornando essa estrutura altamente estabilizada. Na alfa-hélice os grupos R dos aminoácidos são orientados para fora da hélice, sendo cada volta formada por cerca de 3,6 resíduos de aminoácidos e cada volta separa por 5,4 Å. Essa estrutura confere rigidez e estabilidade à proteína, como no caso da queratina, que é rica em α -hélices. Essa estrutura se distende quando aquecida. A presença de alguns aminoácidos pode afetar a formação da alfa-hélice. Muitos resíduos de Glu, Lys, Arg, Asp, Ser, Thr, Cys, Pro e Gly podem desestabilizar uma alfa-hélice impedindo sua formação (LEHNINGER, 2014).

Nas folhas β -pregueadas a estrutura dos aminoácidos está na forma de zigue-zague onde as ligações de hidrogênio são formadas entre os segmentos adjacentes da cadeia de aminoácidos dentro da folha. As cadeias de aminoácidos podem ser

tanto paralelas ou antiparalelas de forma a apresentar a orientação C-terminal igual ou oposta. Essa conformação dá à estrutura uma conformação micro-cristalina de resistência de forma que a proteína não se distende quando aquecida (LEHNINGER, 2014).

Outras proteínas já tiveram suas estruturas preditas pelo servidor I-Tasser, com diferentes objetivos, como proteínas voltadas para vacinas montadas a partir de *Escherichia coli* (NAZARIAN *et al.*, 2012), receptores de superfície celular em humanos (ZHANG *et al.*, 2015), enzima bacteriana de *Enterococcus faecalis* (UCHIYAMA *et al.*, 2011) e fatores tumorais humanos (ROY *et al.*, 2012).

Ainda que as modelagens *ab initio* sejam baseadas em cálculos matemáticos revelando estruturas tridimensionais hipotéticas, esses modelos possuem acurácia quanto a estrutura real da proteína, como pode ser mostrado no trabalho de Yang e colaboradores (2014) no qual foram realizados ensaios de modelagem utilizando o servidor I-Tasser para proteínas de *Bacterioides thetaiotaomicron* (pdb 4e0e), *E. coli* (pdb 4hg0 e 4qvt), *Burkholderia cenocepacia* (pdb 4qhq) e *Staphylococcus aureus* (4qf4) e comparadas com os modelos feitos por raio-x das estruturas cristalinas dessas proteínas, demonstrando a compatibilidade entre os modelos

Já no trabalho de Zhang e colaboradores (2016) foi realizada uma análise de comparação entre os modelos tridimensionais de proteínas feitos pelo I-Tasser e pelo servidor QUARK com modelos tridimensionais feitos por raio-x das estruturas cristalinas das proteínas e por NMR (*Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*), demonstrando que os modelos feitos pelo I-Tasser possuem maior compatibilidade estrutural com os modelos reais das proteínas analisadas

Embora as estruturas das proteínas tenham sido determinadas por modelos probabilísticos, as mesmas são importantes para início de caracterização molecular de proteínas de superfície que até o momento, não foram descritas para *T. asahii*, visto que esse tipo estrutura, em estudos anteriores, tem se mostrado compatível com aquelas sintetizadas *in vivo*.

Com a finalidade de estudar se essas proteínas preditas como adesinas de superfície de *T. asahii* de fato são sintetizadas pela célula fúngica, e se em ambas as morfologias, ou de forma diferencial, foi realizado estudo de epítomos com potencial imunogênico para realização futura de ensaios de localização celular por microscopia de imunofluorescência.

Assim, sendo, a partir da sequência de cada uma das proteínas foi feita a predição dos peptídeos com potencial de ligação ao MHC classe II pela ferramenta TepiTool, que faz predição dos peptídeos ligadores promíscuos num *set* de 27 alelos mais comuns de MHC classe II, que cobre 94% da população mundial de humanos. Essa ferramenta quebra a sequência de aminoácidos da proteína em peptídeos que possuem alta afinidade pelos alelos do MHC classe II (ZHANG et al., 2008; GREENBAUM, 2013; PAUL et al., 2016; FLERI et al., 2017). Foram obtidos 218 peptídeos imunogênicos ao todo, sendo 32 peptídeos para *Restina-like*, 12 peptídeos para *CFL1-like*, 165 peptídeos para *Beta-like* e 9 peptídeos para *Mar-like*.

Os peptídeos que possuíam potencial de reconhecimento pelos alelos do MHC classe II foram analisados pelo software Vaxijen 2.0, que mostra a probabilidade da imunogenicidade do antígeno e a indicação do *status* do antígeno como provável antígeno ou provável não antígeno Doytchinova e Flower (2008). A previsão do VaxiJen, conforme descrito por Flower e colaboradores (2010), possui acurácia de predição entre 78% e 97% de eficiência para antígenos de fungos. Foram selecionados peptídeos que tivessem ao mesmo tempo maior escore de imunogenicidade e reconhecido pelo maior número de alelos, tendo sido selecionados peptídeos próximos a porção N-terminal das proteínas, visto que nessa região encontra-se o peptídeo sinal de endereçamento proteico, que mostra que essas proteínas cumprem seu papel biológico em local diferente de onde foram geradas.

Todos os peptídeos selecionados para serem sintetizados possuem o tamanho de 15 resíduos de aminoácidos, pois segundo Moore e Grant (2012), peptídeos com tamanho entre 10 e 15 resíduos de aminoácidos são os mais recomendados para a produção de anticorpos, pois acima deste tamanho são mais difíceis e caros para serem produzidos.

A utilização de peptídeos sintéticos que mimetizam epítomos de proteínas antigênicas possui diversas vantagens, tais como a facilidade de transporte e de armazenamento, não possuem risco de causar infecções, possuem alto nível de reprodutibilidade, além de terem baixos níveis de reações inespecíficas (GOMARA e HARO, 2007).

A abordagem *in silico* para determinar peptídeos de proteínas fúngicas que possuem propriedades antigênicas também foi utilizado para *C. neoformans*, conforme demonstrado por Martins e colaboradores (2013). Peptídeos sintéticos tem se mostrado eficientes na produção de anticorpos capazes de reconhecerem

proteínas específicas de microrganismos patogênicos, como tem sido observado em diversos trabalhos. Viudes, Perea e Lopez-Ribot (2011) utilizaram um peptídeo da proteína de parede mp58 de *C. albicans* para inocular camundongos para produção de anticorpos específicos para este peptídeo afim de detectarem a proteína em imunoenaios. No trabalho de Caldini e colaboradores (2012) peptídeos sintetizados a partir da sequência da gp75 de *P. brasiliensis* e inoculados em camundongos isogênicos foram capazes de produzir anticorpos que conseguiram se ligar à esta proteína em imunoenaios.

Em um trabalho de 2011, Diaz-Arevalo e colaboradores também encontraram altos índices de IgG em animais que foram imunizados com peptídeos sintéticos produzidos a partir de sequências de Asp f3 de *Aspergillus fumigatus*, e Bär e colaboradores (2012) demonstraram que peptídeos sintéticos derivados de sequências de proteínas Als são capazes de serem reconhecidos por alelos de MHC classe II.

Esses dados mostram que peptídeos selecionados por meio de ferramentas *in silico* e inoculados em modelo murino possuem alta capacidade de gerar resposta imune humoral por parte do organismo imunizado com esses peptídeos, gerando anticorpos policlonais que possuem a capacidade de se ligarem às proteínas a partir das quais tiveram sua sequência retirada.

Esses anticorpos possuem capacidade de serem utilizados para realizar a localização de proteínas específicas em diferentes morfologias de células fúngicas, incluindo proteínas que estejam localizadas na superfície.

Como demonstrado por Marín e colaboradores (2015), anticorpos policlonais foram capazes de identificar proteínas séricas na superfície de células fúngicas quando utilizaram anticorpos policlonais anti-Fator B humano para identificar essa proteína por microscopia de fluorescência confocal na superfície de leveduras e hifas de *C. albicans* sensibilizadas com antissoro humano.

Diaz-Arevalo *et al.* (2011) também utilizaram com sucesso anticorpos policlonais oriundos da imunização de coelhos por peptídeos sintéticos oriundos da sequência peptídica da proteína Asp f3 de *A. fumigatus* para realizar a localização celular por fluorescência desta proteína em conídios e hifas deste fungo.

No trabalho de Urban e colaboradores (2005), foram utilizados anticorpos policlonais obtidos a partir da inoculação de peptídeos sintéticos em coelhos para

realizar a localização celular de Tsa1p em leveduras e hifas de *C. albicans* com sucesso.

Na avaliação da localização das proteínas com papel putativo de adesinas em *T. asahii*, os anticorpos policlonais sintetizados a partir de sequências de aminoácidos preditos *in silico* com capacidade imunogênica demonstraram ter poder de reconhecimento destas proteínas, como pode ser observado nos ensaios de microscopia de fluorescência confocal realizado em leveduras e hifas de *T. asahii* sensibilizadas com esses anticorpos.

Nas leveduras de *T. asahii* foi observado que os anticorpos gerados contra os peptídeos imunogênicos das proteínas Restina-*like* e CFL-*like* mostraram haver pouca presença destas proteínas, e de forma difusa, na superfície celular, sem apresentar um padrão de localização. Já para as proteínas Beta-*like* e Mar-*like* foi observado que os anticorpos reconheceram mais a presença destas proteínas na superfície das leveduras, destacando a maior concentração de Mar-*like* em comparação com as outras três proteínas analisadas.

As análises das microscopias de imunofluorescência nas hifas de *T. asahii* demonstraram que as adesinas se encontram uniformemente distribuídas por toda a superfície desta morfologia, com intensidade semelhante a cada uma delas, com exceção de CFL1-*like* que demonstrou ser menos reconhecida pelos anticorpos gerados contra os peptídeos desta proteína, podendo supor que a mesma não se encontra em níveis significativos na superfície celular ou que seu peptídeo na forma nativa não esteja sendo eficientemente reconhecido, uma vez que na proteína nativa, a conformação e o acesso ao peptídeo de forma linear pode estar prejudicada.

Concomitantemente, foi realizada tentativa de verificar se os anticorpos gerados contra os peptídeos sintéticos reconheceriam as proteínas hipotéticas nativas por meio de um ensaio piloto de *Western blot*. Contudo, o ensaio piloto não trouxe conclusões definitivas a respeito da eficácia de reconhecimento das adesinas nativas pelos anticorpos gerados contra peptídeos sintéticos para cada uma das quatro adesinas. Assim sendo, outros ensaios devem ser realizados a fim de refinar a técnica para que resultados definitivos possam ser gerados.

Nas análises das imagens de imunofluorescência, a marcação fraca e descontínua das quatro proteínas (Restina-*like*, CFL1-*like*, Beta-*like* e Mar-*like*) em leveduras e hifas pode ter ocorrido devido a um escape da emissão da luz azul sobre a coloração verde durante a microscopia confocal, visto que em uma determinada

faixa a emissão para ambas as cores se sobrepõe, de forma que o estudo das adesinas por meio desta técnica também deve ser aprofundado.

A análise da expressão gênica das quatro adesinas putativas em leveduras e hifas de *T. asahii* evidenciou que todas são mais expressas em hifas do que em leveduras. Essa diferença de expressão entre as duas morfologias mostrou ser ter diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Os maiores níveis de expressão foram mostrados pela proteína CFL1-*like*, que segundo Wang *et al.* (2012), em *C. neoformans* é responsável pelo processo de filamentação durante o processo de *mating*, sendo altamente expresso em hifas. Ao ser sintetizada, a CFL1p é clivada e secretada para a matriz extracelular agindo de forma parácrina com as outras células de *C. neoformans* induzindo-as à filamentação. Pela proximidade filogenética entre *T. asahii* e *C. neoformans* pode-se especular que a CFL1-*like* de *T. asahii* possua papel semelhante, de forma que é expressa 37 vezes mais nas hifas de *T. asahii* em relação às leveduras.

A proteína Restina-*like* também apresentou altos níveis de expressão em comparação aos níveis apresentados por leveduras de *T. asahii*. Porém, mesmo não havendo proteínas descritas em outros fungos que possuam correlação com esta proteína, sabe-se que em outros fungos, algumas adesinas são altamente expressas em hifas, a exemplo da Hwp1p em *C. albicans*, como demonstrado por Nobile *et al.*, (2009), levantando a possibilidade de que Restina-*like* possua papel na filamentação em *T. asahii*.

Beta-*like* e Mar-*like* tiveram maior expressão em hifas, e mesmo com diferença estatisticamente significativa, não apresentaram níveis tão altos quanto os apresentados pelas duas adesinas anteriores. Também não existem proteínas relacionadas descritas em outros fungos, porém, estudos de caso tem demonstrado que as formas de hifa são altamente encontradas em cortes histológicos em pacientes acometidos por tricomonose invasiva (EBRIGHT *et al.*, 2001; GHIASIAN, MAGHSOOD e MIRHENDI, 2001; PASSO *et al.*, 2006) de forma que estas duas proteínas também possam ter papel na filamentação para invasão tecidual.

Processos biológicos que medeiam a interação célula-célula envolvem interações do tipo proteína-proteína. Proteínas de superfície fúngica que atuam como adesinas interagem com o hospedeiro ao ligarem-se à outras proteínas presentes na superfície das células do hospedeiro, como alguns trabalhos tem demonstrado.

Marcos e colaboradores (2012) demonstraram que uma enolase com função de adesina em *P. brasiliensis* tem capacidade de ligação com laminina, fibronectina, colágeno tipo IV, plasminogênio e fibrinogênio, reforçando dados encontrados por Gonzales et al. (2005), Donofrio et al. (2009) e Nogueira et al. (2010). Trabalhos com as adesinas da família ALS de *C. albicans* demonstraram que essas adesinas também se ligam com fibronectina, fibrinogênio, laminina e colágeno tipo IV (GAUR et al., 2002; GAUR e KLOTZ, 2004, SHEPPARD et al., 2004; PHAN et al., 2007; LI e FILLER, 2011).

Dessa maneira levantou-se a possibilidade de que as adesinas de *T. asahii* também poderiam interagir com proteínas do hospedeiro. Dessa maneira foi realizado um estudo de *docking* molecular para melhor compreender a interface dos complexos proteína-proteína entre as quatro adesinas putativas de *T. asahii* e as proteínas humanas albumina, colágeno tipo IV, fibrinogênio, fibronectina, hemoglobina e laminina.

Todas as quatro adesinas analisadas no ensaio de *docking* molecular apresentaram pontos de ligação entre sua estrutura tridimensional predita por ferramentas *in silico* e a estrutura tridimensional das proteínas humanas obtidas por meio de cristalografia de raios-x. Os dados obtidos durante esse ensaio mostraram interação hipotética entre as adesinas e seus prováveis ligantes nas células humanas.

Esse tipo de abordagem de predição da interação de ligações entre proteínas de superfície e outras moléculas, incluindo interações do tipo proteína-proteína, também foi realizada para outros fungos. Phang e colaboradores (2007) realizaram um estudo de *docking* entre Als3 de *C. albicans* e caderinas humanas, mostrando estruturalmente a ligação entre as duas proteínas. Ranke et al. (2018) também realizaram análises de *docking* por abordagem *in silico* com proteínas da família ALS de *C. albicans* com o ácido arginilglicilaspártico (RGD). O RGD é o motivo peptídico mais comum responsável pela adesão celular à matriz extracelular (ECM), sendo encontrado em diversas proteínas que fazem parte da ECM, incluindo o fibrinogênio e a fibronectina (PLOW et al., 2000)

Em 2014 foi feito um estudo de *docking* por Gebremariam e colaboradores com proteínas CotH2p e CotH3p de *Rhizopus oryzae*, causador de mucormicose, com a proteína humana GRP78p, demonstrando a função dessas proteínas na invasão celular durante a patogenia do fungo. Mosca et al. (2009) realizaram análise de

docking de proteínas de *Saccharomyces cerevisiae* com diversas proteínas preditas em seu genoma para melhor compreensão de seu interatoma.

Schneidman-Duhovny, Nussinov e Wolfsson (2004) já haviam realizado análises de comparação entre o *docking* realizado pelo Patchdock e o realizado por diversos algoritmos que utilizam a abordagem de complementariedade de formas, oriundos de diferentes servidores, tais como o DOCK, PPD e QSDock, concluíram que o algoritmo desenvolvido para o servidor Patchdock possuía resultados confiáveis de *docking* por complementariedade molecular.

A ampla utilização de *docking* molecular para prever a ligação de proteínas de superfície fúngicas com ligantes celulares humanos embasa a possibilidade de que os resultados obtidos *in silico*, pelo *docking* realizado através do servidor Patchdock, corresponde à ligação *in vivo* entre as adesinas putativas de *T. asahii* e ligantes de células humanas.

Espera-se que os dados levantados durante este trabalho possam contribuir para o aumento no conhecimento da interação entre o patógeno emergente *T. asahii* e seu hospedeiro humano, de forma que novos tratamentos possam surgir para combater os diferentes tipos de infecções causadas por este fungo.

7 CONCLUSÕES

1 – Foi possível demonstrar que as duas morfologias de *T. asahii*, leveduras e hifas, podem ser cultivadas de forma independente em diferentes meios de cultura, possibilitando realizar a extração de proteínas de cada uma das formas separadamente.

2 – Através de ensaio imunoenzimático detectou-se que os anticorpos produzidos em modelo murino reconhecem os extratos proteicos das morfologias de *T. asahii* com força de ligação diferente para cada morfologia celular, possuindo ligação mais forte os anticorpos de hifas.

3 – Ensaios de microscopia de imunofluorescência demonstraram que os anticorpos produzidos contra os extratos proteicos de leveduras e hifas de *T. asahii* reconhecem ambas as morfologias do fungo de forma semelhante.

4 – Pela primeira vez foram obtidas as estruturas de modelos 3D de quatro adesinas putativas com potencial de expressão em leveduras e hifas de *T. asahii*.

5 – Foram selecionados com sucesso quatro peptídeos com alta imunogenicidade e amplo espectro de ligação a alelos do MHC II humano e do H2 murino para serem utilizados em experimentos de reconhecimento celular das adesinas nas diferentes morfologias de *T. asahii*.

6 – Ensaios de localização celular por imunofluorescência demonstraram que os peptídeos selecionados por meio de ferramentas de bioinformática são eficazes na produção de anticorpos capazes de reconhecer proteínas na parede celular de hifas e leveduras de *T. asahii*.

7 – Ensaios piloto de *Western blot* para reconhecimento de proteínas por meio de anticorpos produzidos contra peptídeos sintéticos não foram conclusivos com relação à ligação do anticorpo ao epítipo nativo para o qual foi produzido na estrutura molecular da proteína nativa.

8 – Por meio de análise de expressão gênica foi demonstrado que as quatro adesinas analisadas são mais expressas pela morfologia de hifas do que pela morfologia de leveduras em *T. asahii*, não corroborando os experimentos de quantificação de imunogenicidade

9 – Por meio de *docking* molecular foram obtidas, pela primeira vez, evidências *in silico* da ligação proteína-proteína entre quatro adesinas de *T. asahii* e proteínas humanas que são alvo de ligação de patógenos com o hospedeiro durante o processo de infecção.

REFERÊNCIAS

- AL-FATTANI, M. A; DOUGLAS, L. J. Penetration of *Candida* by antifungal agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 9, p. 3291–3297, 2004.
- ALONSO-MONGE, R. et al. The Sko1 protein represses the yeast-to-hypha transition and regulates the oxidative stress response in *Candida albicans*. **Fungal Genetics and Biology**, v.47, p. 601, 2010.
- ALMEIDA, A. J. et al. Cdc42p controls yeast-cell shape and virulence of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, n. 12, p. 919–926, 2009.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**. London, v. 25, n. 17, p. 3389–3402, 1997.
- ANDO, M. et al. Japanese summer-type hypersensitivity pneumonitis. Geographic distribution, home environment, and clinical characteristics of 621 cases. **The American Review of Respiratory Disease**, v. 144, n. 4, p. 765-769, 1991.
- ANFINSEN, B. C. Folding of Protein Chains. **Science**, v. 181, n. 4096, p. 223–230, 1973.
- ASHBEE, H. R.; EVANS, E. G. V. Immunology of diseases associated with *Malassezia* species. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 1, p. 21–57, 2002.
- ASHENGROPH, M.; AMINI, J. Bioconversion of isoeugenol to vanillin and vanillic acid using the resting cells of *Trichosporon asahii*. **3 Biotech**. v. 7, n. 358, 2017.
- BAILEY, D. A. et al. The *Candida albicans* HYR1 gene, which is activated in response to hyphal development, belongs to a gene family encoding yeast cell wall proteins. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 18, p. 5353–5360, 1996.
- BÄR, E. et al. A novel Th cell epitope of *Candida albicans* mediates protection from fungal infection. **The Journal of Immunology**, v. 188, p. 5636 - 5643, 2012.
- BASU, S. et al. Multidrug-resistant *Trichosporon*: an unusual fungal sepsis in preterm neonates. **Pathogens and Global Health**, London, v. 109, n. 4, p. 202-206, 2016.
- BATES, S. et al. *Candida albicans* Iff11, a secreted protein required for cell wall structure and virulence. **Infection and immunity**, v. 75, n. 6, p. 2922–8, 2007.
- BENSEN, E. S.; FILLER, S. G.; BERMAN, J. A forkhead transcription factor is important for true hyphal as well as yeast morphogenesis in *Candida albicans*. **Eukaryotic Cell**, v. 1, n. 5, p. 787-798, 2002.
- BENTUBO, H.; GOMPERTZ, O. Effects of temperature and incubation time on the in vitro expression of proteases, phospholipases, lipases and DNases by different

species of *Trichosporon*. **SpringerPlus**, v. 3, n. 1, p. 377, 2014.

BERGOLD, A. .; GEORGIADIS, S. New antifungic drugs: A review. **Visão Acadêmica**. Curitiba, v. 5, n. 2, p. 159–172, 2004.

BERMAN, J. *Candida albicans*. **Current Biology**, v. 22, n. 16, p. R620–R622, 2012.

BOYCE, K. J.; ANDRIANOPOULOS, A. Fungal dimorphism: The switch from hyphae to yeast is a specialized morphogenetic adaptation allowing colonization of a host. **FEMS Microbiology Reviews**, London, v. 39, n. 6, p. 797–811, 2015.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Analytical Biochemistr**, v. 72, p. 248–54, 1976.

BRAJTBURG, J. et al. Emergence of a *Candida krusei* isolate with reduced susceptibility to caspofungin during therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 4, p. 561–80, 2006.

BROWN M. R. W., GILBERT, P. Sensivity of Biofilms To Antimicrobial Agents. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v. 74, n.S22, p. 87–97, 1993.

BROWN, S. P.; CORNFORTH, D. M.; MIDEO, N. Evolution of virulence in opportunistic pathogens: Generalism, plasticity, and control. **Trends in Microbiology**, v. 20, n. 7, p. 336–342, 2012.

CALDINI, C. P.; XANDER, P.; CAMARGO, Z. P. DE. Synthetic peptides mimic gp75 from *Paracoccidioides brasiliensis* in the diagnosis of paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, n. 174, p. 1–10, 2012.

CANNON, R. D. et al. Efflux-mediated antifungal drug resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 2, p. 291–321, 2009.

CHAFFIN, W. L. *Candida albicans* cell wall proteins. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 72, n. 3, p. 495–544, 2008.

CHAGAS-NETO, T. C; CHAVES, G. M.; COLOMBO, A. L. Update on the Genus *Trichosporon*. **Mycopathologia**, Berlim, v.166, p. 121–132, 2008.

CHAITANYA, V. et al. Disseminated *Trichosporon* infection in a renal transplant recipient. **Transplant Infectious Disease**, v. 17, n. 4, p. 605–609, 2015.

CHANDRAN, P.; DAS, N. Biosurfactant production and diesel oil degradation by yeast species *Trichosporon asahii* isolated from petroleum hydrocarbon contaminated soil. **International Journal of Engineering Science and Technology**, v. 2, n. 12, p. 6942–6953, 2010.

CHITASOMBAT, M. N. et al. Rare opportunistic (non-*Candida*, non-*Cryptococcus*) yeast bloodstream infections in patients with cancer. **Journal of Infection**, v. 64, p. 68-75, 2012.

CHO, O.; MATSUKURA, M.; SUGITA, T. Molecular evidence that the opportunistic fungal pathogen *Trichosporon asahii* is part of the normal fungal microbiota of the human gut based on rRNA genotyping. **International Journal of Infectious Diseases**, Berlin, v. 39, p. 87–88, 2015.

COLOMBO, A. L.; PADOVAN, A. C. B.; CHAVES, G. M. Current knowledge of *Trichosporon* spp. and trichosporonosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 682–700, 2011.

CORMACK, B. P.; GHORI, N.; FALKOW, S. An adhesin of the yeast pathogen *Candida glabrata* mediating adherence to human epithelial cells. **Science**, v. 285, n. 5427, p. 578–582, 1999.

CROWE, J. D. et al. *Candida albicans* binds human plasminogen: Identification of eight plasminogen-binding proteins. **Molecular Microbiology**, London, v. 47, n. 6, p. 1637–1651, 2003.

DANTAS, S. et al. Cell biology of *Candida albicans* – host interactions. **Current Opinion in Microbiology**, v. 34, p. 111–118.

DAVEY, M. E.; O'TOOLE, G. A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 4, p. 847–67, 2000.

DE ALMEIDA JÚNIOR, J. N.; HENNEQUIN, C. Invasive *Trichosporon* Infection: a Systematic Review on a Re-emerging Fungal Pathogen. **Frontiers in Microbiology**. Bern, v. 7, n. 1629, p. 1–18, 2016.

DE GROOT, P. W. J. et al. Adhesins in human fungal pathogens: Glue with plenty of stick. **Eukaryotic Cell**, v. 12, n. 4, p. 470–481, 2013.

DEL SORBO, G.; SCHOONBEEK, H.; DE WAARD, M. A. Fungal transporters involved in efflux of natural toxic compounds and fungicides. **Fungal genetics and biology**, v. 30, n. 1, p. 1–15, 2000.

DENNING, D. W. Echinocandin antifungal drugs. **Lancet**, London, v. 362, n. 9390, p. 1142–1151, 2003.

DIAZ-AREVALO, D. et al. CD4+ T cells mediate the protective effect of the recombinant Asp f3-based anti-aspergillosis vaccine. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 6, p. 2257–2266, 2011.

DI BONAVENTURA, G. et al. Biofilm formation by the emerging fungal pathogen *Trichosporon asahii*: Development, architecture, and antifungal resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 10, p. 3269–3276, 2006.

DONOFRIO, F. C. et al. Enolase from *Paracoccidioides brasiliensis*: isolation and identification as a fibronectin-binding protein. **Journal of Medical Microbiology**, London, n. 58, p. 706–713, 2009.

DOYTCHINOVA, I. A.; FLOWER, D. R. Bioinformatic Approach for Identifying Parasite and Fungal Candidate Subunit Vaccines. **The Open Vaccine Journal**, Abu Dhabi, v. 1, n. 1, p. 22–26, 2008.

DUARTE-OLIVEIRA, C.; RODRIGUES, F.; GONÇALVES, S. M. The cell biology of the Trichosporon - host interaction. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Bern, v. 7, p. 1–8, 2017.

DUTTON, L. C. et al. Role of *Candida albicans* secreted aspartyl protease Sap9 in interkingdom biofilm formation. **Pathogens and disease**, London, v. 74, n. 3, p. 1–12, 2016.

EBANKS, R. O. et al. Proteomic analysis of *Candida albicans* yeast and hyphal cell wall and associated proteins. **Proteomics**, v. 6, n. 7, p. 2147–2156, 2006.

EBRIGHT, J. R.; FAIRFAX, M. R.; VAZQUEZ, J. A. *Trichosporon asahii*, a non-*Candida* yeast that caused fatal septic shock in a patient without cancer or neutropenia. **Clinical Infectious Diseases**, London, v. 33, p. 28–30, 2001.

ERNST, J. F. Transcription factors in *Candida albicans* – environmental control of morphogenesis. **Microbiology**, London, n. 146, p. 1763–1774, 2000.

ESPINEL-INGROFF, A. Comparison of in vitro activities of the new triazole SCH56592 and the echinocandins MK-0991 (L-743,872) and LY303366 against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and yeasts. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 10, p. 2950–2956, 1998.

FEBRÉ, N. et al. Microbiological characteristics of yeasts isolated from urinary tracts of intensive care unit patients undergoing urinary catheterization. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 1584–1586, 1999.

FERA, M. T.; LA CAMERA, E.; DE SARRO, A. New triazoles and echinocandins: mode of action, in vitro activity and mechanisms of resistance. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, London, v. 7, n. 8, p. 981–998, 2009.

FILLER, S. G. *Candida*-host cell receptor-ligand interactions. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 333–339, 2006.

FINKEL, J. S. et al. Portrait of *Candida albicans* adherence regulators. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 2, 2012.

FINKEL, J. S.; MITCHELL, A. P. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 2, p. 109–118, 2011.

FISER, A. et al. Modeling of loops in protein structures. **Protein Science**, v.9, p. 1753–1773, 2000.

FISER, A.; ŠALI, A. MODELLER: Generation and Refinement of Homology-Based Protein Structure Models. **Methods in Enzymology**, v. 374, p. 461–491, 2003.

FLEMMING, H.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature reviews: Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623–33, 2010.

FLERI, W. et al. The immune epitope database and analysis resource in epitope discovery and synthetic vaccine design. **Frontiers in Immunology**, Bern, v. 8, n. MAR, p. 1–16, 2017.

FLING, M. E. et al. Analysis of a *Candida albicans* gene that encodes a novel mechanism for resistance to benomyl and methotrexate. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 227, n. 2, p. 318–329, 1991.

FLOWER, D. R. et al. Computer aided selection of candidate vaccine antigens. **Immunome Research**, London, v. 6, n. SUPPL. 2, p. S1, 2010.

FONSECA, F. L. et al. Structural and functional properties of the *Trichosporon asahii* glucuronoxylomannan. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, n. 6–7, p. 496–505, 2009.

FORCHE, A. et al. The parasexual cycle in *Candida albicans* provides an alternative pathway to meiosis for the formation of recombinant strains. **PLoS Biology**, v. 6, n. 5, p. 1084–1097, 2008.

GALE, C. et al. *Candida albicans* Int1p interacts with the septin ring in yeast and hyphal cells. **Molecular biology of the cell**, v. 12, n. 11, p. 3538–3549, 2001.

GARAIJAR, J. et al. Use of DNA microarray technology and gene expression profiles to investigate the pathogenesis, cell biology, antifungal susceptibility and diagnosis of *Candida albicans*. **FEMS Yeast Research**, v. 6, n. 7, p. 987–998, 2006.

GARG, V. et al. Invasive trichosporonosis treated with voriconazole. **JAAD Case Reports**, v. 4, n. 4, p. 362–364, 2018.

GAUR, N. K. ; SMITH, R. L.; KLOTZ, S. A. *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* expressing Ala1/Als5 adhere to accessible Threonine, Serine, or Alanine patches. **Cell Communication and Adhesion**, London, v. 9, n. 1, p. 45–57, 2002.

GAUR, N. K.; KLOTZ, S. A. Accessibility of the peptide backbone of protein ligands is a key specificity determinant in *Candida albicans* SRS adherence **Microbiology**, London, n.150, p. 277–284, 2004.

GHIASIAN, A. S.; MAGHSOOD. H. A.; MIRHENDI, S. H. Disseminated, fatal *Trichosporon asahii* infection in a bone marrow transplant recipient. **Journal of microbiology, immunology and infection**, Amsterdam, v. 39, p. 426–429, 2006.

GIL, M. L. et al. Evaluation of the usefulness of anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase antibodies as a treatment for invasive candidiasis in a murine model. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 89, n. 3–4, p. 345–350, 2006.

GO, S. et al. Catheter-related *Trichosporon asahii* bloodstream infection in a neutropenic patient with myelodysplastic syndrome. **Infection & Chemotherapy**,

Seul, v. 50, n. 2, p. 138–143, 2018.

GÓMARA, M. J.; HARO, I. Synthetic peptides for the immunodiagnosis of human diseases. **Current Medicinal Chemistry**, Abu Dhabi, n. v, p. 531–546, 2007.

GREENBAUM, J. et al. Functional classification of class II human leukocyte antigen (HLA) molecules reveals seven different supertypes and a surprising degree of repertoire sharing across supertypes. **Immunogenetics**, v. 63, n. 6, p. 325–335, 2013.

GYAWALI, R. et al. A family of secretory proteins is associated with different morphotypes in *Cryptococcus neoformans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 5, p. 1–16, 2017.

HAJJAR, J. et al. Multiple brain abscesses caused by *Trichosporon inkin* in a patient with x-linked chronic granulomatous disease (cgd) successfully treated with antifungal therapy. **Journal of Clinical Immunology**, n. 37, p. 519–523, 2017.

HAUPT, H. M. et al. Colonization and infection with *Trichosporon* species in the immunosuppressed host. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 147, n. 2, p. 199–203, 1983.

HAWSER, S. P.; DOUGLAS, L. J. Biofilm Formation by *Candida* Species on the Surface of Catheter Materials *In Vitro*. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 3, p. 915–921, 1994.

HESLOP, O. D. et al. Disseminated trichosporonosis in a burn patient: Meningitis and cerebral abscess due to *Trichosporon asahii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 12, p. 4405–4408, 2011.

HIGGINS, C. F. ABC transporters: from microorganisms to man. **Annual Review of Cell Biology**, v. 8, p. 67–113, 1992.

HOYER, L. L. et al. *Candida albicans* ALS3 and insights into the nature of the ALS gene family. **Current Genetics**, Berlin, v. 33, n. 6, p. 451–459, 1998.

HOYER, L. L. The ALS gene family of *Candida albicans*. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 176–180, 2001.

ICHIKAWA, T. et al. Phenotypic Switching and β -N-Acetylhexosaminidase Activity of the Pathogenic Yeast *Trichosporon asahii*. **Microbiology and Immunology**, v. 48, n. 4, p. 237–242, 2004.

ICHIKAWA, T. et al. Switching of colony morphology and adhesion activity of *Trichosporon asahii* clinical isolates. **Medical Mycology**, London, v. 54, n. 2, p. 189–196, 2016.

ISHIGURO, A. et al. Identification of *Candida albicans* antigens reactive with immunoglobulin E antibody of human sera. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 4, p. 1550–7, 1992.

ITURRIETA-GONZÁLES, I. A. et al. Multiple Species of *Trichosporon* Produce Biofilms Highly Resistant to Triazoles and Amphotericin B. **PLOS One**, v. 9, n. 10, 2014.

JACOBSEN, I. D. et al. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. **Expert Review**, London, v. 10, n. 1, p. 85–93, 2012.

JAIN, N.; HASAN, F.; FRIES, B. C. Phenotypic switching in fungi. **Current Fungal Infection Reports**, Berlin, v. 2, n. 3, p. 180–188, 2008.

JEEVES, R. E. et al. Ferric reductase genes involved in high-affinity iron uptake are differentially regulated in yeast and hyphae of *Candida albicans*. **Yeast**, v. 28, p. 629–644, 2011.

JESUS, D. N. F. **Caracterização molecular e análise da expressão gênica de adesinas na levedura emergente *Trichosporon asahii***. 2018. 86f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas, 2018.

JONG, A. Y. et al. Binding of *Candida albicans* enolase to plasminogen results in enhanced invasion of human brain microvascular endothelial cells. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 52, n. 8, p. 615–622, 2003.

JUNTACHAI, W.; KAJIWARA, S. Differential expression of extracellular lipase and protease activities of mycelial and yeast forms in *Malassezia furfur*. **Mycopathologia**, v. 180, n. 3, p. 143–151, 2015.

KANBE, T. et al. Evidence for expression of the C3d receptor of *Candida albicans* in vitro and in vivo obtained by immunofluorescence and immunoelectron microscopy. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 5, p. 1832–1838, 1991.

KARASHIMA, R. et al. Increased release of glucuronoxylomannan antigen and induced phenotypic changes in *Trichosporon asahii* by repeated passage in mice. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 51, n. 2002, p. 423–432, 2002.

KARKOWSKA-KULETA, J.; RAPALA-KOZIK, M.; KOZIK, A. Fungi pathogenic to humans. **Acta Biochimica Polonica**, Warsaw, v. 56, n. 2, p. 211–224, 2009.

KAUR, K.; SANGWAN, S.; KAUR, H. Biosurfactant production by yeasts isolated from hydrocarbon polluted environments. **Environmental Monitoring and Assessment**, n. 189, v. 12, 2017.

KHAN, I. D. et al. *Trichosporon asahii* urinary tract infection in immunocompetent patients. **Medical Journal Armed Forces India**, New Delhi, v. 71, n. 4, p. 373–376, 2015.

KILEY, J. L. et al. Deep cutaneous *Trichosporon asahii* infection in a patient recovering from toxic epidermal necrolysis. **Medical Mycology Case Reports**, n. 23, p. 26–28, 2018.

- KLEPEIS, J.; FLOUDAS, C. ASTRO-FOLD: a combinatorial and global optimization framework for Ab initio prediction of three-dimensional structures of proteins from the amino acid sequence. **Biophysical journal**, v. 85, n. 4, p. 2119–2146, 2003.
- KOLOTILA, M. P.; DIAMOND, R. D. Effects of neutrophils and *in vitro* oxidants on survival and phenotypic switching of *Candida albicans* WO-1. **Infection and Immunity**, v. 58, n. 5, p. 1174–1179, 1990.
- KOPP, J.; SCHWEDE, T. Automated protein structure homology modeling: a progress report. **Pharmacogenomics**, London, v. 5, n. 4, p. 405–416, 2004.
- KOZIK, A. et al. Fibronectin-, vitronectin- and laminin-binding proteins at the cell walls of *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* pathogenic yeasts. **BMC Microbiology**, London, v. 15, n. 1, p. 197, 2015.
- KRCMERY, V. et al. Hematogenous trichosporonosis in cancer patients: Report of 12 cases including 5 during prophylaxis with itraconazol. **Supportive Care in Cancer**, Berlin, v. 7, n. 1, p. 39–43, 1999.
- KUHN, D. M.; VYAS, V. K. The *Candida glabrata* adhesin Epa1p causes adhesion, phagocytosis, and cytokine secretion by innate immune cells. **FEMS Yeast Research**, v. 12, n. 4, p. 398–414, 2012.
- KUMAR, A. et al. *Trichosporon asahii* infection presenting as chronic meningo-ventriculitis and intra ventricular fungal ball: a case report and literature. **Mycoses**, Berlin, v. 58, n. 2, p. 99–103, 2015.
- KUSHIMA, H. et al. Cloning of the lanosterol 14- α -demethylase (ERG11) gene in *Trichosporon asahii*: a possible association between G453R amino acid substitution and azole resistance in *T. asahii*. **FEMS Yeast Research**, London, v. 12, n. 6, p. 662-667, 2012.
- KUSHIMA, H. et al. A new amino acid substitution at G150s in Lanosterol 14- α demethylase (erg11 protein) in multi-azole-resistant *Trichosporon asahii*. **Medical Micology Journal**, Tokyo, v. 58, n. 1, p. 23-28, 2017.
- LAU, S. K. P. et al. Proteome profiling of the dimorphic fungus *Penicillium marneffeii* extracellular proteins and identification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as an important adhesion factor for conidial attachment. **FEBS Journal**, v. 280, n. 24, p. 6613–6626, 2013.
- LI, F.Q. et al. Diagnostic value of immunoglobulin G antibodies against *Candida* enolase and fructose-bisphosphate aldolase for candidemia. **BMC infectious diseases**, London, v. 13, n. 1, p. 253, 2013.
- LI, H. et al. Skin commensal *Malassezia globosa* secreted protease attenuates *Staphylococcus aureus* biofilm formation. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 138, n. 5, p. 1137 -1145, 2018.

LIAO, Y. et al. Epidemiology and outcome of *Trichosporon* fungemia: a review of 185 reported cases from 1975 to 2014. **Open Forum Infectious Diseases**, London, v. 2, n. 4, 2014.

LIAO, Y. et al. In vitro activities of antifungal combinations against biofilms and planktonic forms of clinical *Trichosporon asahii* isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 12, p. 7615–7616, 2014.

LIPKE, P. N. What we do not know about fungal cell adhesion molecules. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 59, 2018.

LIWO, A. et al. Protein structure prediction by global optimization of a potential energy function. **Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS**, v. 96, n. 10, p. 5482–5485, 1999.

LIU, Y.; FILLER, S. G. *Candida albicans* Als3, a multifunctional adhesin and invasin. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 2, p. 168, 173, 2011.

LO, H. et al. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. **Cell**, v.90, p. 939-949, 1997.

LO PASSO, C. et al. Transmission of *Trichosporon asahii* oesophagitis by a contaminated endoscope. **Mycoses**, Berlin, v. 44, p. 13-21, 2001.

LONGO, L. V. G. et al. Proteome of cell wall-extracts from pathogenic *Paracoccidioides brasiliensis*: Comparison among morphological phases, isolates, and reported fungal extracellular vesicle proteins. **EuPA Open Proteomics**, v. 3, p. 216-228, 2014.

LUO, G. et al. *Candida albicans* Hyr1p confers resistance to neutrophil killing and is a potential vaccine target. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 201, n. 11, p. 1718–1728, 2010.

LUSSIER, N. et al. *Trichosporon beigelii* funguria in renal transplant recipients. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 31, n. 5, p. 1299–1301, 2000.

MAESTRE-REYNA, M. et al. Structural basis for promiscuity and specificity during *Candida glabrata* invasion of host epithelia. **Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS**, v. 49, n.102, p. 1–6, 2012.

MALINI, A; OUDEACOMAR, P.; UDAYASHANKAR, C. Onychomycosis due to *Trichosporon mucoides*. **Indian journal of dermatology, venereology and leprology**, New Delhi, v. 77, n. 1, p. 76–7, 2013.

MARÍN, E. et al. *Candida albicans* shaving to profile human serum proteins on hyphal surface. **Frontiers in Microbiology**, Bern, v. 6, 2015.

MARINÉ, M. et al. On and Under the Skin: Emerging Basidiomycetous Yeast Infections Caused by *Trichosporon* Species. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 7, p. 1–9,

2015.

MARTÍNEZ-GOMARIZ, M. et al. Proteomic analysis of cytoplasmic and surface proteins from yeast cells, hyphae, and biofilms of *Candida albicans*. **Proteomic**, v. 9, p. 2230-2252, 2009.

MARTINS, L. M. S. et al. Immunoproteomics and immunoinformatics analysis of *Cryptococcus gattii*: novel candidate antigens for diagnosis. **Future Microbiology**, London, v. 8, n. 4, p. 549–563, 2013.

MAXFIELD, L. et al. *Trichosporon fungemia* in a pediatric patient with acute lymphoblastic leukemia. **IDCases**, v. 2, n. 4, p. 106–108, 2015.

MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119–128, 2013.

MCCOTTER, S. W.; HORIANOPOULOS, L. C.; KRONSTAD, J. W. Regulation of the fungal secretome. **Current Genetics**, v. 62, n. 3, p. 533–545, 2016.

MIDDELHOVEN, W. J. Identification of clinically relevant *Trichosporon* species. **Mycoses**, v. 46, n. 1–2, p. 7–11, 2003.

MILAN, E. P. et al. *Trichosporon inkin* meningitis in Northeast Brazil : first case report and review of the literature. **BMC Infectious Diseases**, London , v. 18, p. 5–7, 2018.

MONTOYA, A. M. et al. Cytokines profile in immunocompetent mice during *Trichosporon asahii* infection. **Medical Micology**, London, v. 56, n. 1, p. 103-109, 2017.

MONTERRAT MARTÍNEZ-GOMARIZ et al. Proteomic analysis of cytoplasmic and surface proteins from yeast cells, hyphae, and biofilms of *Candida albicans*. **Proteomics**, v. 9, n. 8, p. 2230–2252, 2009.

MOORE, M. L. e GRANT, G. A. Peptide design considerations. In: GRANT. G. A. **Synthetic peptides: A user's guide**. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press, 2002. cap. 2. p. 10-92

MOSCA, R. et al. Pushing structural information into the yeast interactome by high-throughput protein docking experiments. **PLoS Computational biology**, v. 5, n. 8, 2009.

MUKHERJEE, P. K. et al. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms : Phase-Specific role of efflux pumps and membrane sterols. **Infection and immunity**, v. 71, n. 8, p. 4333–4340, 2003.

NADEEM, S. G. et al. Effect of growth media , pH and temperature on yeast to hyphal transition in *Candida albicans*. **Open Journal of Medical Microbiology**., Beijing, v. 3, p. 185–192, 2013.

NAGLIK, J. R. et al. *Candida albicans* HWP1 gene expression and host antibody

responses in colonization and disease. **Journal of Medical Microbiology**, London, v.55, p. 1323–1327, 2018.

NANTEL, A. et al. Transcription profiling of *Candida albicans* cells undergoing the yeast-to-hyphal transition. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, p. 3452-3465, 2002.

NAZARIAN, S. et al. An in silico chimeric multi subunit vaccine targeting virulence factors of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) with its bacterial inbuilt adjuvant. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 90, n. 1, p. 36–45, 2012.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NGUYEN, J. K. et al. Fatal disseminated *Trichosporon asahii* fungemia in a child with acute lymphoblastic leukemia and a morbilliform eruption. **Pediatric Dermatology**, v. 35, n. 1, p. 86-87, 2018.

NIMRICHTER, L. et al. Extracellular vesicle-associated transitory cell wall components and their impact on the interaction of fungi with host cells. **Frontiers in Microbiology**, London, v. 7, n. JUL, p. 1–11, 2016.

NISHIURA, Y. et al. Assignment and serotyping of *Trichosporon* species: the causative agents of summer-type hypersensitivity pneumonitis. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, London, v. 35, p. 45–52, 1997.

NOBILE, C. J. et al. Function of *Candida albicans* adhesin Hwp1 in biofilm formation. **Eukaryotic Cell**, v. 5, n. 10, p. 1604-1610, 2006.

NOGUEIRA, S. V. 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.

ODDS, F. C. Phenotype as an escape mechanism. **Mycoses**, v. 40, p. 2–5, 1997.

ODERO, V. et al. Fungemia por *Trichosporon asahii* en un paciente con neoplasia hematológica. **Revista Iberoamericana de Micología**, Madrid, v. 32, n. 1, p. 59–61, 2015.

OLLERT, M. W.; CALDERONE, R. A. A monoclonal antibody that defines a surface antigen on *Candida albicans* hyphae cross-reacts with yeast cell protoplasts. **Infection and Immunity**, v. 58, n. 3, p. 625–631, 1990.

OZKAYA-PARLAKAY, A. et al. *Trichosporon asahii* sepsis in a patient with pediatric malignancy. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 49, n. 1, p. 146–149, 2016.

PADOVAN, A. C. B. et al. A novel allele of HWP1, isolated from a clinical strain of *Candida albicans* with defective hyphal growth and biofilm formation, has deletions of Gln/Pro and Ser/Thr repeats involved in cellular adhesion. **Medical Mycology**, v. 47, n. 8, p. 824–835, 2009.

- PAUL, S. et al. TepiTool: A pipeline for computational prediction of T cell epitope candidates. **Current Protocols in Immunology**, v. 114, p: 18.19.1-18.19.24, 2016.
- PARADŽIK, M. T et al. Invasive *Trichosporonosis* in a Critically Ill ICU Patient : Case Report. **Clinical Microbiology: Open Access**, v. 4, n. 4, p. 10–12, 2015.
- PAULOVÍČOVÁ, E. et al. The evaluation of β -(1 \rightarrow 3) -nonaglycoside as an anti-*Candida albicans* immune response inducer. **Cellular Microbiology** v. 18, n. 9, p. 1294–1307, 2016.
- PAULOVÍČOVÁ, L. et al. Immune cell response to *Candida* cell wall mannan derived branched α -oligomannoside conjugates in mice. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 48, n. 1, p. 9–19, 2015.
- PFALLER, M. A. et al. Results from the ARTEMIS DISK Global antifungal surveillance study, 1997 to 2007: 10.5-year analysis of susceptibilities of noncandidal yeast species to fluconazole and voriconazole determined by clsi standardized disk diffusion testing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 117–123, 2009.
- PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Rare and Emerging Opportunistic Fungal Pathogens : Concern for Resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 10, p. 4419–31, 2004.
- PHAN, Q. T. et al. Als3 Is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells. **PLoS Biology**, v. 5, n. 3, 2007.
- PINHEIRO, R. E. E. et al. Short communication occurrence and diversity of yeast species isolated from fish feed and tambatinga gut. **Latin American Journal of Aquatic Research**, Santiago, v. 46, n. 4, p. 837–842, 2018.
- PITARCH, A. et al. Analysis of the serologic response to systemic *Candida albicans* infection in a murine model. **Proteomics**, v. 1, n. 4, p. 550–559, 2001.
- PRASAD, R. et al. Molecular cloning and characterization of a novel gene of *Candida albicans*, CDR1, conferring multiple resistance to drugs and antifungals. **Current Genetics**, Amsterdam, v. 27, n. 4, p. 320–329, 1995.
- PRASAD, R. et al. Efflux pumps in drug resistance of *Candida*. **Infectious Disorders Drug Targets**, Abu Dhabi, v. 6, n. 2, p. 69–83, 2006.
- PUCCIA, R. et al. The *Paracoccidioides* cell wall : past and present layers toward understanding interaction with the host. **Frontiers in Microbiology**, Bern, v. 2, 2011.
- PUCCIA, R.; VALLEJO, M. C.; LONGO, L. V. G. The cell wall-associated proteins in the dimorphic pathogenic species of *Paracoccidioides*. **Current Protein and Peptide Science**, Abu Dhabi, v. 18, p. 1074–1089, 2017.
- RANKE, N. L. et al. Molecular modeling and dynamic simulations of agglutinin-like family members from *Candida albicans*: New insights into potential targets for the

treatment of candidiasis. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, London, 2018.

REDDY, B. T.; TORRES, H. A.; KONTOYIANNIS, D. P. Breast implant infection caused by *Trichosporon beigelii*. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, London, v. 34, n. 0036–5548 (Print), p. 143–144, 2002.

REZENDE, T. C. V et al. A quantitative view of the morphological phases of *Paracoccidioides brasiliensis* using proteomics. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 75, n. 2, p. 572–587, 2011.

RICHARD, M. L.; PLAINE, A. Comprehensive analysis of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Candida albicans*. **Eukaryotic Cell**, v. 6, n. 2, p. 119–133, 2007.

RIKKERINK, E. H.; MAGEE, B. B.; MAGEE, P. T. Opaque-white phenotype transition: a programmed morphological transition in *Candida albicans*. **Journal of Bacteriology**, London, v. 170, n. 2, p. 895–899, 1988.

RIVERA, A. et al. Distinct CD4+-T-cell responses to live and heat-inactivated *Aspergillus fumigatus* conidia. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 11, p. 7170–7179, 2005.

RIZZITELLI, G. et al. Onychomycosis caused by *Trichosporon mucoides*. **International Journal of Infectious Diseases**, Amsterdam, v. 42, p. 61–63, 2016.

RODRIGUEZ-TUDELA, J. L. et al. Susceptibility Patterns and Molecular Identification of *Trichosporon* Species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 10, p. 4026–4034, 2005.

ROY, A.; KUCUKURAL, A.; ZHANG, Y. I-TASSER: A unified platform for automated protein structure and function prediction. **Nature Protocols**, v. 5, n. 4, p. 725–738, 2010.

ROY, U. et al. Structural investigation of tumor differentiation factor. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 59, n. 6, p. 445–450, 2012.

RUAN, S.; CHIEN, J.; HSUEH, P. Invasive trichosporonosis caused by *Trichosporon asahii* and other unusual trichosporon species at a medical center in taiwan. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 7, p. 11–17, 2009.

RUBIC, Z. et al. Prompt diagnosis and effective treatment of *Trichosporon asahii* catheter-related infection in non-immunocompromised neurosurgical patient. **Mycopathologia**, Berlin, v. 179, n. 1–2, p. 125–128, 2015.

SAADATZADEH, M. R. et al. Production of the mycelial phase of *Malassezia* in vitro. **Medical Mycology**, v. 39, p. 487–493, 2001.

SANGLARD, D. et al. Susceptibilities of *Candida albicans* multidrug transporter mutants to various antifungal agents and other metabolic inhibitors. **Antimicrobial**

Agents and Chemotherapy, v. 40, n. 10, p. 2300–2305, 1996.

SANGLARD, D. et al. Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of *CDR2*, a new multidrug ABC transporter gene. **Microbiology**, v. 143, n. 1 997, p. 405–416, 1997.

SARDI, J. D. C. O. et al. Highlights in pathogenic fungal biofilms. **Revista Iberoamericana de Micología**, Madrid, v. 31, n. 1, p. 22–29, 2014.

SASSE, C. et al. White-opaque switching of *Candida albicans* allows immune evasion in an environment-dependent fashion. **Eukaryotic Cell**, v. 12, n. 1, p. 50–58, 2013.

SCHAFFER, A. A. Improving the accuracy of PSI-BLAST protein database searches with composition-based statistics and other refinements. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 14, p. 2994–3005, 2001.

SCHNEIDMAN-DUHOVNY, D.; NUSSINOV, R.; WOLFSON, H. J. Predicting molecular interactions in silico : II . protein-protein and protein- drug docking. **Current Medicinal Chemistry**, Abu Dhabi, v. 11, p. 91–107, 2004.

SHEPPARD, D. C. et al. Functional and Structural Diversity in the Als Protein Family of *Candida albicans*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 29, p. 30480 - 30489, 2004.

SIDAROUS, M. G.; O'REILLY, M. V.; CHERUBIM, C. E. A case of *Trichosporon beigellii* endocarditis 8 years after aortic valve replacement. **Clinical Cardiology**, v. 17, n. 4, p. 215–219, 1994.

SILVA, R. C. et al. Extracellular enolase of *Candida albicans* is involved in colonization of mammalian intestinal epithelium. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, Bern, v. 4, n. June, p. 66, 2014.

SLUTSKY, B. et al. “White-opaque transition”: A second high-frequency switching system in *Candida albicans*. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 1, p. 189–197, 1987.

SLUTSKY, B.; BUFFO, J.; SOLL, D. R. High-frequency switching of colony morphology in *Candida albicans*. **Science**, v. 230, n. 4726, p. 666–9, 1985.

SMAIL, E. H.; JONES, J. M. Demonstration and solubilization of antigens expressed primarily on the surfaces of *Candida albicans* germ tubes. **Infection and Immunity**, v. 45, n. 1, p. 74–81, 1984.

SORBO, G. D.; SCHOONBEECK, H.; De WAARD, M. A. Fungal transporters involved in efflux of natural toxic compounds and fungicides. **Fungal Genetics and Biology**, v. 30, p. 1-15, 2000.

STIE, J.; BRUNI, G.; FOX, D. Surface-associated plasminogen binding of *Cryptococcus neoformans* promotes extracellular matrix invasion. **PLoS ONE**, v. 4, n.

6, 2009.

SUGITA, T.; IKEDA, R.; NISHIKAWA, A. Analysis of *Trichosporon* isolates obtained from the houses of patients with summer-type hypersensitivity pneumonitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 12, p. 5467–5471, 2004.

SUN, H. Y.; SINGH, N. Characterisation of breakthrough invasive mycoses in echinocandin recipients: an evidence-based review. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 35, n. 3, p. 211–218, 2010.

SUN, W. et al. *Trichosporon asahii* causing nosocomial urinary tract infections in intensive care unit patients: Genotypes, virulence factors and antifungal susceptibility testing. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 61, n. PART12, p. 1750–1757, 2012.

SUNDSTROM, P.; ALIAGA, G. R. A subset of proteins found in culture supernatants of *Candida albicans* includes the abundant, immunodominant, glycolytic enzyme. **Journal of Infectious Diseases**, London, v. 169, n. 2, p. 452–456, 1994.

SUNDSTROM, P.; JENSEN, J.; BALISH, E. Humoral and cellular immune responses to enolase after alimentary tract colonization or intravenous immunization with *Candida albicans*. **The Journal of Infectious Diseases**, London, v. 170, n. 2, p. 390–395, 1994.

SUNDSTROM, P. Adhesins in *Candida albicans*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, n. 4, p. 353–357, 1999.

SUNDSTROM, P. Adhesion in *Candida* spp. **Cellular Microbiology**, v. 4, n. 8, p. 461–469, 2002.

SUNDSTROM, P.; BALISH, E.; ALLEN, C. M. Essential role of the *Candida albicans* transglutaminase substrate, Hyphal Wall Protein 1, in lethal oroesophageal candidiasis in immunodeficient mice. **The Journal of Infectious Diseases**, London, v. 185, n. 4, p. 521–530, 2002.

SUNDSTROM, P. *Candida albicans* hypha formation and virulence. In: HETMAN, J. et al. **Molecular principles of fungal pathogenesis**, [s.l.], AMS Press, 2006, cap. 4, p. 45-47.

SWOBODA, R. K. et al. Glycolytic enzymes of *Candida albicans* are nonubiquitous immunogens during candidiasis. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 10, p. 4263–4271, 1993.

TAWARA, S. et al. In vitro activities of a new lipopeptide antifungal agent, FK463, against a variety of clinically important fungi. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 1, p. 57–62, 2000.

TEIXEIRA, P. A. C., et al. Mannoprotein MP84 mediates the adhesion of *Cryptococcus neoformans* to epithelial lung cells. **Cellular and Infection Microbiology**, v. 4, p. 1-9, 2014.

- THIBEAULT, R. et al. Fatal disseminated *Trichosporon asahii* infection in a child with acute lymphoblastic leukemia. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, Ontario, v. 19, n. 2, p. 203–205, 2008.
- THIEN, S. Y. et al. Recurrent trichosporonosis with central nervous system involvement in an allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipient. **Transplant Infectious Disease**, v. 18, p. 768–772, 2016.
- THYWIßEN, A. et al. Conidial dihydroxynaphthalene melanin of the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* interferes with the host endocytosis pathway. **Frontiers in Microbiology**, Amsterdam, v. 2, 2011.
- UCHIYAMA, J. et al. Characterization of lytic enzyme open reading frame 9 (ORF9) derived from *Enterococcus faecalis* bacteriophage ϕ EF24C. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 2, p. 580–585, 2011.
- URAI, M. et al. Evasion of innate immune responses by the highly virulent *Cryptococcus gattii* by altering capsule glucuronoxylomannan structure. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Bern, v. 5, n. Jan., p. 101, 2016.
- URBAN, C. et al. The moonlighting protein Tsa1p is implicated in oxidative stress response and in cell wall biogenesis in *Candida albicans*. **Molecular Microbiology**, v. 57, p. 1318–1341, 2005.
- VARGAS, K. et al. Elevated phenotypic switching and drug resistance of *Candida albicans* from human immunodeficiency virus-positive individuals prior to First Thrush Episode. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 10, p. 3595-3607, 2000.
- VERSTREPEN, K. J.; REYNOLDS, T. B.; FINK, G. R. Origins of variation in the fungal cell surface. **Nature reviews. Microbiology**, v. 2, n. 7, p. 533–540, 2004.
- VIUDES, A.; PEREA, S.; LOPEZ-RIBOT, J. L. Identification of continuous B-cell epitopes on the protein moiety of the 58-kilodalton cell wall mannoprotein of *Candida albicans* belonging to a family of immunodominant fungal antigens. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 5, p. 2909–2919, 2001.
- VON DER HAAR, T. Optimized protein extraction for quantitative proteomics of yeasts. **PLoS ONE**, v. 2, n. 10, 2007.
- WALSH, T. J. et al. *Trichosporon beigelii*, an emerging pathogen resistant to amphotericin B. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 7, p. 1616–22, 1990.
- WALSH, T. J. et al. Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, p. 48-66, 2004.
- WANG, L.; ZHAI, B.; LIN, X. The link between morphotype transition and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 6, 2012.
- WANG, L. et al. Fungal adhesion protein guides community behaviors and

autoinduction in a paracrine manner. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 28, p. 11571–6, 2013.

WHITE, T. C.; MARR, K. A.; BOWDEN, R. A.. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. **Clinical Microbiolgy Reviews**, v. 11, n. 2, p. 382–402., 1998.

WU, G. et al. Genus-wide comparative genomics of *Malassezia* delineates its phylogeny , physiology , and niche adaptation on human skin. **PLoS Genetics**, v. 11,n. 11, 2015.

YANG, J. et al. The I-TASSER suite: Protein structure and function prediction. **Nature Methods.**, v. 12, n. 1, p. 7–8, 2014.

YANG, R. Y. et al. Draft genome sequence of CBS 2479, the standard type strain of *Trichosporon asahii*. **Eukaryotic Cell**, v. 11, n. 11, p. 1415–1416, 2012.

YOUNES, S. et al. The *Candida albicans* Hwp2 is necessary for proper adhesion, biofilm formation and oxidative stress tolerance. **Microbiological Research**, Amsterdam, v. 166, n. 5, p. 430–436, 2011.

ZHANG, E. et al. Characterization of the skin fungal microbiota in patients with atopic dermatitis and in healthy subjects. **Microbiology and Immunology**, v. 55, n. 9,, p. 625–632, 2011.

ZHANG, J. et al. GPCR-I-TASSER: A Hybrid Approach to G Protein-Coupled Receptor Structure Modeling and the Application to the Human Genome. **Structure**, v. 23, n. 8, p. 1538–1549, 2015.

ZHANG, Q. et al. Immune epitope database analysis resource (IEDB-AR). **Nucleic Acids Research**, v. 36, p. 513–518, 2008.

ZHANG, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. **BMC Bioinformatics**, London, v. 9, p. 1–8, 2008.

ZHANG, Y. et al. Study on antioxidant enzymatic activities of *Trichosporon asahii*. **Indian Journal of Microbiology.**, New Delhi, v. 56, n. 4, p. 445-450, 2016.

ZHANG, W. et al. Integration of QUARK and I-Tasser for ab initio protein structure prediction in CASP11. **Proteins**, v.84, p. 76-86, 2016.

ZHENG, X.; WANG, Y.; WANG. Y. Hgc1, a novel hyphae-specific g1 cyclin-related protein regulates *Candida albicans* hyphal morphogenesis. **The EMBO Journal**, Berlin, v. 23, n. 8, p. 1845-1856, 2004.

ZUO, Q. et al. *Trichosporon asahii* infection after total knee arthroplasty : A case report and review of the literature. **Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology**, Ontario, v. 26, n. 324, p. 47–51, 2015.

ZUPANCIC, M. L. et al. Glycan microarray analysis of *Candida glabrata* adhesin

ligand specificity. **Molecular Microbiology**, v. 68, n. 3, p. 547–559, 2008.

ANEXO A – Certificado de aprovação do CEUA/UNIFAL



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
 Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG
 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, Alfenas/MG. CEP 37130-000
 Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da localização celular de proteínas hipotéticas no patógeno emergente *Trichosporon asahii*", registrada com o nº 53/2017, sob a responsabilidade de Ana Carolina Barbosa Padovan, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	De 08/11/2017 a 28/02/2019
Espécie/linhagem/raça	Camundongo BALB/c / isogênico
Nº de animais	60
Sexo	Machos
Origem	Centro de Bioterismo da UFMG

Alfenas, 08 de Novembro de 2017.

Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida
 Coordenador CEUA-UNIFAL

ANEXO B – Aprovação da emenda do projeto junto ao CEUA/UNIFAL

De: "Leonardo Almeida" <leoalmeida.unifal@gmail.com>
Para: "Ana Carolina B. Padovan" <carolina.padovan@unifal-mg.edu.br>, "Coordenação de Pesquisa" <copesq@unifal-mg.edu.br>
Enviadas: Terça-feira, 3 de abril de 2018 10:10:34
Assunto: Resposta ao pedido de emenda do Processo CEUA 53/2017

Prezado Profa. Dra. Ana Carolina Barbosa Padovan,

A emenda solicitada ao projeto sob a sua coordenação, registrado sob o nº 53/2017, intitulado “Avaliação da localização celular de proteínas hipotéticas no patógeno emergente *Trichosporon asahii*”, foi avaliada e o parecer foi de aprovação no seguinte item de acordo com o pedido de emenda enviado pelo responsável.

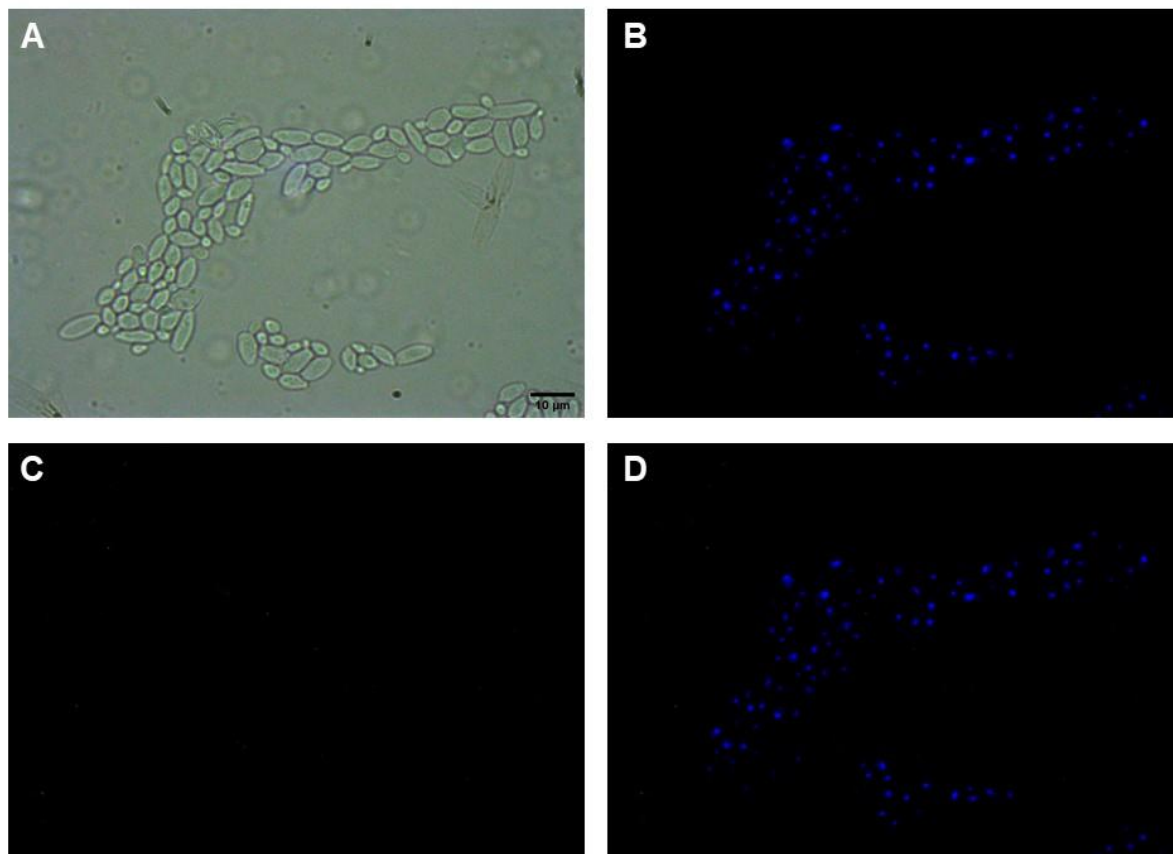
- Mudança da linhagem de camundongos experimentais: Alteração da linhagem Balb/c para 129Sv/Ev.

Colocamo-nos a disposição para eventuais dúvidas.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida
Coordenador do CEUA/UNIFAL-MG

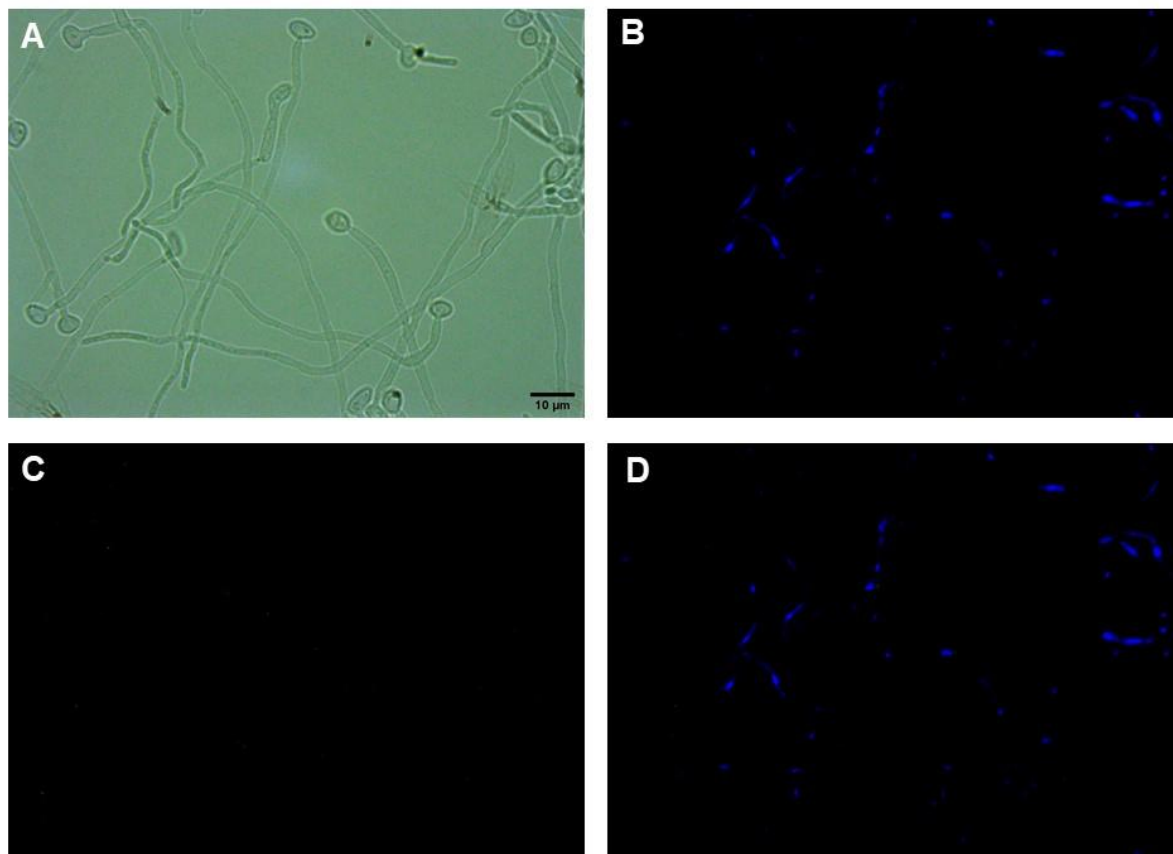
ANEXO C – Imagem de microscopia de fluorescência de leveduras de *C. albicans* SC5314 tratadas com antissoro gerado contra leveduras de *T. asahii* CBS 2479.



Legenda: A) Leveduras em campo claro;
B) Núcleos celulares corados com DAPI;
C) Leveduras com proteínas de superfície marcadas com FITC;
D) Merged de A e B.
Aumento de 1000x

Fonte: Do autor.

ANEXO D – Imagem de microscopia de fluorescência de hifas de *C. albicans* SC5314 tratadas com antissoro gerado contra hifas de *T. asahii* CBS 2479.



Legenda: A) Hifas em campo claro;
B) Núcleos celulares corados com DAPI;
C) Hifas com proteínas de superfície marcadas com FITC;
D) Merged de A e B.
Aumento de 1000x

Fonte: Do autor.