UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Abordagem proteômica para estudos de fotobiologia e fotoinativação de fungos

Guilherme Thomaz Pereira Brancini

Ribeirão Preto

2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Abordagem proteômica para estudos de fotobiologia e fotoinativação de fungos

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biociências
Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título
de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas
à Farmácia

Orientado: Guilherme Thomaz Pereira
Brancini

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Úbida Leite
Braga

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biociências Aplicadas à Farmácia no dia 11/08/2015. A versão original encontra-se
disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Brancini, Guilherme Thomaz Pereira

Abordagem proteômica para estudos de fotobiologia e fotoinativação de fungos. Ribeirão Preto, 2015.

123 p.: il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientador: Braga, Gilberto Úbida Leite.

1. Proteômica. 2. *Metarhizium*. 3. *Candida*. 4. Fotoinativação. 5. Tolerância ao estresse.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Guilherme Thomaz Pereira Brancini

Título do trabalho: Abordagem proteômica para estudos de fotobiologia e fotoinativação de fungos

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biociências
Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título
de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas
à Farmácia

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Úbida Leite
Braga

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e ao meu irmão.

Por todo o apoio.

Por todo esse tempo.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Gilberto Úbida Leite Braga, pela orientação e pelas discussões científicas e acadêmicas, sempre valiosas.

Ao Prof. Dr. José César Rosa por ter aberto as portas do seu laboratório e me ensinado muito sobre proteômica.

À Prof.^a Dr.^a Ana Patrícia Yatsuda e aos alunos de seu laboratório pela disponibilidade e pela presteza em ajudar.

A todos os amigos e colegas do laboratório pelo agradável convívio diário.

À Dr.^a Gabriela Braga Rodrigues por ter realizado os experimentos de fotoinativação de *Candida* e, assim, fornecido as amostras para a análise proteômica.

A todos os alunos e funcionários do Centro de Química de Proteínas do Hemocentro de Ribeirão Preto (CQP–HCFMRP), especialmente às Dr.^{as} Clarice Izumi e Hélien Julie Laure, por terem auxiliado com os experimentos de análise de aminoácidos e de identificação de proteínas por espectrometria de massas.

A todos os meus amigos, que me ajudaram a percorrer o caminho até aqui.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela bolsa de mestrado concedida.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

“When you are studying any matter, or considering any philosophy, ask yourself *only*: What are the facts, and what is the truth that the facts bear out.”

Bertrand Russell

RESUMO

BRANCINI, G. T. P. **Abordagem proteômica para estudos de fotobiologia e fotoinativação de fungos.** 2015. 123f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

A proteômica é uma técnica muito importante e amplamente utilizada na elucidação de diversos mecanismos biológicos. Essa técnica pode ser usada, por exemplo, na avaliação da resposta celular a estímulos ou na determinação de modificações proteicas resultantes de um tratamento. Neste trabalho, a abordagem proteômica foi utilizada em dois sistemas diferentes: (1) na elucidação da resposta à luz no fungo *Metarhizium acridum* e (2) na determinação dos danos proteicos causados pelo tratamento fotodinâmico da levedura *Candida albicans*. (1) O fungo entomopatogênico *M. acridum*, quando crescido na presença de luz, produz conídios com elevada tolerância à radiação ultravioleta-B (290-315 nm). Essa elevada resistência é altamente desejada para aplicação de *M. acridum* no controle biológico de pragas na agricultura. É possível que esse fenômeno seja decorrente do acúmulo diferencial de proteínas nos conídios produzidos na presença de luz em comparação com aqueles produzidos no escuro. Assim, foi utilizada uma abordagem proteômica para determinar quais proteínas poderiam estar diferencialmente acumuladas nos conídios. Os resultados mostraram que, de um total de 501 proteínas identificadas, somente quatro estavam diferencialmente acumuladas. Apesar de não ser possível estabelecer uma relação clara entre o acúmulo dessas proteínas e a elevada tolerância à radiação ultravioleta-B, dados de proteínas homólogas em *Aspergillus fumigatus* obtidos da literatura mostraram que essas proteínas são reguladas em condições de estresse. Adicionalmente, experimentos foram conduzidos para expandir o conhecimento sobre a fotobiologia de *M. acridum*. Estabeleceu-se que, dentro do espectro da luz visível, a luz azul é responsável por induzir o aumento da tolerância à radiação ultravioleta-B, enquanto a luz vermelha não produz o mesmo resultado. Conclui-se que o estudo da resposta à luz através da proteômica de conídios requer o uso de técnicas que resultem na identificação de uma fração maior do proteoma, já que o acúmulo diferencial de proteínas aparentemente não envolve as proteínas mais abundantes. (2) *Candida albicans* é um importante patógeno humano responsável por micoses superficiais e sistêmicas, principalmente em indivíduos imunocomprometidos. O uso contínuo dos fungicidas tradicionais vem resultando na seleção de linhagens tolerantes. Nesse cenário, o tratamento fotodinâmico antimicrobiano surgiu como importante alternativa no tratamento das micoses causadas por *C. albicans*. Apesar da efetividade desse tratamento ter sido observada em diversos trabalhos, um estudo no nível proteico ainda não havia sido realizado. A abordagem proteômica por eletroforese bidimensional revelou que, após o tratamento das células, muitos spots nos géis sofreram um desvio ácido, ou seja, um deslocamento para regiões de menor ponto isoelétrico. Por outro lado, foram observados spots resistentes a essa modificação. Proteínas pertencentes a ambos os grupos foram identificadas por espectrometria de massas. A análise de aminoácidos mostrou que o conteúdo de histidina nas células de *C. albicans* foi reduzido em aproximadamente 60% após o tratamento, o que é uma possível explicação para o desvio ácido observado. Conclui-se, após extensa revisão e discussão da literatura, que os danos em proteínas dependem da interação entre proteína e fotossensibilizador e também da presença de aminoácidos fotooxidáveis nas proximidades dos sítios de interação.

Palavras-chave: proteômica, *Metarhizium*, *Candida*, fotoinativação, tolerância ao estresse.

ABSTRACT

BRANCINI, G. T. P. **Proteomic approaches to studying fungal photobiology and photoinactivation.** 2015. 123f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Proteomics is a very important and largely employed technique for the elucidation of a series of biological mechanisms. This technique can be used, for instance, on the evaluation of cellular responses to stimulus or in determining protein modification resulting from a treatment. In the present work, a proteomic approach was used in two distinct biological systems: (1) to evaluate the light response in the fungus *Metarhizium acridum*, and (2) to determine the protein damage resulting from photodynamic treatment of the yeast *Candida albicans*. (1) The entomopathogenic fungus *M. acridum*, when grown in the presence of light, produces conidia with increased tolerance to ultraviolet-B radiation (290-315 nm). This increased resistance is desired for the application of this fungus on the biological control of agricultural pests. It is possible that this phenomenon results from the differential accumulation of proteins in conidia produced in the presence of light as compared to those produced in the dark. Therefore, a proteomic approach was used to determine which proteins could be differentially accumulated in conidia. The results showed that, out of a total of 501 identified proteins, only four were found to be differentially accumulated. Even though establishing a direct relationship between the observed accumulation and the increased tolerance to ultraviolet-B radiation was not possible, data from the literature on homolog proteins in *Aspergillus fumigatus* have shown that these proteins are regulated under stress conditions. Additionally, experiments were performed to gain further insight on the photobiology of *M. acridum*. It was established that, within visible light spectrum, blue light is responsible for inducing the increased tolerance to ultraviolet-B, while red light does not produce the same effect. It is concluded that a light-response study employing proteomics should rely on techniques yielding a higher number of identified proteins, as the differential accumulation does not seem to affect high abundance proteins. (2) *Candida albicans* is an important human pathogen responsible for superficial and systemic mycoses mainly in immunocompromised patients. The continuous use of the traditional fungicides has resulted in the selection of tolerant strains. In this scenario, antimicrobial photodynamic treatment became an important alternative on the treatment of *C. albicans* infections. Although the effectiveness of this treatment has been observed in multiple studies, an evaluation at the protein level had not been performed. A proteomic approach by two-dimensional electrophoresis revealed that, after cell treatment, many spots underwent an acidic shift, that is, a shift towards lower isoelectric point. On the other hand, protein spots resistant to modification were also observed. Proteins belonging to both groups were identified by mass spectrometry. Amino acid analysis revealed that the histidine content in *C. albicans* cells decreased by up to 60% after the treatment, which is a possible explanation to the observed acidic shift. It is concluded, after extensive literature review and discussion, that protein damage depends on protein-photosensitizer interaction and also on the presence of photooxidizable amino acids in the proximity of the interaction site.

Keywords: proteomics, *Metarhizium*, *Candida*, photoinactivation, stress tolerance.

RESUMEN

BRANCINI, G. T. P. **Abordaje proteómico para estudios de fotobiología y fotoinactivación de los hongos.** 2015. 123f. Disertación (Maestría). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Proteómica es una técnica muy importante y ampliamente utilizada en la elucidación de diversos mecanismos biológicos. Esa técnica puede ser usada, por ejemplo, en la evaluación de la respuesta celular a estímulos o aún en la determinación de las modificaciones proteicas resultantes de un tratamiento. En este trabajo el abordaje proteómico fue utilizado en dos sistemas distintos: (1) En la elucidación de la respuesta a la luz en el hongo *Metarhizium acridum* y (2) en la determinación de los daños proteicos causados por el tratamiento fotodinámico de la *Candida albicans*. (1) El hongo entomopatógeno *M. acridum*, cuando crecido en la presencia de luz produce conidios con elevada tolerancia a la radiación ultravioleta-B (290-315 nm). Esa elevada resistencia es altamente deseada para la aplicación de *M. acridum* en el control biológico de plagas en la agricultura. Es probable que ese fenómeno sea decurrente del acúmulo diferencial de proteínas en los conidios producidos en la presencia de luz comparándose con aquellos producidos en la oscuridad. Un abordaje proteómico fue utilizado para determinar cuáles proteínas podrían estar diferencialmente acumuladas en los conidios. Los resultados mostraron que, de un total de 501 proteínas identificadas, apenas cuatro estaban diferencialmente acumuladas. A pesar de no ser posible establecer una relación clara entre el acúmulo de esas proteínas y la elevada tolerancia a la radiación ultravioleta-B, datos de proteínas homólogas en *Aspergillus fumigatus* informados en la literatura mostraron que esas proteínas son reguladas en condiciones de estrés. Adicionalmente, experimentos fueron conducidos para expandir el conocimiento sobre la fotobiología de *M. acridum*. Se verificó que, dentro del espectro de la luz visible, la luz azul es responsable por inducir el aumento de la tolerancia a la radiación ultravioleta-B mientras que la luz roja no produce el mismo resultado. Se concluyó que el estudio de la respuesta a la luz por medio de la proteómica de conidios requiere el uso de técnicas que resulten en la identificación de una fracción mayor del proteoma, una vez que el acúmulo diferencial de proteínas aparentemente no envuelve las proteínas más abundantes. (2) *Candida albicans* es un importante patógeno humano responsable por micosis superficiales y sistémicas, principalmente en individuos inmunocomprometidos. El uso continuado de los fungicidas tradicionales viene resultando en la selección de cepas tolerantes. En ese escenario, el tratamiento fotodinámico antimicrobiano surgió como importante alternativa en el tratamiento de las micosis causadas por *C. albicans*. A pesar de la efectividad de ese tratamiento haber sido observada en diversos trabajos, un estudio a nivel proteico no había sido realizado aún. El abordaje proteómico por electroforesis bidimensional reveló que, a continuación del tratamiento de las células, muchos spots en los geles sufrieron un desvío ácido, o sea, un desplazamiento para regiones de menor punto isoeléctrico. Por otro lado, fueron observados spots resistentes a esa modificación. Proteínas pertenecientes a ambos los grupos fueron identificadas por espectrometría de masas. El análisis de aminoácidos mostró que el contenido de histidina en las células de *C. albicans* fue reducido en aproximadamente 60% después del tratamiento, lo que es una posible explicación para el desvío ácido observado. Después extensa revisión y discusión de la literatura se concluyó que los daños en proteínas dependen de la interacción entre proteína y fotosensibilizador, además de la presencia de aminoácidos fotooxidables en las proximidades de los sitios de interacción.

Palabras-clave: proteómica, *Metarhizium*, *Candida*, fotoinactivación, tolerancia al estrés.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 –** Sobrevivência relativa após exposição por quatro e cinco horas à radiação UV-B dos conídios produzidos em fotoperíodo [Claro (12/12h)] e na ausência de luz (Escuro). Barras de erro representam desvio padrão de três experimentos independentes.....26
- Figura 2 –** Géis 2-D de conídios de *M. acridum* produzidos no claro (A) e no escuro (B). Análise de imagens dos géis obtidos em três experimentos independentes demonstrou que não havia diferença estatisticamente significativa entre Claro e Escuro.....27
- Figura 3 –** Classificação das proteínas identificadas segundo o Gene Ontology na categoria processo biológico (*biological process*). Somente as classes que atingiram 2% do total estão mostradas.....30
- Figura 4 –** (A) Aspecto das placas de Claro e de Escuro ao sétimo dia de desenvolvimento, quando se procederam as trocas Claro→Escuro e Escuro→Claro. (B) Sobrevivência relativa após 4 h de exposição à radiação UV-B de conídios de *M. acridum* produzidos no claro, no escuro e quando houve inversão da condição de crescimento ao sétimo dia (Claro→Escuro e Escuro→Claro). Letras distintas representam diferenças estatisticamente significativas (ANOVA com pós-teste de Tukey resultando em $P < 0,05$).....39
- Figura 5 –** Aparência das colônias após quatro horas de exposição à radiação UV-B dos conídios de *M. acridum* obtidos nas condições especificadas. As imagens foram obtidas 72 h após a exposição.....41
- Figura 6 –** Aspecto das placas após exposição de colônias jovens de *M. acridum* à radiação UV-B. As colônias foram induzidas na luz azul (400 nm) ou luz branca por 2 h antes de serem expostas à radiação UV-B. Colônias não induzidas (escuro) também foram expostas à radiação UV-B. “Controle não exposto” representa o desenvolvimento normal do fungo. As imagens foram obtidas 96 h após exposição à radiação UV-B.....42
- Figura 7 –** Aspecto das placas após exposição de colônias jovens de *M. acridum* à radiação UV-B. As colônias foram induzidas na luz UV-A (pico em 370 nm) ou luz branca por 2 h antes de serem expostas à radiação UV-B. Colônias não induzidas (escuro) também foram expostas à radiação UV-B. “Controle não exposto” representa o desenvolvimento normal do fungo e “2h UV-A” representa o efeito da exposição somente a essa radiação. As imagens foram adquiridas 96 h após exposição à radiação UV-B.....44
- Figura 8 –** Aspecto das placas após exposição de colônias jovens de *M. acridum* à radiação UV-B. As colônias foram induzidas na luz vermelha (650 nm) ou luz branca por 2 h antes de serem expostas à radiação UV-B. Colônias não induzidas (escuro) também foram expostas à radiação UV-B. “Controle não exposto” representa o desenvolvimento normal do fungo. As imagens foram obtidas 96 h após exposição à radiação UV-B.....45

- Figura 9 –** Efeito do TFA usando-se NMBN e fluências de 3 e 10 J cm⁻² na sobrevivência de *C. albicans*. Foram utilizadas para comparação células tratadas com o fotossensibilizador e não expostas à luz (FS E) e células não tratadas com o FS e não expostas à luz (controle).....61
- Figura 10 –** Géis 2-D representativos dos resultados obtidos após exposição de *C. albicans* somente ao FS (**A** e **C**) e após TFA com as fluências de 3 J cm⁻² (**B**) e 10 J cm⁻² (**D**).....62
- Figura 11 –** Sobrevivência celular após TFA com 10 J cm⁻² na presença de manitol 50 mM, mostrando mortalidade igual àquela observada na ausência dessa molécula (**A**). Géis 2-D de *C. albicans* tratada apenas com o fotossensibilizador (**B**) e após TFA com 10 J cm⁻² (**C**) mostrando extensa modificação no proteoma mesmo na presença de manitol.....64
- Figura 12 –** Comparação da sobrevivência celular de *C. albicans* após TFA com 10 J cm⁻² realizado na presença ou na ausência de azida (**A**), mostrando o efeito de proteção conferido por essa molécula. Géis 2-D de *C. albicans* tratada somente com o fotossensibilizador (**B**) e após TFA com 10 J cm⁻² na presença de azida (**C**) resultando em diminuição dos danos ao proteoma (comparar com Figura 10D).....65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Identificação de spots por MALDI-TOF/TOF MS/MS. Os spots selecionados podem ser visualizados na Figura 2. Números de ponto isoelétrico (pI) e massa molecular representam valores teóricos.....	28
Tabela 2 –	Dez proteínas mais abundantes em conídios de <i>M. acridum</i> identificadas por LC-MS/MS.....	31
Tabela 3 –	Proteínas diferencialmente acumuladas em conídios de <i>M. acridum</i> nas duas condições de crescimento analisadas (Claro e Escuro). Valores de Log ₂ Fold Change negativos indicam regulação negativa, ao passo em que valores positivos indicam regulação positiva.....	36
Tabela 4 –	Spots identificados por MALDI-TOF/TOF MS/MS. A localização de cada spot nos géis 2-D pode ser visualizada na Figura 10.....	66
Tabela 5 –	Conteúdo percentual de cada aminoácido em células expostas somente ao fotossensibilizador (FS Escuro) e em células expostas ao TFA na fluência de 10 J cm ⁻²	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

·OH	Hidroxila radicalar ou radical hidroxila
¹ O ₂	Oxigênio singlete
2-DE	Eletroforese bidimensional
Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico ou aspartato
ATCC	American type culture collection
Cys	Cisteína
ESI-Q-TOF	Electrospray ionization-quadrupole-time-of-flight
FS	Fotossensibilizador
Gln	Glutamina
Glu	Ácido glutâmico ou glutamato
Gly	Glicina
His	Histidina
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
Ile	Isoleucina
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem
Leu	Leucina
Lys	Lisina
MALDI-TOF/TOF	Matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight/time-of-flight
Met	Metionina
MudPIT	Multidimensional protein identification technology
NMBN	New methylene blue N (Novo azul de metileno N)
ORF	Open reading frame
PBS	Phosphate buffered saline (tampão fosfato salina)
Phe	Fenilalanina
Pro	Prolina
RP-UPLC	Reverse phase-ultra high performance liquid chromatography
SCX	Strong cation exchange (cromatografia por troca catiônica)
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
Ser	Serina
TFA	Tratamento fotodinâmico antimicrobiano
Thr	Treonina

Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
UV-A	Ultravioleta-A (315-400 nm)
UV-B	Ultravioleta-B (290-315 nm)
Val	Valina
XIC	Extracted ion chromatogram (cromatograma dos íons extraídos)

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
RESUMEN.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	vii
Capítulo 1 – Introdução Geral.....	1
Introdução.....	2
Capítulo 2 – Abordagem proteômica para identificação de proteínas associadas à tolerância ao estresse em conídios do fungo entomopatogênico <i>Metarhizium acridum</i>.....	3
1. Introdução.....	4
1.1 <i>Metarhizium</i>	4
1.2 Efeitos da luz em fungos.....	6
1.2.1 Resposta à luz azul.....	6
1.2.2 Resposta à luz vermelha e à luz azul.....	8
1.2.3 Relacionando luz e tolerância ao estresse em fungos.....	10
1.3 Estudos proteômicos em fungos.....	11
2. Objetivos.....	15
3. Materiais e Métodos.....	16
3.1 Linhagem de <i>Metarhizium acridum</i>	16
3.2 Crescimento do fungo e produção dos conídios.....	16
3.3 Avaliação da tolerância dos conídios à radiação UV-B.....	16
3.4 Extração de proteína total dos conídios.....	17
3.5 Eletroforese bidimensional.....	18
3.6 Visualização das proteínas e análise de imagens.....	19
3.7 Identificação de spots por MALDI-TOF/TOF MS/MS.....	19
3.8 Avaliação do proteoma por LC-MS/MS.....	21
3.8.1 Análise das amostras e obtenção dos dados.....	21
3.8.2 Análise quantitativa.....	22
3.8.3 Classificação das proteínas identificadas segundo o Gene Ontology.....	23
3.9 Avaliação das influência do momento de iluminação durante o crescimento na produção de conídios com elevada tolerância à radiação UV-B.....	24
3.10 Avaliação do efeito de exposições a diferentes comprimentos de onda (UV-A, azul e vermelho) na indução da tolerância à radiação UV-B.....	25

4. Resultados e Discussão.....	26
4.1 Efeito da luz visível na produção de conídios com elevada tolerância à radiação UV-B.....	26
4.2 Avaliação do acúmulo diferencial de proteínas em conídios de Claro e de Escuro por eletroforese bidimensional (2-DE).....	27
4.3 Avaliação do acúmulo diferencial de proteínas em conídios de Claro e de Escuro por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.....	29
4.3.1 Proteínas identificadas.....	29
4.3.2 Proteínas diferencialmente acumuladas.....	33
4.3.2.1 Determinação das proteínas diferencialmente acumuladas por contagem espectral.....	33
4.3.2.2 Determinação das proteínas diferencialmente acumuladas por intensidade do íon precursor.....	34
4.4 Avaliação de outros parâmetros da fotobiologia de <i>M. acridum</i>	38
4.4.1 Avaliação do momento de iluminação durante o crescimento na produção de conídios com elevada tolerância à radiação UV-B.....	38
4.4.2 Avaliação do efeito de exposições a diferentes comprimentos de onda na indução da tolerância à radiação UV-B.....	42
4.4.2.1 Efeito da luz azul na tolerância à radiação UV-B.....	42
4.4.2.2 Efeito da exposição à radiação UV-A na tolerância à radiação UV-B.....	44
4.4.2.3 Efeito da luz vermelha na tolerância à radiação UV-B.....	45
5. Conclusões.....	47
Capítulo 3 – Estudo proteômico do tratamento fotodinâmico de <i>Candida albicans</i> com o fotossensibilizador Novo azul de metileno N.....	48
1. Introdução.....	49
1.1 <i>Candida albicans</i> e tratamento fotodinâmico.....	49
1.2 Tratamento fotodinâmico e proteômica.....	50
2. Objetivo.....	52
3. Materiais e Métodos.....	53
3.1 <i>C. albicans</i> e condições de crescimento.....	53
3.2 Fotossensibilizador.....	53
3.3 Fonte de luz.....	53
3.4 Tratamento fotodinâmico.....	54
3.5 Sobrevivência celular.....	55
3.6 Extração e quantificação de proteínas.....	55

3.7 Eletroforese bidimensional (2-DE).....	56
3.8 Identificação de proteínas por MS/MS.....	57
3.9 Análise de aminoácidos.....	58
4. Resultados.....	61
4.1 Sobrevivência de <i>C. albicans</i> após o TFA.....	61
4.2 Alterações no proteoma de <i>C. albicans</i> resultantes do TFA.....	62
4.3 Identificação de proteínas por MS/MS.....	65
4.4 Análise de aminoácidos.....	67
5. Discussão.....	69
6. Conclusões.....	75
Apêndices e referências.....	76
Referências.....	77
Apêndices.....	88

Capítulo 1

Introdução Geral

INTRODUÇÃO

O proteoma de um organismo é comumente definido pelas PROTEÍNAS expressas pelo genOMA ou, mais comumente, pelo conjunto de proteínas presentes nesse organismo em um dado momento e sob uma dada condição. O estudo ou a avaliação do proteoma recebe o nome de proteômica. Como as proteínas são consideradas as efetoras celulares, a proteômica é uma importante técnica na elucidação de diversos mecanismos biológicos. No presente trabalho, a proteômica foi a técnica empregada em dois estudos distintos.

No Capítulo 2, apresenta-se o uso da proteômica na avaliação da resposta à luz no fungo entomopatogênico *Metarhizium acridum*. Conforme discutido no capítulo, a luz induz a produção de conídios com elevada tolerância à radiação ultravioleta, uma característica muito importante e muito desejada em fungos que são utilizados no campo como bioinseticidas para o controle biológico de insetos-praga e de vetores de doenças.

No Capítulo 3, a proteômica foi utilizada na avaliação dos danos proteicos causados pelo tratamento fotodinâmico com o fotossensibilizador Novo azul de metileno em *Candida albicans*. O fungo é um importante patógeno em pacientes imunocomprometidos e tem apresentado tolerância aos fungicidas tradicionais. Conforme discutido no capítulo, a morte do fungo ocorre após poucos minutos do início do tratamento, de forma que a proteômica – nesse caso específico – avalia os danos proteicos causados pelas espécies reativas geradas durante o tratamento, e não a resposta do fungo a essas espécies.

Finalmente, apresentam-se as referências e os apêndices utilizados ao longo dos capítulos.

Capítulo 2

Abordagem proteômica para identificação de proteínas associadas à tolerância ao estresse em conídios do fungo entomopatogênico *Metarhizium acridum*

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – *Metarhizium*

O gênero *Metarhizium* é composto por ascomicetos filamentosos entomopatogênicos. Em decorrência dessa característica, muitas espécies são utilizadas no controle biológico de pragas na agricultura, visando-se a substituição – total ou parcial – dos inseticidas químicos (revisto em LORD, 2005). Esse controle é feito através da dispersão, no campo, de formulações contendo conídios do fungo. Em contato com a cutícula do inseto, os conídios iniciam um processo de germinação e invasão do hospedeiro, causando sua morte tanto pelo consumo dos nutrientes da hemolinfa quanto pela produção de metabólitos tóxicos (KERSHAW et al., 1999, SCHOLTE et al., 2004). O sucesso dessa técnica, porém, depende da manutenção da viabilidade desses conídios no campo, que muitas vezes apresenta condições desfavoráveis a isso. Fatores ambientais como a radiação ultravioleta (UV) e as elevadas temperaturas, ambas resultado da exposição à radiação solar, podem causar atraso na germinação dos conídios e até sua completa inativação (BRAGA et al., 2001, RANGEL et al., 2005a). Particularmente a radiação ultravioleta B (UV-B, 290-315 nm) – capaz de interagir diretamente com o DNA – induz a formação de dímeros de pirimidina, que, por sua vez, impedem a germinação do conídio até que sejam reparados os danos (NASCIMENTO et al., 2010). Em suma, atrasos de germinação e inativação dos conídios causados por fatores ambientais são os principais responsáveis pela redução da eficácia no controle biológico.

Em função disso, muitos trabalhos têm buscado aumentar a tolerância de *Metarhizium* ao estresse, alguns deles através de engenharia genética (revisto em ORTIZ-URQUIZA; LUO; KEYHANI, 2015). Por exemplo, Tseng, Chung e Tzean clonaram os genes da via de biossíntese da melanina de *Alternaria alternata* e os inseriram no genoma de *M. anisopliae*. Como a melanina funciona como pigmento fotoprotetor, o resultado foi o aumento da

tolerância à radiação UV-B e também uma maior mortalidade das larvas de *Plutella xylostella* após a irradiação. O aumento da mortalidade se deve a um menor atraso de germinação da linhagem transgênica, que é mais resistente à radiação ultravioleta (TSENG; CHUNG; TZEAN, 2011). De forma semelhante, Fang e St. Leger (2012) – sabendo que *M. robertsii* usa uma fotoliase para reparar os danos causados pela radiação UV-B – clonaram uma fotoliase altamente eficiente da arqueobactéria *Halobacterium salinarum* e a inseriram no genoma do fungo. Novamente o resultado foi um aumento da sobrevivência após exposição à radiação UV-B e, mais uma vez, maior mortalidade de *Anopheles gambiae* (vetor da malária) após a exposição do fungo à radiação (FANG; ST LEGER, 2012).

Apesar das possibilidades e dos resultados obtidos com o uso da engenharia genética, existem outras formas, muitas delas mais simples, de se aumentar a tolerância ao estresse em *Metarhizium*. Sabe-se, por exemplo, que diferentes condições de crescimento são capazes de modular a resistência ao estresse. Conídios de *M. acridum* obtidos de um meio de cultura rico são mais tolerantes à radiação UV-B quando comparados àqueles obtidos através da infecção do gafanhoto *Melanoplus sanguinipes* (RANGEL et al., 2005b). Analogamente, conídios de *M. robertsii* produzidos em meio de cultura suplementado com ácido salicílico apresentam maior termotolerância (RANGEL et al., 2012). Porém, não apenas a constituição do meio de cultura tem papel na tolerância. Fatores físicos presentes durante o desenvolvimento também podem ter um efeito sobre a resistência ao estresse. Um desses fatores é particularmente interessante: a luz. Quando presente durante o desenvolvimento de *M. robertsii*, a luz visível induz a produção de conídios com elevada resistência à radiação UV-B (RANGEL et al., 2011).

1.2 – Efeitos da luz em fungos

A luz visível (400-700 nm) talvez seja o fator ambiental mais importante para muitos fungos, podendo regular diversos processos biológicos como, por exemplo, o tipo de desenvolvimento, a produção de metabólitos secundários e a tolerância ao estresse (revisto em RODRIGUEZ-ROMERO et al., 2010). A luz visível, que compreende diversas regiões espectrais, tem efeito sobre os fungos majoritariamente em duas delas: na região do azul e do vermelho.

1.2.1 – Resposta à luz azul

A resposta à luz em fungos foi inicialmente estudada e caracterizada no ascomiceto *Neurospora crassa*. A linhagem selvagem desse fungo, quando crescida na presença de luz azul (~450 nm) em tubos de cultura, apresenta-se totalmente alaranjada devido à síntese de carotenoides tanto no micélio quanto nos conídios. Mutantes para o gene *wc-1* (*white collar-1*) perdem a capacidade de terem induzida a síntese de pigmentos no micélio, ficando apenas os conídios alaranjados e dando a aparência de um “colar branco” no tubo de cultura, de onde deriva o nome do gene (HARDING; TURNER, 1981). Posteriormente, descobriu-se que o gene *wc-1* codifica para um fator de transcrição do tipo *zinc-finger*, capaz de se ligar a sequências do tipo GATA, além de ter sua própria transcrição regulada pela luz (BALLARIO et al., 1996). Um segundo gene, denominado *wc-2*, também é essencial para a resposta à luz em *N. crassa*. Quando o fungo é estimulado pela luz, WC-1 e WC-2 formam um complexo denominado WCC (*White Collar Complex*), que é responsável pelas respostas ao estímulo luminoso, presumivelmente através da regulação da expressão gênica (TALORA et al., 1999). Apesar das evidências, a conclusão de que uma dessas proteínas era de fato um fotorreceptor só veio em 2002, quando dois trabalhos mostraram que a WC-1 possuía as características necessárias. Froehlich et al. (2012) demonstraram que a WC-1, na presença de luz, liga-se a

regiões específicas denominadas LRE (*Light-Responsive Elements*) nos genes que apresentam transcrição regulada pela luz (FROEHLICH et al., 2002). Simultaneamente, He e colaboradores mostraram que a WC-1 possui um tipo específico de domínio PAS (*Per-Arnt-Sim*) denominado LOV (*Light, Oxygen, Voltage*), que se liga a uma molécula de FAD (flavina adenina dinucleotídeo) com pico de absorção em 450 nm (HE et al., 2002). Analisados juntos, esses dados revelam que a WC-1 é, ao mesmo tempo, um fotorreceptor para a luz azul e um fator de transcrição capaz de se ligar à região promotora de genes regulados pela luz.

Em 2009, uma análise transcriptômica revelou que aproximadamente 5,6% dos genes são regulados pela luz em *N. crassa* e podem ser subdivididos em duas classes: ELRG e LLRG (*Early Light Response Genes* e *Late Light Response Genes*, respectivamente), sendo que os primeiros apresentam pico de transcrição após 15-45 minutos de iluminação e os últimos após 45-90 minutos (CHEN et al., 2009). Os ELRG são regulados diretamente pelo WCC ao passo em que os LLRG são regulados por outros fatores de transcrição, que, porém, têm a sua transcrição regulada pelo WCC, em um claro padrão hierárquico de resposta à luz (CHEN et al., 2009). É interessante notar que genes coregulados geralmente possuem funções biológicas semelhantes. Por exemplo, quatro genes da via de biossíntese de carotenoides apresentam regulação quase idêntica. Com relação à tolerância ao estresse, genes para enzimas de reparo do DNA estão entre os ELRG, ao passo em que aqueles que codificam para enzimas de detoxificação, como catalase e superóxido dismutase, estão entre os LLRG (CHEN et al., 2009).

Em 2014, foi publicado o que talvez seja um dos trabalhos mais importantes sobre o efeito da luz em fungos (WU et al., 2014). Nele, uma análise mais completa, feita por RNA-seq, mostrou que 31% dos genes expressos em *N. crassa* são regulados pela luz. Além disso, muitos dados foram revelados relacionando luz e tolerância ao estresse. De maneira geral, a

luz induz a transcrição de genes das principais vias metabólicas ao mesmo tempo em que causa um estresse oxidativo na célula. Em resposta a esse estresse, é induzida a transcrição de genes associados à produção de pigmentos (por exemplo, carotenoides) e à detoxificação de espécies reativas de oxigênio (catalase, glutathione-S-transferase, glutamato descarboxilase, etc.). Esse resultado é condizente com estudos anteriores que mostraram que a luz é de fato um estresse para a célula fúngica (WANG; YOSHIDA; HASUNUMA, 2007; SMITH et al., 2010). Além disso, Wu e colaboradores mostraram ainda que a luz causa uma repressão de genes para biogênese de ribossomos, o que é uma conhecida resposta celular em condições de estresse (SPRIGGS; BUSHELL; WILLIS, 2010).

1.2.2 – Resposta à luz vermelha e à luz azul

Apesar da resposta à luz azul estar presente em muitos fungos e ser predominante em *N. crassa*, outros organismos são capazes de perceber também a luz vermelha. É o caso do ascomiceto *Aspergillus nidulans*, que possui, além de proteínas homólogas às WC-1 e WC-2 (denominadas LreA e LreB, de *Light response A* e *B*, respectivamente), um fitocromo (FphA, *Fungal phytochrome*), responsável pela resposta à luz vermelha (650~705 nm).

Estudos moleculares já mostraram que a FphA é uma proteína regulatória de dois componentes, exibindo os domínios fotorreceptor e regulatório. Fazem parte do domínio fotorreceptor os domínios PAS, GAF (*cGMP-specific phosphodiesterase; Adenylyl cyclase; Formate hydrogen lyase*) e PHY (*Phytochrome*), além da biliverdina, molécula responsável pela interação com a luz vermelha. Já no domínio regulatório, encontram-se um domínio histidina quinase e um domínio regulador de resposta (RRD – *Response Regulator Domain*) (BRANDT et al., 2008).

O principal papel regulatório desse fitocromo em *A. nidulans* diz respeito à conidiogênese. Ainda na década de 90 foi observado que *A. nidulans* necessita de luz para que

ocorra produção de conídios e que o comprimento de onda responsável por induzir o desenvolvimento assexuado situa-se ao redor de 680 nm (MOONEY; YAGER, 1990). No escuro, o fungo se reproduz sexuadamente através da produção de cleistotécios. Somente mais tarde é que foi descoberto que o fitocromo FphA era o responsável pela repressão do desenvolvimento sexuado sob luz vermelha (BLUMENSTEIN et al., 2005).

Ao contrário do que ocorre com *N. crassa* – que responde quase que unicamente ao azul –, em *A. nidulans* tanto a radiação azul quanto a vermelha têm papel regulatório no desenvolvimento. Em 2008, Purschitz e colaboradores demonstraram a interação entre os receptores para o azul (LreA e LreB) e o receptor para o vermelho (FphA). Essa interação ocorre em dois níveis: genético e molecular. No nível genético, por exemplo, LreA e LreB são ativadoras do ciclo sexuado e são inibidas na presença de luz através da ação da FphA, o que resulta em conidiogênese. No nível molecular, os autores demonstraram a interação direta entre FphA e LreB (PURSCHWITZ et al., 2008). Além disso, partindo do fato que a produção de metabólitos secundários em fungos está intrinsicamente ligada ao desenvolvimento (revisto em CALVO et al., 2002), Purschitz e colaboradores avaliaram ainda a produção do metabólito esterigmatocistina (ST) em resposta à luz. Em *A. nidulans*, a produção de metabólitos secundários é favorecida no escuro. Assim sendo, tanto a luz branca quanto a luz azul apresentaram efeito inibitório sobre a síntese de ST. Por outro lado, a luz vermelha elevou os níveis de ST além daqueles observados no escuro, chegando-se a um máximo de produção em 700 nm (PURSCHWITZ et al., 2008).

A síntese de metabólitos secundários em *A. nidulans* teve um grande avanço em 2004, quando Bok e Keller (2004) descobriram o gene *laeA*, um regulador da síntese de metabólitos secundários como ST, lovastatina, penicilina e gliotoxina (BOK; KELLER, 2004). Como vimos anteriormente, a luz regula a síntese de ST em *A. nidulans*. Assim sendo, de alguma forma o sistema fotorreceptor (LreA-LreB-FphA) deve interagir com a proteína reguladora

LaeA. De fato, existe uma proteína, denominada VeA (*velvet A*), que interage tanto com o sistema fotorreceptor (através da FphA) quanto com a LaeA (revisto em BAYRAM; BRAUS, 2012). Isso confere à VeA uma posição central no que diz respeito à regulação do desenvolvimento e da síntese de metabólitos secundários.

1.2.3 – Relacionando luz e tolerância ao estresse em fungos

No presente trabalho, estamos interessados em descobrir como a luz aumenta a tolerância à radiação UV-B dos conídios de *Metarhizium*. Alguns artigos na literatura fornecem algumas possibilidades e alguns exemplos sobre como esse processo pode ocorrer.

Em *Aspergillus fumigatus*, que possui fotorreceptores para o azul e para o vermelho, uma breve exposição (2h) de colônias jovens (16h de desenvolvimento) à luz branca aumenta a tolerância à radiação UV-B (FULLER et al., 2013). Adicionalmente, a luz azul foi demonstrada como a responsável pelo aumento na tolerância, tendo a luz vermelha virtualmente nenhum efeito. Fuller e colaboradores mostraram ainda que a luz induz a transcrição de genes de reparo do DNA, incluindo genes que codificam para uma fotoliase (*phr1*), uma endonuclease UV (*uvrE*) e uma enzima de reparo de *mismatches*. A regulação positiva da fotoliase pela luz, por exemplo, está presente no tipo selvagem, mas é perdida nos mutantes $\Delta lreA$ e $\Delta fphA$, indicando que ambos os fotorreceptores têm um papel importante na regulação do gene *phr1*. Surpreendentemente, ambos os mutantes citados e também o duplo mutante ($\Delta lreA \Delta fphA$) mantêm o aumento da tolerância à radiação UV-B induzido pela luz (FULLER et al., 2013). Baseados nisso, os autores apontam a possível existência de outro(s) fotorreceptor(es) responsável(is) pelo aumento da tolerância ao estresse induzido pela luz mesmo nos mutantes $\Delta lreA \Delta fphA$.

No fitopatógeno *Colletotrichum acutatum*, o crescimento em fotoperíodo de luz (12:12h claro:escuro) em meio sólido induz a produção de uma mucilagem com absorção na

região do UV (DE MENEZES et al., 2015). Essa mucilagem mostrou características fotoprotetoras quando o fungo foi exposto à radiação UV-B. Além disso, a exposição de conídios lavados (portanto não mais envoltos na mucilagem) à radiação UV-B mostrou que os conídios produzidos na luz são intrinsicamente mais tolerantes que aqueles produzidos no escuro (DE MENEZES et al., 2015). Em mais um trabalho sobre efeito da luz em *C. acutatum*, Yu, Ramkumar e Lee estudaram como as radiações branca, azul, verde e vermelha regulam diversos processos nesse fungo. De maneira geral, a luz azul causou atraso de germinação, aumento da área de lesão causada pelo fungo em folhas, aumento na produção do metabólito scitalona e regulação positiva de um gene da via de síntese de melanina (*scd1*) (YU; RAMKUMAR; LEE, 2013).

A partir da publicação do genoma das espécies *Metarhizium robertsii* e *M. acridum* (GAO et al., 2011), foi possível verificar a presença de homólogos dos genes *lreA*, *fphA* e *veA* de *A. nidulans* em ambas as espécies, o que indica que o gênero *Metarhizium* possui os genes que codificam os fotorreceptores clássicos para resposta à luz. Assim sendo, o presente trabalho buscou identificar, através de uma abordagem proteômica, quais proteínas poderiam acumular-se diferencialmente nos conídios de *M. acridum* em resposta à luz e como esse acúmulo diferencial poderia explicar o aumento da tolerância à radiação UV-B nos conídios produzidos na presença de luz.

1.3 – Estudos proteômicos em fungos

O proteoma de um organismo é comumente definido pelas PROTEÍNAS expressas pelo genOMA ou, mais comumente, pelo conjunto de proteínas presentes nesse organismo em um dado momento e sob uma dada condição (WILKINS et al., 1996; PENG; GYGI, 2001). A proteômica é definida então como o estudo do proteoma. Inicialmente, a maioria dos estudos proteômicos era feita através do emprego de eletroforese bidimensional (2-DE). A 2-DE é

uma técnica de separação de proteínas baseada em duas propriedades proteicas: ponto isoelétrico e massa molecular.

O ponto isoelétrico de uma proteína corresponde ao valor de pH do meio no qual a carga total dessa proteína é zero. Naturalmente, esse valor depende do balanço entre aminoácidos básicos (Arg, Lys e His) e ácidos (Asp e Glu). A separação de proteínas por ponto isoelétrico é feita através de uma técnica denominada focalização isoelétrica. A focalização isoelétrica é uma eletroforese (migração de cargas em um campo elétrico) feita sobre um gel com gradiente de pH. Assim, cada proteína migra no gel até que atinja uma região de pH na qual sua carga é zero. Nesse momento, como não há mais carga, a migração para.

O valor de massa molecular de uma proteína depende quase que unicamente de sua composição de aminoácidos (excetuando-se eventuais grupos prostéticos e modificações pós-traducionais, como glicosilações e fosforilações). A separação, nesse caso, é feita através da incorporação às proteínas de dodecil sulfato de sódio (SDS), um tensoativo de carga negativa. O SDS confere a todas as proteínas uma carga negativa, permitindo uma migração massa-dependente que não é influenciada pela carga nativa das proteínas. Além disso, o SDS limita a formação de dímeros, trímeros, etc.

A combinação sequencial dessas duas técnicas resulta em géis bidimensionais, nos quais cada spot idealmente representa uma única proteína. Géis de diferentes tratamentos podem então ser comparados e as proteínas contidas nos spots de interesse identificadas por espectrometria de massas (MS). Toda identificação de proteínas por MS baseia-se no método de Mann e Wilm publicado em 1994 (MANN; WILM, 1994).

A combinação de 2-DE e espectrometria de massas já foi usada para estudar o proteoma dos conídios de alguns fungos. Qin e colaboradores identificaram 24 proteínas de conídios do entomopatógeno *Nomuraea rileyi*, ao passo em que Noir e colaboradores

identificaram 124 proteínas dos conídios do fitopatógeno *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (QIN et al., 2009, NOIR et al., 2009). Em nosso laboratório, essa técnica foi usada para comparar os proteomas de conídios e micélio de *M. acridum*. Apesar das diferenças observadas, somente 23 proteínas foram identificadas, sendo sete de conídios, 15 de micélio e uma comum a ambas as estruturas (BARROS et al., 2010). Em todos os casos, fica evidente a relativa baixa quantidade de proteínas identificadas. A isso, soma-se ainda o fato de que a 2-DE é uma técnica laboriosa e de baixa sensibilidade. Por isso, a 2-DE – apesar de ainda encontrar aplicações específicas (revisto em ROGOWSKA-WRZESINSKA et al., 2013) – vem sendo substituída por técnicas baseadas em cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) (revisto em BAGGERMAN et al., 2005).

A proteômica por LC-MS/MS apresenta algumas vantagens sobre a 2-DE, principalmente no que diz respeito à sensibilidade e à possibilidade de se identificarem várias proteínas em um único experimento (revisto em BAGGERMAN et al., 2005). A popularidade da técnica cresceu consideravelmente a partir de 2001, quando Washburn, Wolters e Yates III detectaram e identificaram 1484 proteínas de *Saccharomyces cerevisiae* (WASHBURN; WOLTERS; YATES III, 2001). Além disso, os autores demonstraram, através da identificação de 131 proteínas com domínios transmembranares, que a LC-MS/MS é superior à 2-DE no que diz respeito à análise de proteínas de membrana, uma conhecida limitação das técnicas de eletroforese (WASHBURN *et al.* 2001). A LC-MS/MS já foi usada para identificação de proteínas dos conídios de alguns fungos, incluindo *Trichophyton rubrum* (1026 proteínas identificadas) e *Uromyces appendiculatus* (468 proteínas identificadas) (LENG et al., 2008, COOPER; GARRETT; CAMPBELL, 2006).

Naturalmente, a LC-MS/MS também apresenta capacidades quantitativas (revisto em WILM, 2009). Apesar de muitas das técnicas quantitativas dependerem da marcação isotópica diferencial das proteínas ou dos peptídeos de diferentes amostras, existe um procedimento de

quantificação, denominado *label-free* (ou seja, sem marcação), que dispensa o uso desses marcadores (revisto em ZHU; SMITH; HUANG, 2010, EVANS et al., 2012). Em função do baixo custo decorrente do não uso de marcadores, essa técnica de quantificação vem ganhando espaço nos trabalhos de proteômica, com um grande número de ferramentas à disposição (revisto em NANHSEN et al., 2013).

A proteômica, apesar de ser uma técnica amplamente empregada em estudos da resposta de fungos ao estresse (revisto em KROLL; PÄHTZ; KNIEMEYER, 2014), não tem sido usada na elucidação da resposta à luz visível. Uma exceção deve ser feita para um recente trabalho em *Penicillium verrucosum*. Stoll e colaboradores, empregando 2-DE, demonstraram que a luz azul (450 nm) induz um aumento da quantidade de proteínas associadas à tolerância ao estresse, modifica a síntese de micotoxinas e atrasa o crescimento do fungo (STOLL et al., 2014). Conforme previamente mencionado, os resultados estão de acordo com o papel da luz na regulação de tolerância ao estresse, produção de metabólitos secundários e desenvolvimento.

2 – OBJETIVOS

- 1) Identificar, através de uma abordagem proteômica, proteínas diferencialmente acumuladas em conídios de *M. acridum* quando crescido tanto na presença quanto na ausência de luz visível.
- 2) Avaliar o efeito de diferentes parâmetros de iluminação, principalmente tempo de irradiação e faixa espectral da luz utilizada, no aumento da tolerância à radiação UV-B.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Linhagem de *Metarhizium acridum*

A linhagem ARSEF 324 de *M. acridum* foi obtida da “USDA-ARSEF Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures” (U.S. Plant, Soil and Nutrition Laboratory, Ithaca, NY).

3.2 – Crescimento do fungo e produção dos conídios

O crescimento do fungo foi realizado em 23 ml de meio “Potato Dextrose Agar” (PDA) (Difco, EUA), acrescido de 0,5% (p/v) de extrato de levedura (Difco, EUA), em placas de Petri (90 × 15 mm). As placas foram inoculadas com 100 µL de suspensão de conídios (10^7 conídios ml⁻¹) e incubadas a 28 °C, em duas situações alternativas de iluminação: com períodos de claro:escuro de 12 h de duração cada, ou em completa escuridão, por 14 dias.

A iluminação foi fornecida por duas lâmpadas fluorescentes Osram L15W/765 (Osram, Alemanha), suspensas a 25 cm das placas. A irradiância total das lâmpadas, medida de 400 a 700 nm, foi de 5,7 W m⁻². Durante todo o crescimento, o material irradiado permaneceu coberto com um filme de diacetato de celulose de 0,13 mm de espessura (JCS Industries, Le Mirada, CA, EUA) para evitar a desidratação do meio.

Após o crescimento, os conídios foram removidos cuidadosamente com um “cell scraper” (TPP, Suíça) e usados imediatamente ou mantidos a -20 °C até a utilização. Este armazenamento em freezer só foi usado para os experimentos de proteômica.

3.3 – Avaliação da tolerância dos conídios à radiação UV-B

Determinaram-se as tolerâncias à radiação UV-B, tanto dos conídios produzidos na presença, como dos conídios produzidos na ausência de luz. Os conídios foram suspensos em solução 0,01% (v/v) de Tween 80 (Sigma-Aldrich Chemie, EUA) e a concentração foi ajustada para 10^4 conídios ml⁻¹. Uma alíquota de 80 µL da suspensão foi colocada sobre 6 mL

de meio PDAY (Potato Dextrose Agar – Yeast Extract) – em placas de petri, $6,0 \times 1,0$ cm – e espalhada uniformemente. Foram preparadas quatro placas-réplica para cada tratamento e tempo de exposição, além dos controles. As placas foram então expostas à irradiância de 1.900 mW m^{-2} de UV-B (dosada por meio do espectro de ação proposto por Quate, Sutherland e Sutherland, 1992) por quatro e cinco horas (doses finais de 27,4 e 34,2 kJ m^{-2} , respectivamente), sendo os controles mantidos dentro da câmara de exposição, porém cobertos com papel alumínio. Como fonte de radiação UV foram utilizadas duas lâmpadas fluorescentes UV-B (TL 20W/RS, Philips, Holanda), com pico de emissão em 313 nm. Durante as exposições, as placas foram cobertas com uma membrana de diacetato de celulose de 0,13 mm de espessura, que bloqueia comprimentos de onda abaixo de 290 nm, evitando assim que a UV-C residual das lâmpadas interferisse no experimento. Após a exposição, as placas foram mantidas a 28 °C. A tolerância à radiação UV-B foi avaliada através da contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) em cada tratamento, relacionando-as aos respectivos controles para determinação da sobrevivência relativa. As contagens foram feitas com 24, 48 e 72 h. Os dados de contagem de três experimentos independentes foram analisados no programa GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, Califórnia, EUA). Foram consideradas estatisticamente significativas as diferenças entre médias que resultassem em $P < 0,05$ no teste t de Student.

3.4 – Extração de proteína total dos conídios

Para cada tratamento (claro ou escuro), foram usados 50 mg de conídios em microtubos de 1,5 ml. O número de tubos em cada tratamento variou de acordo com a quantidade de proteína requerida para cada experimento. A cada tubo foram adicionados 500 μL de tampão de solubilização de proteínas (Tris-HCL 5 mM pH 8, glicerol 1% e EDTA 1 mM) e o mesmo volume de pérolas de vidro 425-600 μm (Sigma, EUA). Os tubos foram

agitados em vortex por 1 minuto e incubados no gelo por 5 minutos. O ciclo foi repetido cinco vezes. Os tubos foram então centrifugados a $1000 \times g$ por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi removido e purificado pela adição de 6 volumes de acetona e precipitação overnight a -20 °C. Em seguida, os tubos foram centrifugados a $20000 \times g$ por 5 minutos, a 4 °C, para remoção do sobrenadante. O precipitado obtido ao final da purificação foi ressuspenso em 40 µL de solução de reidratação, contendo uréia 7 M, tiouréia 2 M, CHAPS 4%, IPG buffer 3-10 NL (GE Healthcare) 0,5% (v/v), ditioneitol (DTT) 40 mM, azul de bromofenol (Sigma) 0,002% e inibidor de protease (GE Healthcare). A concentração de proteínas foi determinada pelo 2D-Quant Kit (GE Healthcare, Suécia) e as amostras foram estocadas a -80 °C até o uso.

3.5 – Eletroforese bidimensional

Para a focalização isoeletrica, foram utilizadas strips de 13 cm pH 3-11 NL (GE Healthcare), reidratadas com solução de reidratação contendo 280 µg de proteína por 15-20 h. O processo de focalização se deu em equipamento Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare), a 20 °C, com corrente limitada a 50 µA/strip e de acordo com o seguinte protocolo: 1 h a 500 V (step and hold), 1 hora a 1.000 V (gradient), 2,5 h a 8.000 V (gradient) e o último passo a 8.000 V (step and hold) até um total de 20-25 kVh. Após a focalização, as strips foram equilibradas por 15 min em tampão contendo Tris-HCl 75 mM pH 8,8, uréia 6 M, glicerol 30%, SDS 2% e 1% (p/v) DTT e, em seguida, no mesmo tampão, substituindo-se DTT por 2,5% (p/v) de iodocetamida, novamente por 15 min. A separação na segunda dimensão foi feita em gel 12,5% SDS-PAGE em cuba de eletroforese SE 600 Ruby (GE Healthcare), com tampão de eletroforese contendo 25 mM Tris, 192 mM glicina e 0,1% SDS. Marcadores de massa molecular (GE Healthcare) foram adicionados em todos os géis.

3.6 – Visualização das proteínas e análise das imagens

Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue G-250 (USB Corporation, EUA). As proteínas foram primeiramente fixadas no gel por 1 hora em solução 40% etanol e 10% ácido acético. Em seguida, a solução foi decantada e substituída por solução 0,08% Coomassie, 8% sulfato de amônio, 0,8% ácido fosfórico e 20% metanol. Os géis foram corados nessa solução por 65 h. Em seguida, os géis corados foram escaneados com o Labscan Software (GE Healthcare). O programa Image Master 2D Platinum 6.0 (GE Healthcare) foi usado para as análises das imagens. Para cada tratamento (conídios produzidos no escuro ou na presença de luz visível), um total de três géis obtidos de três amostras biológicas independentes foi analisado na busca por proteínas diferencialmente expressas em cada condição de crescimento. Foram considerados estatisticamente diferentes os spots com razão (calculada pela fração de uma condição de crescimento sobre a outra) maior ou igual a dois, ou menor ou igual a 0,5.

3.7 – Identificação de spots por MALDI-TOF/TOF MS/MS

Todos os reagentes empregados foram obtidos da Sigma exceto onde especificado. Os spots de interesse foram excisados dos géis manualmente com ajuda de um bisturi estéril. Os spots foram descorados e as proteínas presentes nesses spots foram digeridas com tripsina tendo como base o protocolo de Shevchenko et al. (2006). Resumidamente, cada spot, após excisão, foi colocado em um microtubo de 0,5 ml e descorado por sucessivas lavagens com 100 µL de solução bicarbonato de amônio 0,1 M / acetonitrila 50%, sendo 10 minutos por lavagem. Com o spot já bastante descorado, foram adicionados 100 µL de acetonitrila pura e incubou-se por 10 minutos. Após remoção da acetonitrila, o spot foi seco em centrífuga a vácuo por 20 minutos e foi adicionada solução bicarbonato de amônio 0,1 M em volume suficiente para cobrir o spot. Adicionou-se então 0,5 µg de tripsina modificada (Promega,

Madison, EUA) em 20 μ l de bicarbonato de amônio 0,1 M e, após reidratação do spot (aproximadamente 30 a 45 minutos), foi adicionada novamente solução bicarbonato de amônio 0,1 M em volume suficiente para cobrir o spot. Incubou-se a 37 °C por 24 h para digestão. Decorrido esse tempo, foram adicionados 5 μ L de ácido fórmico (grau HPLC) para acidificar o meio e assim interromper a reação. Todos os tubos foram armazenados a 4 °C por 24 h para eluição natural dos peptídeos do gel para a solução. Decorrido esse tempo, os peptídeos em solução foram dessalificados em resina C₁₈ (POROS® 50 R2 Reverse-Phase Packing, Perseptive Biosystems, Foster City, EUA) e secos em centrífuga a vácuo (Speed Vac, New York, EUA). Aos peptídeos secos, foram adicionados 6 μ l da matriz CHCA (5 mg ml⁻¹, α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, minimum 99%, Sigma) em acetonitrila 50% / ácido trifluoroacético 0,1%. Finalmente, 2 μ l foram aplicados em placa de MALDI (*target*) para análise por MALDI-TOF/TOF MS/MS (Axima Performance, Shimadzu Biotech, Reino Unido). Os espectros de MS foram obtidos no modo reflectron positivo e os dez íons mais intensos foram selecionados para colisão induzida (MS/MS). Os íons tiveram suas relações m/z determinadas em relação a padrão de calibração (Protein MALDI-MS Calibration Kit, Sigma). Os resultados foram analisados pelo programa Lanchpad 2.8.3 (Kratos-Shimadzu, Reino Unido). As identificações foram obtidas após busca no MASCOT (Matrix Science, Reino Unido) contra a base de dados derivada do genoma de *M. acridum* (GAO et al., 2011) obtida do UniProtKB (taxonomy: 655827, 9830 proteínas). Os demais parâmetros foram: taxonomy “all entries”, enzyme “trypsin”, up to 1 missed cleavage, fixed modification “carbamidomethyl (C)”, variable modification “oxidation (M)”, peptide tolerance “1.2 Da”, MS/MS tolerance “0.8 Da”, peptide charge “+1” e “average masses”.

3.8 – Avaliação do proteoma por LC-MS/MS

3.8.1 – Análise das amostras e obtenção dos dados

Todos os reagentes empregados foram obtidos da Sigma exceto onde especificado. Para cada experimento, foram utilizados 600 µg de proteína de cada condição de crescimento divididos em dois tubos com 300 µg cada (duplicata técnica), totalizando quatro amostras analisadas por experimento. Assim sendo, para cada amostra, 300 µg de proteína em tampão ureia 7 M, tiourea 2 M e CHAPS 4% foram precipitados pela adição de 6 volumes de acetona gelada (-20 °C) e ressuspensos em 30 µl desse mesmo tampão. Esse passo inicial foi realizado para concentração das amostras em volume reduzido. Para redução das ligações dissulfeto, foram adicionados 5 µl de uma solução ditioneitol 45 mM e as amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 2 h. Para alquilação das cisteínas, foram usados 5 µl de iodoacetamida 100 mM e as amostras foram incubadas à temperatura ambiente, no escuro, por 20 minutos. Após esse período, as amostras foram diluídas pela adição de 160 µl de tampão bicarbonato de amônio 0,1 M. Em seguida, foram adicionados 1,5 µg de tripsina (grau sequenciamento V5111, Promega, Madison, EUA) e incubou-se por 24 h a 37 °C. A reação de digestão foi então interrompida pela adição de 5 µl ácido fórmico grau HPLC.

A solução resultante, contendo os peptídeos, foi então fracionada por troca catiônica (SCX – *Strong Cation Exchange*), injetando-se o volume total (pouco mais de 200 µl) em uma coluna PolyLC PolySULFOETHYL, 100 × 4,6 mm, 5 µm, 200 Å. A eluição foi feita segundo o seguinte gradiente: 0% de B por 5 minutos, 0-35% de B por 65 minutos e 35-70% de B por 5 minutos (A = 5 mM formato de amônio pH 3,2 em 20% acetonitrila; B = 500 mM formato de amônio pH 3,2 em 20% acetonitrila). O fluxo foi ajustado para 1 ml min⁻¹ e as frações foram coletadas. A eluição dos peptídeos da coluna foi acompanhada espectrofotometricamente por meio da medida de absorbância em 280 nm. (Entre as análises das amostras foi feita uma lavagem da coluna com 100% de B por 10 minutos e, em seguida,

analisou-se um branco, ou seja, uma corrida sem injeção de amostra). As frações com maior quantidade de peptídeos de acordo com o monitoramento foram então secas em centrífuga a vácuo. O conteúdo foi então ressuspensão em 20 µl de solução 0,1% ácido fórmico em 5% acetonitrila e analisado por LC-MS/MS.

As frações foram injetadas em um nanoHPLC (Waters, Manchester, Reino Unido) com coluna de fase reversa acoplado a um ESI-Q-TOF MS/MS (*Electrospray Ionization – Quadrupole – Time of Flight Mass Spectrometry/Mass Spectrometry*). A coluna utilizada é uma Vydac C18, 100 µm × 100 mm, 5 µm, 300 Å. Para eluição, foi usado um gradiente linear de 5 a 95% de B durante 50 minutos (A = 0,1% ácido fórmico em 5% acetonitrila; B = 0,1% ácido fórmico em 95% acetonitrila). Os eluídos da coluna C18 foram diretamente analisados por MS/MS usando uma fonte de electrospray a 2,5 kV, voltagem do cone de 40 V e temperatura da fonte 100 °C. Os espectros foram obtidos em modo data-dependente.

3.8.2 – Análise quantitativa

Os dados RAW (dados brutos não processados) do espectrômetro de massas foram analisados usando-se o programa MASCOT Distiller (Matrix Science, Reino Unido). Brevemente, todos os dados referentes a uma mesma corrida foram carregados no programa em modo “memory efficient”. Em seguida, foi feita uma busca para identificação das proteínas utilizando-se a função “Process and Search”. A busca foi feita contra uma base de dados obtida do UniProtKB (taxonomy: 655827) por meio da tradução das ORF do genoma de *M. acridum* (GAO et al., 2011), com os seguintes parâmetros de busca: quantitation Average [MD], enzyme trypsin, up to 1 missed cleavage, carbamidomethyl (C) como modificação fixa, oxidation (M) como modificação variável, peptide tolerance 1.2 Da, MS/MS tolerance 0.8 Da, peptide charge +1, ESI-QUAD-TOF como instrumento e average masses. Em seguida, foi utilizada a função “Analysis > Calculate XIC” para se obter os

cromatogramas dos íons extraídos (XIC). Foi feita então a quantificação usando-se “Analysis > Quantitate” e a opção “All families”. Os resultados dessa quantificação foram obtidos em formato XML através da opção “Analysis > Quantitative Report > Save complete XML”. O mesmo procedimento foi repetido para todas as corridas no LC-MS/MS.

Os dados obtidos ao final de todas as análises (em formato XML) foram carregados no Scaffold 4.0.7 (Proteome Software, Portland, EUA). Todos os arquivos referentes ao crescimento do fungo no escuro ou no claro foram combinados utilizando-se, para isso, a opção “MudPIT”. Os seguintes critérios foram adotados para identificação das proteínas: 99% protein threshold, 1.0% peptide FDR e no mínimo 2 peptídeos por proteína.

A quantificação por contagem espectral foi realizada pelo próprio Scaffold através do teste exato de Fisher, aceitando-se as diferenças entre claro e escuro que resultassem em $P < 0,05$.

A quantificação por intensidade do íon precursor foi feita no Scaffold Q+ através dos testes de Mann-Whitney e de permutação. Só foram aceitas as diferenças entre claro e escuro que resultassem em $P < 0,05$ em ambos os testes.

3.8.3 – Classificação das proteínas identificadas segundo o Gene Ontology

As proteínas identificadas pelo Scaffold tiveram seus números de acesso obtidos através de exportação dos dados utilizando-se a opção “Export > Protein Reports > Protein Report...”. Os números de acesso foram utilizados na obtenção das sequências dessas proteínas (em formato FASTA) no UniProtKB. As sequências foram então carregadas no programa Blast2GO 3.0 (CONESA et al., 2005). A classificação segundo o Gene Ontology foi feita de acordo com instruções do próprio programa.

3.9 – Avaliação da influência do momento de iluminação durante o crescimento na produção de conídios com elevada tolerância à radiação UV-B

Conídios foram produzidos conforme descrito no item 2 desta seção, porém somente por 7 dias. Ao final do sétimo dia, placas que até então estavam expostas ao fotoperíodo de luz foram transferidas para o escuro e placas que até então estavam no escuro foram transferidas para o fotoperíodo. Algumas placas foram mantidas em sua condição original, servindo como controles.

Ao final do 14º dia, os conídios foram coletados e suspensos em solução 0,01% (v/v) de Tween 80 (Sigma, EUA) e a concentração foi ajustada para 10^4 conídios ml^{-1} . Uma alíquota de 80 μl da suspensão foi colocada sobre 6 ml de meio PDAY (Potato Dextrose Agar – Yeast Extract) – em placas de petri, $6,0 \times 1,0$ cm – e espalhada uniformemente. Foram preparadas quatro placas para cada tratamento e tempo de exposição, além dos controles. As placas foram então expostas à irradiância de 1.900 mW m^{-2} de UV-B (a irradiância foi determinada por meio do espectro de ação proposto por Quate, Sutherland e Sutherland, 1992) por quatro horas (fluência final de $27,2 \text{ kJ m}^{-2}$), sendo os controles mantidos dentro da câmara de exposição, porém cobertos com papel alumínio. Como fonte de radiação UV foram utilizadas duas lâmpadas fluorescentes UV-B (TL 20W/RS, Philips, Holanda), com pico de emissão em 313 nm. Durante as exposições, as placas foram cobertas com uma membrana de diacetato de celulose de 0,13 mm de espessura, que bloqueia comprimentos de onda menores que 290 nm, evitando assim que a UV-C residual das lâmpadas interferisse no experimento. Após a exposição, as placas foram mantidas a 28°C . A tolerância à radiação UV-B foi avaliada através da contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) em cada tratamento, relacionando-as aos respectivos controles para determinação da sobrevivência relativa. As contagens foram feitas com 48 e 72 h. Os dados de contagem de três experimentos independentes foram analisados no programa GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software,

Califórnia, EUA) utilizando-se análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. Foram consideradas estatisticamente significativas as diferenças entre médias que resultassem em $P < 0,05$.

3.10 – Avaliação do efeito de exposições a diferentes comprimentos de onda (UV-A, azul e vermelho) na indução da tolerância à radiação UV-B

O fungo foi crescido conforme descrito anteriormente. Somente conídios de colônias crescidas no escuro foram usados neste experimento. Ao final do 14º dia, os conídios foram coletados e suspensos em solução 0,01% (v/v) de Tween 80 (Sigma-Aldrich Chemie, EUA) e a concentração foi ajustada para 10^4 conídios ml^{-1} . Uma alíquota de 80 μl da suspensão foi colocada sobre 6 ml de meio PDAY (Potato Dextrose Agar – Yeast Extract) – em placas de petri, $6,0 \times 1,0$ cm – e espalhada uniformemente. As placas foram incubadas no escuro a 28 °C, por 26 h. Decorrido esse tempo, as colônias do fungo que seriam induzidas foram colocadas sob uma das seguintes fontes de luz: lâmpadas fluorescentes brancas com irradiância de $5,7 \text{ W m}^{-2}$, uma placa de LED azul (emissão em 400 nm), uma placa de LED vermelho (emissão em 650 nm) ou lâmpadas fluorescentes UV-A (pico de emissão em 370 nm; Phillips, Holanda) por duas horas. Controles foram mantidos no escuro. Ao final do tempo de indução, as placas foram expostas por 2,5 h à radiação UV-B, conforme descrito anteriormente. Placas induzidas e não expostas à radiação UV-B também foram avaliadas com o objetivo de observar o efeito da indução no crescimento das colônias. Após a exposição, as placas foram incubadas a 28 °C no escuro e fotografadas após 72 h (utilizando-se estereomicroscópio) e 96 h.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Efeito da luz visível na produção de conídios com elevada tolerância à radiação UV-B

Primeiramente, é importante notar que, ao contrário do que ocorre em *A. nidulans* (MOONEY; YAGER, 1990), a conidiogênese em *Metarhizium* independe da luz, ou seja, os conídios são produzidos em igual número tanto na sua presença quanto na sua ausência (RANGEL et al., 2011). Apesar disso, o crescimento de *M. acridum* em fotoperíodo (12:12h claro:escuro) induz a produção de conídios que, quando expostos à radiação UV-B, apresentam maior sobrevivência comparativamente àqueles produzidos pelo fungo crescido na ausência de luz (Figura 1; para efeitos práticos, a condição de crescimento em fotoperíodo será referida como Claro e aquela de crescimento na ausência de luz será referida como Escuro).

Figura 1 – Sobrevivência relativa após exposição por quatro e cinco horas à radiação UV-B dos conídios produzidos em fotoperíodo [Claro (12/12h)] e na ausência de luz (Escuro). Barras de erro representam desvio padrão de três experimentos independentes

Como pode ser observado, a sobrevivência dos conídios produzidos por colônias expostas à luz (Claro) é pelo menos duas vezes maior que aquela dos conídios produzidos por colônias crescidas no escuro (Escuro) após quatro horas de exposição, chegando a ser quatro vezes maior após cinco horas de exposição à radiação UV-B.

Uma vez que esses conídios não apresentam evidentes diferenças morfológicas ou de pigmentação, supôs-se que a diferença na tolerância à radiação UV-B fosse o resultado do acúmulo diferencial de proteínas nos conídios de Claro e de Escuro. Esse possível acúmulo diferencial foi inicialmente avaliado por 2-DE.

4.2 – Avaliação do acúmulo diferencial de proteínas em conídios de Claro e de Escuro por eletroforese bidimensional (2-DE)

Após a realização de três experimentos totalmente independentes, a análise de imagem dos géis revelou que não havia diferenças entre os spots de Claro e de Escuro (Figura 2). Os géis 2-D utilizados na análise podem ser encontrados no Apêndice A.

Figura 2 – Géis 2-D de conídios de *M. acridum* produzidos no claro (A) e no escuro (B). Análise de imagens dos géis obtidos em três experimentos independentes demonstrou que não havia diferença estatisticamente significativa entre Claro e Escuro

Apesar da hipótese inicial de que haveria um acúmulo diferencial de proteínas, o resultado dos géis não é de todo inesperado. A proteômica, de maneira geral, encontra limitações no que diz respeito à sensibilidade, principalmente quando comparada, por exemplo, à transcriptômica (WANG et al., 2013). Os géis obtidos contêm aproximadamente 400 spots, um número que representa apenas 4% do proteoma teórico (9.830 proteínas) do fungo. Esse percentual deve diminuir ainda mais quando for considerado que alguns spots em um gel 2-D representam isoformas e/ou diferentes padrões de fosforilação de uma mesma proteína.

Apesar dessa clara limitação, foram analisados oito spots (1 a 8, Figura 2) por MALDI-TOF/TOF MS/MS e todas as proteínas foram identificadas. Os resultados estão mostrados na Tabela 1 e serão discutidos mais adiante.

Tabela 1 – Identificação de spots por MALDI-TOF/TOF MS/MS. Os spots selecionados podem ser visualizados na Figura 2. Números de ponto isoelétrico (pI) e massa molecular representam valores teóricos

ID Spot	Proteína	Gene	UniProtKB	MASCOT Score	pI	Massa Molecular (Da)
1	Carboxylesterase family protein	MAC_09145	E9EGZ7	795	4,98	65515
2	Mitochondrial aconitate hydratase, putative	MAC_01681	E9DVN3	239	6,18	88047
3	Transketolase	MAC_01145	E9DU47	105	5,98	75490
4	Lcc2	MAC_02006	E9DWK8	143	6,26	76698
5	Putative enolase	MAC_04594	E9E3Z6	167	5,02	47561
6	Heat shock protein 30	MAC_06364	E9E916	245	5,46	22354
7	Putative uncharacterized protein	MAC_09586	E9EI88	177	5,08	19517
8	Phenazine biosynthesis protein, putative	MAC_03439	E9E0P1	148	5,65	34545

Devido à impossibilidade de se analisar quaisquer diferenças entre os proteomas de Claro e de Escuro por 2-DE, tentou-se uma análise por LC-MS/MS, que teria como principal vantagem uma maior sensibilidade.

4.3 – Avaliação do acúmulo diferencial de proteínas em conídios de Claro e de Escuro por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS)

Nossos experimentos de LC-MS/MS foram marcados pela alta variabilidade encontrada entre réplicas técnicas e biológicas (discutido no Apêndice C). A análise de três experimentos independentes, com duplicata técnica em cada um deles, resultou em um total de seis corridas para Escuro e seis para Claro. Os dados referentes a essas seis corridas para cada amostra foram combinados antes da comparação entre Claro e Escuro. Dessa forma, atenua-se o fato de que a maioria das proteínas não foi encontrada em todos os experimentos (Apêndice C), ao mesmo tempo em que se aumenta o número de proteínas identificadas, este último um conhecido efeito de se combinar os dados de diversas análises (COOPER; FENG; GARRETT, 2010).

4.3.1 – Proteínas identificadas

A análise por LC-MS/MS, como dito anteriormente, permite a identificação de centenas ou até milhares de proteínas em um único experimento. Assim sendo, após três experimentos independentes com duplicatas técnicas em cada um deles, foram identificadas 501 proteínas em conídios de *M. acridum* (Apêndice B). Esse número não pode ser considerado muito acima daquele que seria obtido pela análise de todos os spots dos géis 2-D (novamente considerando-se que cada spot representaria uma proteína diferente). Por exemplo, Teutschbein e colaboradores identificaram 449 proteínas de *Aspergillus fumigatus* usando 2-DE associada à espectrometria de massas (TEUTSCHBEIN et al., 2010). Como

foram utilizadas quantidades iniciais de proteína muito próximas (280 µg para 2-DE e 300 µg para LC-MS/MS), a LC-MS/MS não pode, em nosso caso específico, ser considerada uma técnica de sensibilidade muito maior. Isso decorre, provavelmente, da menor sensibilidade do equipamento utilizado (ESI-Q-TOF) frente aos mais novos espectrômetros de massas.

As 501 proteínas identificadas foram classificadas de acordo com o *Gene Ontology* utilizando-se o programa Blast2GO 3.0 (CONESA et al., 2005). Os resultados estão mostrados na Figura 3.

Figura 3 – Classificação das proteínas identificadas segundo o Gene Ontology na categoria processo biológico (*biological process*). Somente as classes que atingiram 2% do total estão mostradas

É fácil observar como as proteínas acumuladas nos conídios participam, em grande parte, dos processos metabólicos e celulares dessa estrutura. Esse resultado é o esperado para uma estrutura como o conídio, que deve acumular as proteínas necessárias para a germinação. Além disso, observou-se que uma considerável parcela das proteínas participa de processos como regulação biológica e resposta a estímulos.

Além da classificação mostrada na Figura 3, foi feita a análise das dez proteínas mais abundantes presentes nos conídios (Tabela 2).

Tabela 2 – Dez proteínas mais abundantes em conídios de *M. acridum* identificadas por LC-MS/MS

ID	Proteína	Gene	UniProtKB	Número Médio de Espectros	% do Total de Espectros
1	Tyrosinase	MAC_02956	E9DZA8	242	1,30
2	Putative uncharacterized protein	MAC_07308	E9EBR0	153	0,82
3	Catalase	MAC_05389	E9E691	146	0,79
4	Catalase- peroxidase	KATG	E9E8S1	146	0,79
5	Carboxylesterase family protein	MAC_09145	E9EGZ7	140	0,75
6	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	MAC_05273	E9E5X5	128	0,69
7	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	MAC_03621	E9E173	122	0,66
8	Heat shock protein 70	MAC_02927	E9DZ79	106	0,57
9	Putative uncharacterized protein	MAC_05425	E9E6C7	103	0,55
10	Putative enolase	MAC_04594	E9E3Z6	100	0,54

Como pode ser observado, a tirosinase (MAC_02956) é, por larga margem, a proteína mais abundantes nos conídios. St. Leger, Charnley e Cooper já observaram que o crescimento de *M. anisopliae* em meio sólido e na presença de compostos fenólicos tóxicos resulta no aparecimento de um pigmento semelhante à melanina ao redor das colônias. Nessa situação, o micélio permanece hialino, indicando que o fungo exporta uma tirosinase para o meio extracelular com o objetivo de oxidar os compostos fenólicos, polimerizando-os (ST LEGER; CHARNLEY; COOPER, 1988). Isso ocorre porque os compostos fenólicos inibem o crescimento do fungo, e sua polimerização a polifenóis reduz esse efeito. A ocorrência dessa

proteína em grandes quantidades nos conídios pode ser importante para a virulência, uma vez que fenóis são encontrados na cutícula de insetos (ANDERSEN, 1971).

A segunda proteína mais abundante presente nos conídios (“putative uncharacterized protein”, MAC_07308) é homóloga à lectina FleA de *Aspergillus fumigatus* (identidade 38%). Essa proteína foi caracterizada por Kuboi e colaboradores como sendo a responsável pela aglutinação de hemácias humanas na presença de um extrato bruto obtido do micélio de *A. fumigatus*. Os autores especulam ainda que essa lectina possa estar envolvida na adesão do patógeno às células do hospedeiro, apesar de o seu papel na patogenicidade não ter sido elucidado (KUBOI et al., 2013). De maneira semelhante, é possível que a proteína identificada em *M. acridum* esteja também envolvida na adesão dos conídios aos insetos.

A catalase (MAC_05389) encontrada nos experimentos é homóloga à Cat-1 de *N. crassa*, uma catalase que corresponde a 0,6% do total de proteína nos conídios (DÍAZ et al., 2001). Ambas as catalases (de *M. acridum* e de *N. crassa*) pertencem a um grupo denominado “grandes catalases”, com massa molecular superior a 80 kDa por monômero. Díaz et al. (2001) caracterizaram a Cat-1 de *N. crassa* e observaram elevada resistência a concentrações molares de H₂O₂, altas temperaturas (≥ 70 °C) e agentes desnaturantes, além de menor susceptibilidade à inativação por azida (DÍAZ et al., 2001). O acúmulo dessa proteína em conídios provavelmente ocorre não somente para proteção da estrutura contra o peróxido de hidrogênio exógeno, mas também para lidar com o estresse oxidativo causado pelo início da respiração durante a germinação do conídio. O mesmo é válido para a catalase-peroxidase (KATG, E9E8S1).

As demais proteínas encontradas estão envolvidas, de maneira geral, com o metabolismo de carboidratos ou com a resposta ao estresse. Fica evidente que conídios de *M. acridum*, como seria esperado, acumulam proteínas e enzimas necessárias ao metabolismo, à virulência e à resposta ao estresse.

Finalmente, ainda que o número de proteínas identificadas não seja comparável ao número obtido nos atuais estudos de proteômica, o presente trabalho é o mais completo já realizado em qualquer espécie do gênero *Metarhizium*.

4.3.2 – Proteínas diferencialmente acumuladas

O acúmulo diferencial de proteínas entre conídios produzidos sob iluminação e conídios produzidos no escuro foi avaliado através de duas técnicas distintas: contagem espectral e intensidade do íon precursor. Ambas são técnicas *label-free* que usam os mesmos dados para a análise, de forma que a quantificação de um experimento pode ser feita por qualquer uma delas sem necessidade de reprocessamento de amostras.

4.3.2.1 – Determinação das proteínas diferencialmente acumuladas por contagem espectral

A contagem espectral é uma técnica de quantificação relativa que utiliza o número de espectros obtidos para uma determinada proteína e o compara ao número de espectros obtidos para essa mesma proteína em outra amostra. Essa quantificação relativa é possível porque, com o aumento da quantidade de uma proteína, aumentam proporcionalmente o número de peptídeos analisados no experimento de LC-MS/MS e, conseqüentemente, aumenta também o número de espectros relativos àquela proteína (COOPER; FENG; GARRETT, 2010).

Em nossos experimentos, a quantificação por contagem espectral foi usada para comparar as amostras de Claro e de Escuro através do teste exato de Fisher, considerando-se significativas as diferenças entre médias que resultassem em $P < 0,05$. Os resultados mostraram um total de 75 proteínas diferencialmente acumuladas. Apesar disso, algumas distorções foram observadas. Por exemplo, a Lcc2, uma proteína com considerável diferença entre Claro e Escuro ($P = 0,014$), não apresentou qualquer espectro nas amostras de Claro,

resultando ser uma proteína exclusiva do Escuro. Porém, essa mesma Lcc2 foi identificada em nossos géis, sendo que o spot correspondente está igualmente presente em géis de Claro e de Escuro (spot 4, Figura 2 e Tabela 1). Não somente isso, mas também o spot utilizado para identificação havia sido excisado de um gel de Claro, demonstração inequívoca de que a Lcc2 não pode ser uma proteína exclusiva de Escuro. Isso provavelmente ocorre porque a Lcc2 é uma proteína cuja concentração nos conídios está muito próxima do limite de detecção da técnica, o que pode resultar na identificação dessa proteína em uma amostra e não em outra, sem que isso necessariamente implique em exclusividade ou grande diferença de concentração entre amostras. Se o algoritmo de quantificação não for capaz de prever e se antecipar a essa situação, mais erros desse tipo podem ser esperados.

Assim sendo, e levando-se em conta ainda que grande parte das proteínas consideradas diferencialmente acumuladas por contagem espectral são de baixa abundância, optou-se por não utilizar a quantificação por contagem espectral para análise de nossos dados (motivo pelo qual também não se apresenta uma tabela com os resultados obtidos). Em função disso, procedeu-se à quantificação por intensidade do íon precursor, na tentativa de se encontrar uma técnica mais adequada à análise dos dados obtidos.

4.3.2.2 – Determinação das proteínas diferencialmente acumuladas por intensidade do íon precursor

A quantificação relativa de uma proteína por intensidade do íon precursor, em vez de comparar o número de espectros obtidos para essa proteína em diferentes amostras, calcula a intensidade dos íons (peptídeos) correspondentes a essa proteína no LC-MS e os compara com as intensidades obtidas em outras amostras (ZHU; SMITH; HUANG, 2010). Da mesma forma que ocorre com a contagem espectral, o aumento da concentração de uma proteína em

uma amostra acarreta aumento linear na intensidade dos íons precursores para essa proteína (CHELIUS; BONDARENKO, 2002, BONDARENKO; CHELIUS; SHALER, 2002).

Usando novamente a Lcc2 como parâmetro, foi possível observar que a comparação entre Claro e Escuro para essa proteína por intensidade do íon precursor resulta em $P = 1,0$. Isso é resultado de uma análise que lida melhor com a ausência de valores para uma proteína em uma amostra. A ausência de valores de intensidade relativos à Lcc2 no Claro faz com que a essa proteína seja atribuído um valor muito baixo de intensidade. Esse valor mínimo é então comparado com o valor obtido para o Escuro, o que, nesse caso, resultou em uma diferença não significativa.

Pode-se dizer, então, que a quantificação por intensidade do íon precursor é superior àquela por contagem espectral no que diz respeito às proteínas de baixa abundância. A clara limitação da contagem espectral em nossos experimentos foi demonstrada pela identificação da Lcc2 em géis 2-D. É interessante notar também como a técnica de LC-MS/MS encontrou problemas para identificar uma proteína evidente em géis 2-D corados com Coomassie (Figura 2).

Como melhores resultados foram obtidos por intensidade do íon precursor, as proteínas consideradas diferencialmente acumuladas ($P < 0,05$ no teste de Mann-Whitney e diferença confirmada pelo teste de permutação) estão mostradas na Tabela 3.

Tabela 3 – Proteínas diferencialmente acumuladas em conídios de *M. acridum* nas duas condições de crescimento analisadas (Claro e Escuro). Valores de Log₂ Fold Change negativos indicam regulação negativa, ao passo em que valores positivos indicam regulação positiva

^aTeste de Mann-Whitney

ID	Proteína	Gene	UniProtKB	P-valor ^a	Log ₂ Fold Change	
					Escuro	Claro
1	Aminopectidase 2	MAC_02189	E9DX41	0,013	-1,9	0,7
2	Heat shock protein 70	MAC_07411	E9EC13	0,025	-1,1	1,4
3	Cell division control protein Cdc48	MAC_02555	E9DY57	0,025	1,7	-1,6
4	Malate dehydrogenase	MAC_06678	E9E9Y0	0,045	-0,9	1,2

Como pode ser observado, apenas quatro proteínas (aminopectidase 2, heat shock protein 70, cell division control protein Cdc48 e malate dehydrogenase) foram consideradas diferencialmente acumuladas em conídios de Claro e de Escuro, um número muito menor do que aquele obtido por contagem espectral. Ainda que o método de quantificação e o rigor da análise estatística possam ter resultado na perda de algumas diferenças que seriam significativas, essa abordagem é possivelmente a mais adequada dada a alta variabilidade observada nos experimentos.

A aminopectidase 2 (MAC_02189) é homóloga a mesma proteína de *A. fumigatus* (AFUA_4G09030, identidade 66%). Essa proteína já foi observada como sendo duas vezes mais abundante nos conídios em relação ao micélio (TEUTSCHBEIN et al., 2010). Além disso, o gene que codifica para a aminopectidase em *A. fumigatus* tem sua transcrição

regulada em resposta ao choque térmico, sendo essa regulação de caráter oscilatório, ou seja, o aumento ou diminuição da expressão do gene depende do tempo de exposição ao estresse (ALBRECHT et al., 2010), indicando um controle da atividade proteolítica sob estresse em *A. fumigatus*.

De maneira semelhante, a HSP 70 (heat shock protein 70, MAC_07411) possui uma homóloga em *A. fumigatus* (AFUA_8G03930, identidade 84%). Vödisch e colaboradores observaram que essa HSP 70, localizada na mitocôndria, tem sua expressão aumentada em condições de hipóxia (VÖDISCH et al., 2011). Acúmulo diferencial dessa proteína em conídios produzidos no claro pode indicar que a luz induz uma resposta semelhante àquela induzida em condições de estresse, o que já foi observado em *N. crassa* (WU et al., 2014).

Os mesmos autores que observaram a regulação da expressão do gene para aminopeptidase em *A. fumigatus* sob estresse térmico mostraram também que a “cell division control protein Cdc48” (AFUA_2G17110 e MAC_02555, identidade 87%) também é regulada em resposta às elevadas temperaturas (ALBRECHT et al., 2010). O padrão de regulação é oscilatório e semelhante ao observado para a aminopeptidase. Curiosamente, em *M. acridum*, a luz parece induzir o acúmulo de aminopeptidase no Claro e da Cdc48 no Escuro (Tabela 3). Apesar de ambas as proteínas estarem envolvidas na degradação proteolítica, não se pode desconsiderar as múltiplas funções da Cdc48 (reviso em JENTSCH; RUMPF 2006).

O gene que codifica para a proteína homóloga da malato desidrogenase (MAC_06678) em *A. fumigatus* (AFUA_6G05210, identidade 75%) tem sua transcrição aumentada em conídios expostos a neutrófilos (SUGUI et al., 2008). Apesar de a ação dos neutrófilos gerar um estresse oxidativo nos conídios, a resposta observada pelos autores foi a de uma mudança global no padrão da expressão gênica no que diz respeito às vias metabólicas, sendo que muitos genes associados à beta-oxidação de ácidos graxos (incluindo aquele para malato

desidrogenase) tiveram sua transcrição aumentada. Em nossos experimentos, apesar de uma regulação do metabolismo pela luz já ter sido observada (WU et al., 2014), a única enzima metabólica afetada foi a malato desidrogenase.

Apesar do baixo número total de proteínas identificadas (501) e do muito menor número de proteínas que se acumularam diferencialmente (apenas quatro), os resultados mostram que a luz pode induzir o acúmulo de proteínas associadas ao estresse e à degradação proteolítica. Mesmo não existindo uma relação direta entre os resultados obtidos e o aumento da tolerância à radiação UV-B induzido pela luz, o presente trabalho mostra que, utilizando-se as técnicas proteômicas adequadas (que resultem no estudo de uma parcela maior do proteoma), é possível avaliar como a luz pode induzir um aumento da tolerância ao estresse em conídios de *M. acridum*.

4.4 – Avaliação de outros parâmetros da fotobiologia de *M. acridum*

Apesar de muitos fungos possuírem fotorreceptores que compartilham grande semelhança no nível molecular, a resposta à luz pode variar consideravelmente entre organismos diferentes (revisto em RODRIGUEZ-ROMERO et al., 2010). Assim sendo, dois experimentos distintos foram realizados para estabelecer algumas características específicas da fotobiologia de *M. acridum*.

4.4.1 – Avaliação da influência do momento de iluminação durante o crescimento na produção de conídios com elevada tolerância à radiação UV-B

Nos habituais experimentos de tolerância com conídios produzidos no Claro e no Escuro (Figura 1), o crescimento em fotoperíodo (Claro) e na ausência de luz (Escuro) permanecem inalterados por 14 dias. No presente experimento, conídios foram inoculados conforme descrito, porém, ao sétimo dia, algumas placas de Claro foram colocadas na

ausência de luz (Claro→Escuro), ao passo em que algumas placas de Escuro foram colocadas em fotoperíodo (Escuro→Claro). O desenvolvimento então procedeu normalmente até o 14º dia, quando foi avaliada a tolerância à radiação UV-B.

A característica das placas no sétimo dia e os resultados de sobrevivência após exposição à radiação UV-B estão mostrados na Figura 4.

Figura 4 – (A) Aspecto das placas de Claro e de Escuro ao sétimo dia de desenvolvimento, quando se procederam as trocas Claro→Escuro e Escuro→Claro. (B) Sobrevivência relativa após 4 h de exposição à radiação UV-B de conídios de *M. acridum* produzidos no claro, no escuro e quando houve inversão da condição de crescimento ao sétimo dia (Claro→Escuro e Escuro→Claro). Letras distintas representam diferenças estatisticamente significativas (ANOVA com pós-teste de Tukey resultando em $P < 0,05$)

Como pode ser observado na Figura 4A, no sétimo dia (quando ocorre a modificação da condição de crescimento), observa-se extensa conidiogênese tanto no Claro quanto no Escuro, sem qualquer diferença perceptível entre as placas de cada condição.

Após a exposição à radiação UV-B, observou-se que a mudança de Claro para Escuro não acarretou em redução da tolerância (Figura 4B). Esse resultado indica que a continuidade do estímulo luminoso é desnecessária após a formação dos conídios. Isso implica dizer que os conídios são formados já com as características que conferem alta tolerância à radiação UV-B e que essas características não são perdidas mesmo após sete dias de incubação na ausência de luz.

Por outro lado, e surpreendentemente, conídios produzidos no Escuro têm sua tolerância ligeiramente aumentada quando submetidos ao fotoperíodo a partir do sétimo dia (Figura 4B, Escuro→Claro). Uma vez que já havia ocorrido conidiogênese quando a condição de crescimento foi modificada, esse resultado levantou a hipótese de que conídios pudessem responder à luz. Sinohara já observou a possibilidade de indução enzimática de α -amilase, invertase e glucose desidrogenase em esporos dormentes de *Aspergillus oryzae*. O bloqueio dessa indução pela cicloheximida mostrou que ela ocorre via síntese *de novo* das enzimas induzidas (SINOHARA, 1970). De forma semelhante, Woloshuk e Kolattukudy mostraram que o contato de conídios de *Fusarium solani* f. sp. *pisi* com o polímero cutina ou com os monômeros ácido diidróxi-C₁₆ e ácido triidróxi-C₁₈ induz a produção de cutinase extracelular. Essa produção foi bloqueada por cicloheximida, novamente demonstrando se tratar de processo via síntese *de novo*. Além disso, os autores estabeleceram que o contato induz a transcrição do gene da cutinase, indicando a possibilidade de regulação da expressão gênica mesmo em estruturas supostamente dormentes (WOLOSHUK; KOLATTUKUDY, 1986). Assim sendo, é teoricamente possível que os conídios de *M. acridum* respondam à luz, o que

explicaria o aumento observado na tolerância à radiação UV-B. Porém, duas tentativas de induzir tolerância pela luz em conídios obtidos de placas com mais de 10 dias de crescimento não foram bem sucedidas. Analisados juntos, esses resultados indicam que conídios jovens, ainda imaturos, que possivelmente não atingiram um estado completo de dormência, podem ter sua transcrição gênica regulada pela luz. É interessante notar ainda que a condição Escuro→Claro resulta em um fenótipo intermediário entre Claro e Escuro. Esse fenótipo intermediário pode ser observado não somente no nível de sobrevivência relativa, mas também no nível de atraso da germinação (Figura 5). As colônias de Escuro→Claro apresentam um atraso de germinação intermediário entre aquelas de Claro e de Escuro.

Figura 5 – Aparência das colônias após quatro horas de exposição à radiação UV-B dos conídios de *M. acridum* obtidos nas condições especificadas. As imagens foram obtidas 72 h após a exposição

Assim sendo, se analisado pelas técnicas corretas, esse tipo de condição de crescimento poderia fornecer informações importantes acerca do aumento de tolerância à radiação UV-B induzido pela luz.

4.4.2 – Avaliação do efeito de exposições a diferentes comprimentos de onda na indução da tolerância à radiação UV-B

Até o momento, todos os dados apresentados foram obtidos utilizando-se conídios produzidos na presença ou na ausência de luz. Nesta seção serão mostrados os resultados obtidos utilizando-se um modelo de colônias jovens no estudo de resposta à luz. Esse modelo foi utilizado por Fuller e colaboradores para estudar a resposta de *A. fumigatus* a diferentes comprimentos de onda da luz visível (FULLER et al., 2013).

4.4.2.1 – Efeito da luz azul na tolerância à radiação UV-B

Conforme apresentado anteriormente, a resposta à luz azul é predominante nos fungos e, em muitos casos, é responsável pela indução de uma resposta ao estresse. Colônias jovens de *M. acridum* (26 h de desenvolvimento) foram induzidas por 2 h utilizando-se uma placa de LED (emissão em 400 nm) ou por 2 h sob lâmpadas fluorescentes brancas e então foram expostas à radiação UV-B por 2,5 h. A sobrevivência das colônias foi comparada àquela obtida após irradiação pela UV-B, porém sem indução prévia na luz (Escuro + UV-B). Colônias jovens não irradiadas pela UV-B representam o desenvolvimento normal do fungo e foram usadas como controle. Os resultados estão mostrados na Figura 6.

Figura 6 – Aspecto das placas após exposição de colônias jovens de *M. acridum* à radiação UV-B. As colônias foram induzidas na luz azul (400 nm) ou luz branca por 2 h antes de serem expostas à radiação UV-B. Colônias não induzidas (escuro) também foram expostas à radiação UV-B. “Controle

não exposto” representa o desenvolvimento normal do fungo. As imagens foram obtidas 96 h após exposição à radiação UV-B

A indução prévia pela luz azul (400 nm) resultou em um considerável aumento da tolerância à radiação UV-B, comparável àquele obtido pela indução com luz branca (Figura 6). A exposição somente à luz azul não causou atraso de germinação ou qualquer outro efeito observável no desenvolvimento. Esse resultado está de acordo com o relatado por Fuller e colaboradores para *A. fumigatus*. Os autores foram além e mostraram que a luz azul induz a expressão de genes de reparo do DNA, incluindo uma fotoliase e uma endonuclease UV. A deleção do gene *lreA*, que codifica para a fototropina LreA (homóloga à WC-1 de *N. crassa*), resulta na perda da indução dos genes de reparo pela luz azul. Apesar disso, a luz azul ainda foi capaz de induzir o aumento de tolerância à radiação UV-B mesmo nos mutantes $\Delta lreA$. Os autores especulam que outro fotorreceptor, ainda não descoberto, possa ser o responsável pela indução de tolerância (FULLER et al., 2013).

Apesar disso, é importante lembrar que a radiação azul, mesmo não pertencendo à faixa espectral do ultravioleta, pode gerar espécies reativas de oxigênio (OMATA et al., 2005) e que os fungos filamentosos, em resposta a essas espécies reativas, ativam cascatas de sinalização intracelulares, o que geralmente resulta no aumento da expressão de genes associados à detoxificação dessas espécies (AGUIRRE; HANSBERG; NAVARRO, 2006). Uma das enzimas induzidas durante o estresse oxidativo é a superóxido dismutase (SOD). Recentemente, a importância dessa enzima na tolerância à radiação UV-B foi demonstrada em *Beauveria bassiana* (LI et al., 2014).

Assim sendo, é possível que o aumento de tolerância observado por Fuller e colaboradores nos mutantes $\Delta lreA$ seja resultado também da sinalização por espécies reativas de oxigênio e não somente pela luz azul.

4.4.2.2 – Efeito da exposição à radiação UV-A na tolerância à radiação UV-B

O mesmo experimento de indução foi repetido, porém utilizando uma lâmpada UV-A (pico de emissão em 370 nm) em lugar do LED azul. Como a radiação UV-A tem maior potencial causador de danos, algumas placas foram expostas somente a essa radiação, de forma a observar um possível atraso de germinação. Os resultados estão mostrados na Figura 7 e são praticamente idênticos ao observado para indução pela luz azul.

Figura 7 – Aspecto das placas após exposição de colônias jovens de *M. acridum* à radiação UV-B. As colônias foram induzidas na luz UV-A (pico em 370 nm) ou luz branca por 2 h antes de serem expostas à radiação UV-B. Colônias não induzidas (escuro) também foram expostas à radiação UV-B. “Controle não exposto” representa o desenvolvimento normal do fungo e “2h UV-A” representa o efeito da exposição somente a essa radiação. As imagens foram adquiridas 96 h após exposição à radiação UV-B

Nesse caso, seria possível dizer que as espécies reativas de oxigênio geradas pela radiação UV-A são responsáveis pela sinalização que resulta em aumento de tolerância à radiação UV-B, já que o comprimento de onda utilizado está muito distante do principal pico

de absorção das fototropinas (450 nm). Porém, essas fototropinas possuem outro pico de absorção, justamente em 370 nm (HE et al., 2002), tornando difícil a interpretação desses resultados. É possível apenas afirmar que tanto à luz azul quanto a UV-A tem efeitos muito próximos (se não iguais) na indução da tolerância à radiação UV-B em *M. acridum* e que essa indução é equivalente àquele obtida pelo uso de luz branca.

4.4.2.3 – Efeito da luz vermelha na tolerância à radiação UV-B

Experimentos semelhantes aos anteriores, porém utilizando luz vermelha (650 nm) demonstraram que essa faixa espectral não induz tolerância à radiação UV-B em *M. acridum* (Figura 8). Novamente, os resultados estão de acordo com os apresentados por Fuller e colaboradores, permitindo supor que *M. acridum* e *A. fumigatus* respondam à luz de forma semelhante no que diz respeito à resistência à radiação UV-B.

Figura 8 – Aspecto das placas após exposição de colônias jovens de *M. acridum* à radiação UV-B. As colônias foram induzidas na luz vermelha (650 nm) ou luz branca por 2 h antes de serem expostas à radiação UV-B. Colônias não induzidas (escuro) também foram expostas à radiação UV-B. “Controle não exposto” representa o desenvolvimento normal do fungo. As imagens foram obtidas 96 h após exposição à radiação UV-B

Analizados juntos, os resultados indicam que a indução de tolerância à radiação UV-B em *M. acridum* pela luz visível envolve particularmente a faixa espectral correspondente ao azul.

Como comentário final, é evidente como o modelo de indução de colônias jovens pode ser uma alternativa adequada para o estudo da resposta à luz em *Metarhizium*. Esse modelo, além de ter sido empregado para estudos da fotobiologia de *A. fumigatus*, foi usado também na análise transcriptômica dos genes induzidos pela luz em *A. nidulans* (RUGER-HERREROS et al., 2011). No que diz respeito à proteômica, o uso de colônias jovens ou do micélio em vez de conídios nos estudos de efeito da luz em *M. acridum* traria algumas vantagens: (1) preparo de amostra facilitado como decorrência da menor resistência do micélio à lise celular; (2) melhor qualidade da amostra final em função da ausência de pigmentos; e (3) possibilidade de se estudar a resposta à luz em diferentes momentos do desenvolvimento e após distintos períodos de iluminação, algo que não seria possível trabalhando-se apenas com o conídio formado.

5 – CONCLUSÕES

O presente trabalho apresentou os resultados de uma abordagem proteômica para identificação de proteínas que se acumulariam diferencialmente em conídios de *M. acridum* produzidos em fotoperíodo de luz ou no escuro. Os resultados mostraram que as possíveis diferenças induzidas pela luz não são extensas e não ocorrem nas proteínas mais abundantes dos conídios, dificultando a análise proteômica. Ainda assim, trata-se do trabalho de proteômica mais completo já realizado em *Metarhizium*. Por outro lado, o modelo utilizado para se estudar a resposta de colônias jovens às radiações UV-A, azul e vermelha, além de ter permitido um melhor conhecimento sobre a fotobiologia de *M. acridum*, se mostrou um válido modelo no estudo proteômico de resposta à luz.

Capítulo 3

Estudo proteômico do tratamento fotodinâmico de *Candida albicans* com o fotossensibilizador Novo azul de metileno N

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – *Candida albicans* e tratamento fotodinâmico

Candida albicans é um importante fungo patogênico responsável por um grande número de doenças em humanos, incluindo-se as candidíases oral, vaginal, orofaríngea e sistêmica (CALDERONE; FONZI, 2001). Pacientes soropositivos para o vírus da imunodeficiência humana (HIV) são particularmente suscetíveis a esses tipos de candidíase (SANGEORZAN et al., 1994). Infecções nosocomiais por *C. albicans* em indivíduos imunocomprometidos e em pacientes com câncer são hoje um problema de saúde mundial (PFALLER et al., 1998). Adicionalmente, estudos epidemiológicos mostraram a emergência da tolerância fungicidas como fluconazol e nistatina em *C. albicans* (SANGEORZAN et al., 1994, DEGREGORIO; LEE; RIES, 1982). Dada a correlação entre a presença de candidíase orofaríngea resistente à nistatina e o aparecimento de candidíase sistêmica (DEGREGORIO; LEE; RIES, 1982), novas terapias – não baseadas no uso dos fungicidas tradicionais – são necessárias para o tratamento adequado das infecções por *C. albicans*. Nesse cenário, o tratamento fotodinâmico antimicrobiano (TFA) tornou-se uma alternativa interessante para o controle de micoses superficiais causadas por espécies de *Candida* (GONZALES; MAISCH, 2012).

O TFA inicia-se com a aplicação de um fotossensibilizador (FS) ao local da infecção. A seguir, um estímulo luminoso de correto comprimento de onda é usado para irradiar o FS. Ao interagir com os fótons de luz, a molécula do FS é levada a um estado eletronicamente excitado. O posterior decaimento para o estado fundamental pode ocorrer de diversas formas, e a mais comum delas a transferência de energia para o oxigênio molecular (O_2), formando o oxigênio singlete (corretamente escrito $O_2(a^1\Delta_g)$, mas aqui referido como 1O_2). O 1O_2 é uma espécie reativa capaz de oxidar diversas biomoléculas (principalmente lipídeos e proteínas),

causando a morte celular (BERTOLONI et al., 1989, LAMBRECHTS; AALDERS; VAN MARLE, 2005). As proteínas constituem aproximadamente 70% do peso seco de uma célula e, por isso, são um importante alvo para o $^1\text{O}_2$ gerado pelo TFA (revisto em DAVIES, 2003). Os danos do $^1\text{O}_2$ em proteínas variam desde as relativamente simples oxidações de aminoácidos (principalmente Trp, His, Tyr, Met e Cys) até a mais severa agregação proteica (revisto em DAVIES, 2003). É importante notar, porém, que mesmo a oxidação de um único aminoácido pode ter consequências adversas para as células. Por exemplo, a enzima glutamina sintase de *Escherichia coli* perde sua atividade após a oxidação de um único resíduo de His de seu sítio catalítico (RIVETT; LEVINE, 1990).

1.2 – Tratamento fotodinâmico e proteômica

O proteoma de um organismo é comumente definido pelas PROTEÍNAS expressas pelo genOMA ou, mais comumente, pelo conjunto de proteínas presentes nesse organismo em um dado momento e sob uma dada condição (WILKINS et al., 1996; PENG; GYGI, 2001). A proteômica é então definida como o estudo do proteoma. Apesar de ser amplamente usada para estudar a resposta dos fungos ao estresse (revisto em KROLL; PÄHTZ, KNIEMEYER, 2014), a proteômica não foi, até o presente momento, utilizada para estudar os efeitos do TFA no proteoma de fungos. A eletroforese bidimensional (2-DE) já foi considerada a técnica estado-da-arte em estudos proteômicos. Hoje, essa técnica vem sendo substituída por outras mais refinadas e baseadas em cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS). Apesar disso, a 2-DE ainda encontra aplicações nos estudos de proteômica (revisto em ROGOWKSA-WRZESINSKA *et al.* 2013). Magi e colaboradores utilizaram a 2-DE no estudo da resposta apoptótica de células de leucemia humana após o tratamento fotodinâmico com o FS Purpurina-18 (MAGI et al., 2004). Dosselli et al. (2012) usaram 2-DE para avaliar os efeitos do TFA com diferentes concentrações de FS e fluências de luz no proteoma de

Staphylococcus aureus. Os resultados mostraram uma clara correlação entre morte celular e modificações nas proteínas (DOSSELLI et al., 2012).

Nosso grupo de pesquisa recentemente mostrou a eficácia *in vitro* de diversos FS no TFA de *C. albicans* (RODRIGUES et al., 2013). Altas taxas de mortalidade celular foram obtidas mesmo com baixas concentrações de FS e breves períodos de exposição à luz. Apesar disso, um estudo mais refinado e no nível molecular, capaz de avaliar os efeitos desse tratamento no proteoma de *C. albicans*, ainda não foi realizado. Por isso, apresentam-se aqui os efeitos do TFA com o fotossensibilizador Novo Azul de Metileno N (NMBN) no proteoma de *C. albicans* conforme avaliado por 2-DE.

2 – OBJETIVO

Avaliar, por meio de uma abordagem proteômica por eletroforese bidimensional (2-DE) associada à espectrometria de massas em tandem, os danos ou as modificações causadas ao proteoma de *C. albicans* pelo tratamento fotodinâmico antimicrobiano com o fotossensibilizador New Methylene Blue N.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – *C. albicans* e condições de crescimento

A linhagem ATCC 64548 de *C. albicans* foi obtida da American Type Culture Collection (Manassas, VA, EUA). O fungo foi crescido em 25 ml de meio de cultura Sabouraud dextrose agar (SDA, Acumedia, Brasil) a 35 °C por 48 h em placas de Petri de 60 mm de diâmetro. Colônias isoladas foram usadas no preparo de uma suspensão (10^7 células ml^{-1}), que foi então utilizada para inocular 50 ml de meio YPD [Yeast Extract (1%) (BD Difco, EUA), peptona (2%) (BD Difco) e dextrose (2%) (Vetec, Brasil)] em frascos de Erlenmeyer de 125 ml. A incubação deu-se por seis horas (35 °C, 150 rpm). As células foram coletadas por centrifugação ($7.000 \times g$, 5 minutos) e lavadas em tampão fosfato salina (PBS, pH 7,4).

3.2 – Fotossensibilizador

Novo azul de metileno N (New methylene blue N, NMBN) ($\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{ClN}_3\text{S}$) foi obtido da Sigma (EUA). Soluções-estoque (500 μM) foram preparadas em água destilada e mantidas protegidas da luz a -20 °C por um máximo de 14 dias.

3.3 – Fonte de luz

As irradiações do FS foram feitas usando-se uma placa contendo 96 diodos emissores de luz (LED). O pico de emissão ocorre entre 600 e 650 nm. A irradiância total, medida entre 400 e 700 nm, é de 13,89 mW cm^{-2} .

3.4 – Tratamento fotodinâmico

Cinco mililitros da suspensão de células (4×10^7 células ml^{-1} em PBS) e 5 ml da solução de FS (5 μM em PBS) foram misturados em um tubo de 15 ml. As concentrações finais de células e de FS foram de 2×10^7 células ml^{-1} e 2,5 μM , respectivamente. Os tubos foram mantidos no escuro por um tempo de incubação de 30 minutos. O conteúdo de cada tubo (10 ml) foi transferido para uma placa de Petri de 60 mm de diâmetro, que foi exposta à luz (LED) por um de dois tempos diferentes: 3 minutos e 25 segundos (fluência = 2,85 J cm^{-2} , neste trabalho referida como 3 J cm^{-2}) ou 12 minutos (fluência = 10 J cm^{-2}). Durante a exposição, a suspensão de células e FS foi agitada com auxílio de um agitador magnético. Um controle contendo a mesma concentração de FS, porém não exposto à luz, foi preparado paralelamente a cada amostra irradiada. Cada experimento consistiu de cinco exposições sucessivas às fluências de 3 ou 10 J cm^{-2} de forma a fornecer material suficiente para a análise proteômica. Após a irradiação, uma pequena alíquota foi removida para ensaios de sobrevivência celular (descrito abaixo). As células de cada suspensão (10 ml) foram imediatamente coletadas por centrifugação ($7.000 \times g$, 5 minutos), lavadas com 1 ml de PBS, transferidas para tubos de 2 ml, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -70°C até extração de proteínas. Três experimentos independentes foram feitos para cada fluência. Adicionalmente a esses experimentos, manitol (Vetec, Brasil) 50 mM ou azida de sódio (Sigma) 10 mM foram adicionados antes do TFA com 10 J cm^{-2} para avaliar o papel, respectivamente, da hidroxila radicalar ($\cdot\text{OH}$) e do oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) no tratamento fotodinâmico. Para isso, manitol ou azida de sódio foram adicionados à solução de PBS utilizada durante o experimento. Para esterilização, a solução de PBS e manitol foi autoclavada e a solução de PBS e azida foi filtrada em membrana com poros de 0,22 μm (Merck Millipore, EUA).

3.5 – Sobrevivência celular

Após a exposição, como descrito anteriormente, uma pequena alíquota (50 µl) foi removida, diluída em série (10^{-1} a 10^{-3}) e inoculada em placas de Petri de 60 mm contendo 5 ml de meio SDA. O mesmo procedimento foi feito para células não expostas, que serviram como controle. Todas as placas foram incubadas a 28 °C. A sobrevivência de *C. albicans* ao TFA foi determinada por contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) e relatada como a razão das células expostas sobre aquelas não expostas. As contagens foram atualizadas por até quatro dias. Para determinação da sobrevivência, foram realizados ao menos três experimentos independentes para cada um dos tratamentos: TFA 3 J cm⁻², TFA 10 J cm⁻², TFA 10 J cm⁻² na presença de manitol 50 mM e TFA 10 J cm⁻² na presença de azida de sódio 10 mM.

3.6 – Extração e quantificação de proteínas

A cada tubo de 2 ml, contendo 10^8 células, foram adicionados 500 µl de tampão de extração [ureia 7 M, tiourea 2 M e CHAPS 4% (todos GE Healthcare)] e 500 µl de pérolas de vidro (425-600 µm, Sigma). Foram adicionados ainda 5 µl de inibidor de protease (GE Healthcare). As células foram lisadas por cinco ciclos de um minuto de agitação em vortex seguido de cinco minutos de incubação em gelo. Os tubos foram centrifugados a $10.000 \times g$ por cinco minutos a 4 °C e o sobrenadante resultante foi coletado. As proteínas, contidas nesse sobrenadante, foram purificadas pela adição de seis volumes de acetona (grau HPLC, Sigma) e incubação “overnight” a -20 °C. Após remoção da acetona por centrifugação ($10.000 \times g$ por cinco minutos a 4 °C), o precipitado proteico foi ressuspensão no mesmo tampão de extração e quantificado usando-se o 2-D Quant Kit (GE Healthcare).

3.7 – Eletroforese bidimensional (2-DE)

Todos os reagentes utilizados foram obtidos da Sigma exceto onde especificado. A concentração de proteína foi ajustada para 20 µg em 250 µl de tampão de reidratação [ureia 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4%, ditioneitol (DTT) 40 mM, IPG buffer 3-11 NL (GE Healthcare) 0,5%, inibidor de protease (GE Healthcare) 3 µl e azul de bromofenol 0,002% (p/v)]. Esse volume foi então aplicado a strips de 13 cm com faixa de pH 3-11 NL (Immobiline™ DryStrips, GE Healthcare), que reidrataram por 16 h. Após esse período, a focalização isoeletrica foi realizada em sistema IPGphor 3 (GE Healthcare) de acordo com o seguinte protocolo: 500 V (Step and Hold) até 0,5 kVh, 1.000 V (Gradient) até 0,8 kVh, 8.000 V (Gradient) até 11,3 kVh e 8.000 V (Step and Hold) até que um total de 25 kVh fosse atingido. As strips foram equilibradas em solução contendo Tris-HCl pH 8,8 75 mM, ureia 6 M, glicerol 30% (Synth, Brasil), dodecil sulfato de sódio (SDS) 2% e DTT 1% por 15 minutos. O mesmo procedimento foi repetido, porém substituindo-se DTT 1% por iodoacetamida 2,5% (p/v). SDS-PAGE foi realizado em sistema SE 600 Ruby (GE Healthcare) de acordo com o descrito por Laemmli (LAEMMLI, 1970). Os géis foram corados com nitrato de prata segundo o protocolo “Short silver nitrate staining” previamente descrito (CHEVALLET; LUCHE; RABILLOUD, 2006). As imagens dos géis corados foram obtidas com auxílio de um aparelho ImageScanner III e do programa Labscan (GE Healthcare) e as análises de imagens foram feitas no ImageMaster 2D Platinum 7 (GE Healthcare).

Ao todo, foram realizados três experimentos independentes para cada tratamento empregado, resultando em três géis do TFA 3 J cm⁻², três géis do TFA 10 J cm⁻² e os respectivos seis géis do tratamento com o FS no escuro (controles). Adicionalmente, um experimento foi realizado para verificar o efeito da adição de 50 mM manitol antes do TFA e outro experimento para avaliar o efeito da adição de 10 mM azida de sódio antes do TFA.

3.8 – Identificação de proteínas por MS/MS

Todos os reagentes empregados são da Sigma exceto onde especificado. Para identificação proteica por MS/MS foram utilizados géis corados com Coomassie Brilliant Blue G-250 (USB Corporation, EUA). O procedimento para obtenção desses géis foi o mesmo descrito para os géis corados com prata exceto pela maior quantidade de proteína utilizada por gel (100 µg). Para coloração, os géis foram fixados em solução etanol 40% e ácido acético 10% por uma hora. Em seguida, essa solução foi decantada e substituída por Coomassie 0,8%, sulfato de amônio (Synth, Brasil) 8%, ácido fosfórico (Synth, Brasil) 0,8% e metanol 20%. Os géis foram corados nessa solução por 24 h. Os spots de interesse foram excisados dos géis manualmente com ajuda de um bisturi estéril. Os spots foram descorados e as proteínas presentes nesses spots foram digeridas com tripsina tendo como base o protocolo de Shevchenko et al. (2006). Resumidamente, cada spot, após excisão, foi colocado em um microtubo de 0,5 ml e descorado por sucessivas lavagens com 100 µL de solução bicarbonato de amônio 0,1 M / acetonitrila 50%, sendo 10 minutos cada lavagem. Com o spot já bastante descorado, foram adicionados 100 µL de acetonitrila pura e incubou-se por 10 minutos. Após remoção da acetonitrila, o spot foi seco em centrífuga a vácuo por 20 minutos e foi adicionada solução bicarbonato de amônio 0,1 M em volume suficiente para cobrir o spot. Adicionou-se então 0,5 µg de tripsina modificada (Promega, Madison, EUA) em 20 µl de bicarbonato de amônio 0,1 M e, após reidratação do spot (aproximadamente 30 a 45 minutos), foi adicionada novamente solução bicarbonato de amônio 0,1 M em volume suficiente para cobrir o spot. Incubou-se a 37 °C por 24 h para digestão. A seguir, foram adicionados 5 µL de ácido fórmico (grau HPLC) para acidificar o meio e assim interromper a reação. Todos os tubos foram armazenados a 4 °C por 24 h para eluição natural dos peptídeos do gel para a solução. Em seguida, os peptídeos em solução foram dessalificados em resina C₁₈ (POROS[®] 50 R2 Reverse-Phase Packing, Perseptive Biosystems, Foster City, EUA) e secos em centrífuga a

vácuo (Speed Vac, New York, EUA). Aos peptídeos secos, foram adicionados 6 µl da matriz CHCA (5 mg ml⁻¹, α-cyano-4-hydroxycinnamic acid, minimum 99%, Sigma) em acetonitrila 50% / ácido trifluoroacético 0,1%. Finalmente, 2 µl foram aplicados em placa de MALDI (*target*) para análise por MALDI-TOF/TOF MS/MS (Axima Performance, Shimadzu Biotech, Reino Unido). Os espectros de MS foram obtidos no modo reflectron positivo e os dez íons mais intensos foram selecionados para colisão induzida (MS/MS). As relações m/z dos íons foram determinadas em relação a padrão de calibração (Protein MALDI-MS Calibration Kit, Sigma). Os resultados foram analisados pelo programa Lanchpad 2.8.3 (Kratos-Shimadzu, Reino Unido). As identificações foram obtidas após busca no MASCOT (Matrix Science, Reino Unido) utilizando-se os seguintes parâmetros: database “Swiss-Prot” e “contaminants”, taxonomy “other fungi”, enzyme “trypsin”, up to 1 missed cleavage, fixed modification “carbamidomethyl (C)”, variable modification “oxidation (M)”, peptide tolerance “1.2 Da”, MS/MS tolerance “0.8 Da”, peptide charge “+1” e “average masses”.

3.9 – Análise de aminoácidos

Neste experimento, utilizaram-se células íntegras que haviam sido submetidas ao TFA ou tratadas somente com o FS (controle). Não foi feita extração de proteínas previamente à análise de aminoácidos. Suspensões de 20 µl contendo um total de 2×10^6 células foram adicionadas em tubos de borosilicato (6 × 50 mm, pirolisados a 350 °C) e secas em centrífuga a vácuo (Speed Vac, New York, EUA). Esses tubos foram acondicionados em um frasco de reação Pierce (2,5 × 10 cm), com válvula de teflon, sendo possível colocar até 12 tubos de amostras em cada frasco de hidrólise. Adicionaram-se de 200 a 300 µL de HCl 6 N bidestilado (Merck, P.A.) contendo 0,1-0,5% (p/v) de fenol (Merck, P.A.) no interior do frasco de hidrólise, tomando-se o cuidado para não colocar o ácido dentro dos tubos que continham as amostras. Esse frasco de hidrólise foi fechado, congelado e submetido a vácuo,

com fluxo alternado de nitrogênio gasoso. Após atingir a temperatura ambiente, o frasco foi colocado em uma mufla e mantido à temperatura constante de 110 °C, onde permaneceu por 22 h. Após esse período, o excesso de HCl em cada tubo da amostra foi evaporado em centrífuga a vácuo por 30 minutos.

Cada tubo de amostra foi alcalinizado com 20 µL de uma mistura metanol:água:TEA (trietilamina) na proporção de 2:2:1 (v:v:v) (Metanol, Pierce, grau cromatográfico; TEA, Pierce, grau sequencial, e água nanopure equivalente à Milli-Q), agitado e seco por 15 minutos em centrífuga a vácuo. Em seguida, adicionou-se a cada tubo da amostra 20 µL do reagente de derivação: metanol:água:TEA:PITC (fenil isotiocarbamil) na proporção de 7:1:1:1 (v:v:v:v) (PITC, Pierce). O tubo foi agitado e se deixou reagir por 20 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, o excesso do reagente foi removido em concentrador rotatório Speed-Vac por uma hora à temperatura ambiente. Todo o procedimento de derivação foi realizado paralelamente, também com a mistura de aminoácidos padrões da Pierce, no qual 20 µL de uma solução 125 nmol ml⁻¹ foram derivados para a quantificação da amostra.

A amostra e o padrão, após derivados e secos, foram ressuspensos em 500 µl de tampão de amostra: acetato de sódio 0,14 M (Pierce) com 0,06% de TEA (v/v), pH 7,5, contendo 5% de acetonitrila. Desse total, 20 µl foram injetados em HPLC para análise. Para separação dos aminoácidos, foram usados os solventes A (acetato de sódio 0,14 M, TEA 0,06%, pH 5,7) e B (acetonitrila 60%) em gradiente linear 10-100% B em 17 minutos. A seguir, foi realizada uma lavagem com 10% B durante 10 minutos. O fluxo foi ajustado para 1 ml por minuto. Foi utilizada uma coluna C₁₈ Pico-Tag Waters (3,9x150 mm). A cromatografia foi desenvolvida à temperatura constante de 38 °C em equipamento CM4000 (Laboratory Data Control, Milton Roy Corporation) com sistema de bombas binárias, espectrofotômetro com leitura em comprimento de onda fixo (254 nm) e célula de fluxo contínuo de 10 µl. Os dados foram coletados com o programa ThermoChrom III (Thermo Separation Products). A

quantidade de cada aminoácido nas amostras foi calculada utilizando-se a área do pico correspondente a esse aminoácido tendo como base o padrão de concentração conhecida, que foi analisado sempre no mesmo experimento. O conteúdo percentual de cada aminoácido pôde então ser obtido.

4 – RESULTADOS

4.1 – Sobrevivência de *C. albicans* após o TFA

Após o TFA com NMBN 2,5 μM e fluências de luz de 3 e 10 J cm^{-2} , a mortalidade de *C. albicans* foi de 97,4 e 99,9975%, respectivamente, o que corresponde a reduções de 1,6 e 4,6 $\log_{10}$ na sobrevivência (Figura 9).

Figura 9 – Efeito do TFA usando-se NMBN e fluências de 3 e 10 J cm^{-2} na sobrevivência de *C. albicans*. Foram utilizadas para comparação células tratadas com o fotossensibilizador e não expostas à luz (FS E) e células não tratadas com o FS e não expostas à luz (controle)

Esses resultados estão de acordo com aqueles previamente publicados por nosso grupo e mostram que a morte celular ocorre rapidamente mesmo em baixas concentrações de FS. Ambos os tratamentos foram usados na análise proteômica, na qual células expostas ao FS no escuro (FS E) foram usadas como controle. Aqui é importante notar que, mesmo na menor fluência utilizada (3 J cm^{-2}), foi observada a morte de 97,4% das células em apenas 3 minutos e 25 segundos, o que, provavelmente, não deixa tempo hábil para uma resposta celular ao TFA. Dessa forma, a análise proteômica realizada neste estudo avalia principalmente os danos causados em proteínas e não a resposta celular a esses danos.

4.2 – Alterações no proteoma de *C. albicans* resultantes do TFA

Alterações no proteoma causadas pelo TFA e avaliadas por 2-DE são mostradas na Figura 10. Todos os géis obtidos e utilizados nas análises podem ser visualizados no Apêndice D.

Figura 10 – Géis 2-D representativos dos resultados obtidos após exposição de *C. albicans* somente ao FS (A e C) e após TFA com as fluências de 3 J cm^{-2} (B) e 10 J cm^{-2} (D)

O TFA com a menor fluência (3 J cm^{-2}) induziu modificações visíveis no proteoma de *C. albicans* (Figuras 10A e 10B). Essas modificações resultaram no aparecimento de spots mais ácidos (menor ponto isoelétrico) relativamente ao controle não exposto (ver região

delimitada pelas setas brancas nas Figuras 10A e 10B). Quando a fluência de luz foi aumentada para 10 J cm^{-2} , essas modificações no proteoma intensificaram-se, resultando no aparecimento de spots ainda mais ácidos do que aqueles observados com a fluência de 3 J cm^{-2} (ver regiões delimitadas pelas setas brancas e comparar Figuras 10B e 10D). Ao menos um spot mostrou-se resistente ao tratamento com a menor fluência (3 J cm^{-2}), sofrendo modificações somente com o aumento desta para 10 J cm^{-2} (seta losango na Figura 10), um resultado que indica tratar-se de um efeito fluência-dependente. Ao menos um grupo de spots (elipse branca, Figura 10) não apresentou nenhuma modificação mesmo após o tratamento com a fluência de 10 J cm^{-2} . Analisados juntos, esses resultados sugerem que as modificações em proteínas decorrentes do TFA em *C. albicans* são, ao mesmo tempo, fluência-dependente e proteína-específica, com algumas proteínas sendo menos suscetíveis do que outras.

A adição de manitol 50 mM previamente ao TFA não preveniu a morte celular ou a modificação no proteoma (Figura 11), indicando que a hidroxila radicalar ($\cdot\text{OH}$) não é a espécie responsável pelos danos observados.

Por outro lado, a adição de azida de sódio 10 mM reduziu a mortalidade celular de 99,9975% para apenas 31% no caso do TFA com a fluência de 10 J cm^{-2} (Figura 12A) e também preveniu, até certo ponto, algumas modificações no proteoma (Figuras 12B e 12C), indicando que o $^1\text{O}_2$ é ao menos parcialmente responsável pelos efeitos do TFA em *C. albicans*.

Figura 11 – Sobrevivência celular após TFA com 10 J cm⁻² na presença de manitol 50 mM, mostrando mortalidade igual àquela observada na ausência dessa molécula (**A**). Géis 2-D de *C. albicans* tratada apenas com o fotossensibilizador (**B**) e após TFA com 10 J cm⁻² (**C**) mostrando extensa modificação no proteoma mesmo na presença de manitol

Figura 12 – Comparação da sobrevivência celular de *C. albicans* após TFA com 10 J cm^{-2} realizado na presença ou na ausência de azida (**A**), mostrando o efeito de proteção conferido por essa molécula. Géis 2-D de *C. albicans* tratada somente com o fotossensibilizador (**B**) e após TFA com 10 J cm^{-2} na presença de azida (**C**) resultando em diminuição dos danos ao proteoma (comparar com Figura 10D)

4.3 – Identificação de proteínas por MS/MS

Um total de oito spots foi analisado por MALDI-TOF/TOF MS/MS para identificação proteica. Quatro deles (spots 1a, 1b, 2a e 2b, Figura 10) representaram proteínas modificadas e três deles (spots 3, 4 e 5) representaram proteínas não modificadas. Além desses, o spot 6 representou uma proteína que somente foi modificada pelo tratamento de maior fluência. Todos os spots foram identificados e correspondem a seis proteínas diferentes. As

localizações subcelulares das proteínas identificadas foram preditas com o algoritmo WoLF PSORT (HORTON et al., 2007). Os resultados são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4 – Spots identificados por MALDI-TOF/TOF MS/MS. A localização de cada spot nos géis 2-D pode ser visualizada na Figura 10

^aponto isoelétrico

^bLocalização subcelular predita usando o WoLF PSORT

ID Spot	Proteína	Organismo	MASCOT Score	UniProtKB	Massa Molecular (Da)	pI ^a	Localização ^b
1a	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Candida albicans</i> WO-1	302	Q92211	35925	6,61	citoplasma
1b	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Candida albicans</i> WO-1	91	Q92211	35925	6,61	citoplasma
2a	Fructose-biphosphate aldolase	<i>Candida albicans</i> SC5314	210	Q9URB4	39362	5,59	citoplasma
2b	Fructose-biphosphate aldolase	<i>Candida albicans</i> SC5314	94	Q9URB4	39362	5,59	citoplasma
3	Elongation fator 1-beta	<i>Candida albicans</i> WO-1	109	P78590	23465	4,25	citoplasma, núcleo
4	Phosphoglycerate mutase	<i>Candida albicans</i> SC5314	70	P82612	27437	5,79	citoplasma, núcleo
5	Triosephosphate isomerase	<i>Candida albicans</i> SC5314	181	Q9P940	26880	5,74	mitocôndria, citoplasma
6	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein	<i>Candida albicans</i> SC5314	262	P83774	34705	6,07	citoplasma, núcleo

Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, frutose bifosfato aldolase, fosfoglicerato mutase e triosefosfato isomerase (spots 1, 2, 4 e 5, respectivamente) são enzimas do metabolismo de carboidratos e são encontradas majoritariamente no citoplasma. O fato de as duas primeiras serem extensamente modificadas e as duas últimas não serem sugere que as modificações induzidas pelo TFA são de fato proteína-específica e não necessariamente uma decorrência de diferentes localizações subcelulares.

O fator de alongação 1-beta (spot 3) é também uma proteína encontrada no citoplasma e seu spot foi escolhido pela sua natureza ácida. Uma proteína de baixo ponto isoelétrico (negativamente carregada em pH fisiológico) provavelmente interagiria mais fortemente com o NMBN (positivamente carregado), sendo portanto mais facilmente modificada. Porém, o fator de alongação 1-beta também mostrou-se resistente às modificações induzidas pelo TFA.

4.4 – Análise de aminoácidos

A análise de aminoácidos mostrou uma redução no conteúdo de histidina de aproximadamente 60% para o TFA com 10 J cm^{-2} em comparação ao controle não exposto (Tabela 5). Esse resultado é consistente com o fato de que a histidina é um dos aminoácidos mais reativos ao $^1\text{O}_2$ (WEIL; GORDON; BUCHERT, 1951). Também pode ser observada uma redução de 24% no conteúdo de Met. Porém, deve-se considerar o desvio padrão encontrado para esse aminoácido nas duas amostras e ainda o fato de que um único experimento foi realizado, de forma que a redução pode ser explicada pelo erro experimental.

Tabela 5 – Conteúdo percentual de cada aminoácido em células expostas somente ao fotossensibilizador (FS Escuro) e em células expostas ao TFA na fluência de 10 J cm⁻²^aDP: desvio padrão entre duplicatas técnicas do experimento realizado^bAsx: ácido aspártico (Asp) ou asparagina (Asn)^cGlx: ácido glutâmico (Glu) ou glutamina (Gln)

Aminoácido	FS Escuro (controle)		TFA 10 J cm ⁻²		Variação (%)
	Conteúdo (%)	DP ^a	Conteúdo (%)	DP ^a	
Asx ^b	12,47	0,17	12,81	0,38	2,7
Glx ^c	10,93	0,25	11,24	0,26	2,8
Ser	3,16	0,24	3,35	0,06	6,0
Gly	5,37	0,01	5,47	0,23	1,8
His	2,39	0,28	1,01	0,03	-57,7
Arg	6,14	0,23	6,56	0,09	6,8
Thr	3,84	0,07	3,82	0,02	-0,4
Ala	7,10	0,09	7,18	0,15	1,1
Pro	6,71	0,20	6,56	0,09	-2,3
Tyr	2,61	0,54	2,42	0,09	-7,0
Val	5,87	0,71	5,83	0,52	-0,7
Met	1,83	0,23	1,39	0,33	-24,0
Cys	0,00	0,00	0,00	0,00	–
Ile	4,99	0,01	5,00	0,19	0,2
Leu	10,46	0,13	10,85	0,11	3,7
Phe	4,60	0,31	4,73	0,61	2,9
Lys	11,52	0,05	11,78	0,03	2,3

5 – DISCUSSÃO

A inativação de *C. albicans* pelo TFA *in vitro* usando-se NMBN e luz vermelha foi previamente demonstrada pelo nosso grupo. Taxas de mortalidade superiores a 99% foram obtidas mesmo com baixas concentrações do FS (RODRIGUES et al., 2013). Porém, um estudo mais aprofundado e no nível molecular ainda não havia sido realizado. Apesar de os lipídeos – especialmente aqueles da membrana plasmática – estarem entre os principais alvos do TFA (BÖCKING et al., 2000, LAMBRECHTS; AALDERS; VAN MARLE, 2005), o dano às proteínas tem também um papel importante, principalmente em função da sua abundância na célula e suas constantes de reação com o oxigênio singlete (DAVIES, 2003). O presente trabalho apresentou a combinação de 2-DE e espectrometria de massas na avaliação dos danos causados ao proteoma de *C. albicans* pelo TFA.

Os resultados mostram que, para algumas proteínas, o TFA induz um “desvio ácido”, isto é, o aparecimento de uma sequência de novos spots com menor ponto isoelétrico (pI) (Figura 10). A hipótese de que esses novos spots derivam de spots originais (presentes nos géis-controle) pôde ser verificada durante a análise de imagens, na qual pôde-se calcular o volume percentual dos spots de um gel. De maneira geral, os spots originais dos géis-controle sofrem redução de volume após o TFA, indicando que as proteínas representadas nesses spots sofreram modificações e migraram para uma região de menor pI do gel. Essa alteração no proteoma foi mostrada como sendo fluência-dependente, com um maior número de spots ácidos aparecendo com o aumento da fluência de 3 para 10 J cm⁻² (Figuras 10B e 10D).

O “desvio ácido” observado já foi previamente descrito após oxidação de proteínas por γ -radiólise (DAVIES, 1987). Porém, esse sistema de oxidação gera majoritariamente $\cdot\text{OH}$, que reage com as cadeias laterais de Lys e Arg, causando suas conversões nos semialdeídos aminoadípico e glutâmico, respectivamente (REQUENA et al., 2001). Dado que a formação desses dois semialdeídos envolve a eliminação dos grupos amina e guanidina, a proteína

assim oxidada torna-se mais ácida. Apesar disso, é necessário lembrar que a fotossensibilização com NMBN gera majoritariamente $^1\text{O}_2$ (WAINWRIGHT et al., 1998), que, por sua vez, reage preferencialmente com Trp, His, Tyr, Met e Cys (WEIL; GORDON; BUCHERT, 1951). Destes, somente a His poderia ser considerada como um aminoácido que contribui para o pI das proteínas. De fato, a análise de aminoácidos após o TFA mostrou que os resíduos de Lys e Arg permaneceram inalterados, ao passo em que houve redução de aproximadamente 60% do conteúdo de His (Tabela 5). Rivett e Levine observaram que a oxidação catalisada por metal (MCO – *Metal-Catalyzed Oxidation*) da glutamina sintase de *E. coli* resulta na perda específica de dois resíduos de His por subunidade da enzima. Concomitantemente à perda de His, novas formas ácidas da enzima foram observadas por focalização isoeletrica (RIVETT; LEVINE, 1990). Apesar de o sistema empregado (MCO) gerar principalmente $\cdot\text{OH}$, os autores não conseguiram demonstrar a perda de qualquer outro aminoácido além de His. Esse resultado mostra que a oxidação de resíduos de His pode causar considerável alteração no pI de uma proteína. Por isso, a oxidação desse aminoácido é a explicação mais plausível para o desvio ácido observado nos géis aqui apresentados.

Alguns spots nos géis das células tratadas pelo TFA mantiveram-se inalterados mesmo após o tratamento com a maior fluência, indicando que as modificações causadas são seletivas para algumas proteínas (deve-se notar, porém, que a avaliação de danos é feita sobre alterações de ponto isoeletrico. Por exemplo, o aminoácido Trp, que é rapidamente oxidado pelo $^1\text{O}_2$, não contribuiria para uma eventual alteração de pI e seu conteúdo não pode ser medido por análise de aminoácidos, já que ocorre sua destruição durante a hidrólise ácida empregada no preparo de amostra). O fato de que a maioria das proteínas identificadas é encontrada no citoplasma descarta as diferentes localizações subcelulares como a única explicação para a seletividade observada. Em vez disso, formulou-se a hipótese de que a oxidação seletiva de proteínas ocorre em função de dois fatores: primeiro, da interação entre

proteína e FS; e segundo, da presença de aminoácidos fotooxidáveis nos sítios de interação entre a proteína e o FS. De fato, uma série de trabalhos de Jori e colaboradores mostrou a fotooxidação seletiva dos resíduos envolvidos na interação do FS com a proteína (JORI et al., 1970a, 1970b, 1971a, 1971b). Além disso, outros autores observaram que resíduos de His não expostos na superfície de uma proteína não são fotooxidáveis (KENKARE; RICHARDS, 1966). No que diz respeito à interação com proteínas, diferentes afinidades por um dado FS foram relatadas para as albuminas humana e bovina (CHAKRABARTY et al., 2007). Dado que essas proteínas apresentam 80% de homologia, é de se esperar que diferentes proteínas possam divergir consideravelmente nas suas afinidades por fotossensibilizadores. Como exemplo da importância da interação proteína-FS, a fotooxidação de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH, spots 1a, 1b, Figura 10) de músculo de coelho na presença do FS Rose Bengal e da luz resulta na oxidação específica da His-38 e na consequente perda de atividade enzimática. Tanto o cofator NAD^+ como o substrato (gliceraldeído-3-fosfato) conferem proteção parcial por competirem com o FS pelo sítio de ligação (FRANCIS; MERIWETHER; PARK, 1973). Apesar de os autores não terem realizado focalização isoeletrica, é razoável considerar que a enzima oxidada tornou-se mais ácida após oxidação da His-38. Por outro lado, Krietsch e colaboradores observaram que a triosefosfato isomerase (spot 5, Figura 10) de *Saccharomyces cerevisiae* é uma proteína consideravelmente resistente à fotooxidação, não se observando qualquer perda de atividade enzimática mesmo após 300 minutos de iluminação na presença de 10 μM Rose Bengal (KRIETSCH et al., 1970). Os autores mostraram ainda que, curiosamente, a mesma enzima, porém obtida de músculo de coelho, foi mais suscetível à fotooxidação sob as mesmas condições experimentais. Em nossos géis 2-D, a triosefosfato isomerase se mostrou resistente mesmo ao tratamento com a maior fluência, indicando uma semelhança maior com a enzima de *S. cerevisiae* no que diz respeito à resistência ao tratamento fotodinâmico.

Em um recente trabalho, Dosselli et al. (2012) estudaram o efeito do TFA com um derivado de porfirina nas proteínas associadas à membrana de *Staphylococcus aureus* usando-se 2-DE. Os autores mostraram que, com o aumento da intensidade do tratamento, as proteínas formam agregados, o que resulta no desaparecimento de spots dos géis 2D. Em função de suas altas massas moleculares, esses agregados só foram visualizados no gel de empilhamento de SDS-PAGE unidimensional (1D-SDS-PAGE). Apesar de 1D-SDS-PAGE não ter sido realizado no presente trabalho, é razoável supor que alguma agregação proteica ocorreu durante o TFA. Isso porque a ligação cruzada entre proteínas mediada por $^1\text{O}_2$ tem início com a oxidação de His e então procede com a formação de ligação covalente entre o grupo amina de outros aminoácidos e a histidina oxidada. Essas ligações cruzadas geralmente são do tipo His-His e His-Lys e podem ocorrer tanto intra como intermolecularmente (SHEN et al., 2000, LIU et al., 2014). Por exemplo, a fotooxidação da mioglobina gera quase que exclusivamente ligações intramoleculares e isso também resulta em perda dos grupos amino livres da proteína (VAN STEVENINCK; DUBBLEMAN, 1984). Naturalmente, essa perda de grupos aminos faz com que novas formas proteicas, mais ácidas, apareçam durante focalização isoeletrica (VAN STEVENINCK; DUBBLEMAN, 1984). É importante notar também que essas ligações cruzadas são perdidas durante o preparo de amostra para 1D-SDS-PAGE (isto é, aquecimento a $>90\text{ }^\circ\text{C}$ na presença de SDS e ditioneitol) (SHEN et al., 1996). Assim, é possível que alguns agregados proteicos tenham sido perdidos no trabalho de Dosselli (DOSSELLI et al., 2012).

Também utilizando-se 2-DE, Magi e colaboradores estudaram o proteoma de células humanas de leucemia (HL-60) após apoptose induzida pelo tratamento fotodinâmico. Os autores também relataram o aparecimento de formas ácidas de algumas proteínas estruturais (por exemplo, β -actina e cadeia α -1 da tubulina) e associaram esse evento à carbonilação proteica, que foi avaliada por Western blot com 2,4-dinitrofenil hidrazina (DNPH) (MAGI et

al., 2004). Os autores argumentaram que o tratamento fotodinâmico pode resultar na carbonilação das cadeias laterais dos resíduos de Lys, Arg, Pro e Thr. Porém, o $^1\text{O}_2$ gerado pelo tratamento reage majoritariamente com Trp, His, Tyr, Met e Cys (WEIL; GORDON; BUCHERT, 1951). É mais provável que a carbonilação proteica observada pelos autores seja fruto, por exemplo, da oxidação de Trp, já que o produto final, quinurenina, forneceria resultado positivo ao DNPH (SILVESTER; TIMMINS; DAVIES, 1998). O mesmo é válido para oxidação de His, que também resulta em produtos contendo carbonilas (TOMITA; MASACHIKA; UKITA, 1969).

Em nossos experimentos, a adição de 10 mM NaN_3 previamente ao TFA reduziu consideravelmente a mortalidade celular e preveniu alguns danos ao proteoma (Figura 12). Sabendo-se que a azida é um conhecido sequestrante de $^1\text{O}_2$, pode-se afirmar que o oxigênio singlete é ao menos parcialmente responsável pelo processo de fotossensibilização. É interessante observar que nem todo o dano proteico foi evitado mesmo com a concentração relativa NaN_3 :NMBN de 4.000:1. De fato, Kim e colaboradores observaram que a atividade enzimática da isocitrato desidrogenase é reduzida para 20% após o tratamento fotodinâmico com 2 μM Rose Bengal, mas é recuperada somente até 60% quando o tratamento é realizado na presença de 50 mM NaN_3 , uma concentração relativa (NaN_3 :FS) de 25.000:1 (KIM; TAK; PARK, 2004). Ainda que os autores não tenham comentado esse resultado, pode-se especular que a azida é incapaz de sequestrar o $^1\text{O}_2$ gerado pelo FS que esteja interagindo fortemente com a proteína. Como esperado, a adição de 50 mM manitol não preveniu a morte celular ou qualquer dano ao proteoma (Figura 11), indicando que o $\cdot\text{OH}$ não é a espécie responsável pela fotossensibilização induzida por NMBN.

Finalmente, deve-se sempre ter em mente que a morte celular resultante do TFA é um processo complexo, que envolve a oxidação de diversas biomoléculas, não somente proteínas. Por exemplo, a peroxidação de lipídeos de membrana pelo $^1\text{O}_2$ resulta na formação de 4-

hidroxinonenal (HNE) (NAGAOKA et al., 2005). O HNE liga-se covalentemente às proteínas por meio da reação com Cys, His e Lys (NAGAOKA et al., 2005, NADKARNI; SAYRE 1995), complicando as análises proteômicas. O tratamento da GAPDH (Figura 10, spot 1a) com HNE causa redução da atividade enzimática e perda dos resíduos de Cys, His e Lys (UCHIDA; STADTMAN, 1993). Considerando-se a perda dos resíduos de His e Lys, seria esperado que proteínas modificadas pelo HNE se tornassem mais ácidas. De fato, a incubação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) com o HNE resulta no aumento da carga negativa do LDL como resultado, principalmente, da reação entre Lys e HNE (JÜRGENS; LANG; ESTERBAUER, 1986).

6 – CONCLUSÕES

O tratamento fotodinâmico com NMBN tem grande impacto no proteoma de *C. albicans*. Quando submetidas à focalização isoeletrica, algumas proteínas apresentam um desvio ácido. Essa modificação proteica mostrou-se depende da fluência e, consequentemente, da intensidade do tratamento. Por outro lado, algumas proteínas não apresentaram qualquer alteração no padrão de migração. Conclui-se então que os danos em proteína causados pelo TFA são específicos e podem ser decorrentes de diferentes afinidades pelo fotossensibilizador e da presença ou não de aminoácidos fotooxidáveis nos sítios de interação entre a proteína e o fotossensibilizador.

Referências e Apêndices

REFERÊNCIAS

- AGUIRRE, J.; HANSBERG, W.; NAVARRO, R. *Fungal responses to reactive oxygen species*. **Medical Mycology** 44, 101-107, 2006.
- ALBRECHT, D.; GUTHKE, R.; BRAKHAGE, A. A.; KNIEMEYER, O. *Integrative analysis of the heat shock response in Aspergillus fumigatus*. **BMC Genomics** 11 (32), doi:10.1186/1471-2164-11-32, 2010.
- ANDERSEN, S. O. *Phenolic compounds isolated from insect hard cuticle and their relationship to the sclerotization process*. **Insect Biochemistry** 1, 157-170, 1971.
- BAGGERMAN, G.; VIERSTRAETE, E.; DE LOOF, A.; SCHOOFS, L. *Gel-based versus gel-free proteomics: a review*. **Combinatorial Chemistry and High Throughput Scanning** 8, 669-677, 2005.
- BALLARIO, P.; VITTORIOSO, P.; MAGRELLI, A.; TALORA, C.; CABIBBO, A.; MACINO, G. *White collar-1, a central regulator of blue light responses in Neurospora is a zinc finger protein*. **The EMBO Journal** 15(7), 1650-1657, 1996.
- BARROS, B. H. R.; DA SILVA, S. H.; MARQUES, E. R.; ROSA, J. C.; YATSUDA, A. P.; ROBERTS, D. W.; BRAGA, G. U. L. *A proteomic approach to identifying proteins differently expressed in conidia and mycelium of the entomopathogenic fungus Metarhizium acridum*. **Fungal Biology** 114, 572-579, 2010.
- BAYRAM, Ö.; BRAUS, G. H. *Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the velvet family of regulatory proteins*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, 1-24, 2012.
- BERTOLONI, G.; REDDI, E.; GATTA, M.; BURLINI, C.; JORI, G. *Factors influencing the haematoporphyrin-sensitized photoinactivation of Candida albicans*. **Journal of General Microbiology** 135, 957-966, 1989.
- BLUMENSTEIN, A.; VIEKEN, K.; TASLER, R.; PURSCHWITZ, J.; VEITH, D.; FRANKENBERG-DINKEL, N.; FISCHER, R. *The Aspergillus nidulans phytochrome FphA represses sexual development in red light*. **Current Biology** 15, 1833-1838, 2005.
- BÖCKING, T.; BARROW, K. D.; NETTING, A. G.; CHILCOTT, T. C.; COSTER, H. G. L.; HÖFER, M. *Effects of singlet oxygen on membrane sterols in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. **European Journal of Biochemistry** 267, 1607-1618, 2000.

BOK, J. W.; KELLER, N. P. *LaeA, a regulator of secondary metabolism in Aspergillus spp.* **Eukaryotic Cell** 3(2), 527-535, 2004.

BONDARENKO, P. V.; CHELIUS, D.; SHALER, T. A. *Identification and relative quantitation of protein mixtures by enzymatic digestion followed by capillary reversed-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry.* **Analitical Chemistry** 74, 4741-4749, 2002.

BRAGA, G. U. L.; FLINT, S. D.; MILLER, C. D.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. *Both UV-A and UV-B radiation impair conidial culturability and delay germination in the entomopathogenic fungus Metarhizium anisopliae.* **Photochemistry and Photobiology** 74(5), 734-739, 2001.

BRANDT, S.; VON STETTEN, D.; GÜNTHER, M.; HILDEBRANDT, P.; FRANKENBERG-DINKEL, N. *The fungal phytochrome FphA from Aspergillus nidulans.* **The Journal of Biological Chemistry** 283(50), 34605-34614, 2008.

CALDERONE, R. A.; FONZI, W. A. *Virulence factors of Candida albicans.* **TRENDS in Microbiology** 9 (7), 327-335, 2001.

CALVO, A. M.; WILSON, R. A.; BOK, J. W.; KELLER, N. P. *Relationship between secondary metabolism and fungal development.* **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 66(2), 447-459, 2002.

CHAKRABARTY, A.; MALLICK, A.; HALDAR, B.; DAS, P.; CHATTOPADHYAY, N. *Binding interaction of a biological photosensitizer with serum albumins: a biophysical study.* **Biomacromolecules** 8, 920-927, 2007.

CHELIUS, D.; BONDARENKO, P. V. *Quantitative profiling of proteins in complex mixtures using liquid chromatography and mass spectrometry.* **Journal of Proteome Research** 1, 317-323, 2002.

CHEN, C-H.; RINGELBERG, C.; GROSS, R. H.; DUNLAP, J. C.; LOROS, J. J. *Genome-wide analysis of light-inducible responses reveals hierarchical light signaling in Neurospora.* **The EMBO Journal** 28, 1029-1042, 2009.

CHEVALLET, M.; LUCHE, S.; RABILLOUD, T. *Silver staining of proteins in polyacrylamide gels.* **Nature Protocols** 1 (4), 1852-1858, 2006.

CONESA, A.; GÖTZ, S.; GARCÍA-GOMEZ, J. M.; TEROL, J.; TALÓN, M.; ROBLES, M. *Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research.* **Bioinformatics** 21(18), 3674-3676, 2005.

COOPER, B.; GARRETT, W. M.; CAMPBELL, K. B. *Shotgun identification of proteins from uredospores of the bean rust Uromyces appendiculatus*. **Proteomics** 6, 2477-2484, 2006.

COOPER, B.; FENG, J.; GARRETT, W. M. *Relative, label-free protein quantitation: spectral counting error statistics from nine replicate MudPIT samples*. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry** 21, 1534-1546, 2010.

DAVIES, K. J. A. *Protein damage and degradation by oxygen radicals, I. General aspects*. **The Journal of Biological Chemistry** 262 (20), 9895-9901, 1987.

DAVIES, M. J. *Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences*. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 305, 761-770, 2003.

DE MENEZES, H. D.; MASSOLA JR, N. S.; FLINT, S. D.; SILVA JR, G. S.; BACHMANN, L.; RANGEL, D. E. N.; BRAGA, G. U. L. *Growth under visible light increases conidia and mucilage production and tolerance to UV-B radiation in the plant pathogenic fungus Colletotrichum acutatum*. **Photochemistry and Photobiology** 91, 397-402, 2015.

DEGREGORIO, M. W.; LEE, W. M. F.; RIES, C. A. *Candida infections in patients with acute leukemia: ineffectiveness of nystatin prophylaxis and relationship between oropharyngeal and systemic candidiasis*. **Cancer** 50, 2780-2784, 1982.

DÍAZ, A.; RANGEL, P.; DE OCA, Y. M.; LLEDÍAS, F.; HANSBERG, W. *Molecular and kinetic study of catalase-1, a durable large catalase of Neurospora crassa*. **Free Radical Biology & Medicine** 31 (11), 1323-1333, 2001.

DOSSELLI, R.; MILLIONI, R.; PURICELLI, L.; TESSARI, P.; ARRIGONI, G.; FRANCHIN, C.; SEGALLA, A.; TEARDO, E.; REDDI, E. *Molecular targets of antimicrobial photodynamic therapy identified by a proteomic approach*. **Journal of Proteomics** 77, 329-243, 2012.

EVANS, C.; NOIREL, J.; OW, S. Y.; SALIM, M.; PEREIRA-MEDRANO, A. G.; COUTO, N.; PANDHAL, J.; SMITH, D.; PHAM, T. K.; KARUNAKARAN, E.; ZOU, X.; BIGGS, C. A.; WRIGHT, P. C. *An insight into iTRAQ: where do we stand now?* **Analalytical and Bioanalytical Chemistry** 404, 1011-1027, 2012.

FANG, W.; ST LEGER, R. J. *Enhanced UV resistance and improved killing of malaria mosquitoes by photolyase transgenic entomopathogenic fungi*. **PLoS ONE** 7(8), doi:10.1371/journal.pone.0043069, 2012.

FRANCIS, S. H.; MERIWETHER, B. P.; PARK, J. H. Effects of photooxidation of histidine-38 on the various catalytic activities of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Biochemistry** 12 (2), 346-355, 1973.

FROEHLICH, A. C.; LIU, Y.; LOROS, J. J.; DUNLAP, J. C. *White collar-1, a circadian blue light photoreceptor, binding to the frequency promoter.* **Science** 297, 815-819, 2002.

FULLER, K. K.; RINGELBERG, C. S.; LOROS, J. J.; DUNLAP, J. C. *The fungal pathogen Aspergillus fumigatus regulates growth, metabolism, and stress resistance in response to light.* **mBio** 4(2), doi:10.1128/mBio.00142-13, 2013.

GAO, Q.; JIN, K.; YING, S-H. et al. *Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi Metarhizium robertsii and M. acridum.* **PLoS Genetics** 7(1), doi:10.1371/journal.pgen.1001264, 2011.

GONZALES, F. P.; MAISCH, T. *Photodynamic inactivation for controlling Candida albicans infections.* **Fungal Biology** 116, 1-10, 2012.

HARDING, R. W.; TURNER, R. V. *Photoregulation of the carotenoid biosynthesis pathway in albino and white collar mutants of Neurospora crassa.* **Plant Physiology** 68, 745-749, 1981.

HE, Q.; CHENG, P.; YANG, Y.; WANG, L.; GARDNER, K. H.; LIU, Y. *White collar-1, a DNA binding transcription factor and a light sensor.* **Science** 297, 840-843, 2002.

HORTON, P.; PARK, K-J.; OBAYASHI, T.; FUJITA, N.; HARADA, H.; ADAMS-COLLIER, C. J.; NAKAI, K. *WoLF PSORT: protein localization predictor.* **Nucleic Acids Research** 35, 585-587, 2007.

JENTSCH, S.; RUMPF, S. *Cdc48 (p97): a 'molecular gearbox' in the ubiquitin pathway?* **TRENDS in Biochemical Sciences** 32 (1), 6-11, 2006.

JORI, G.; GENNARI, G.; GALIAZZO, G.; SCOFFONE, E. *Photo-oxidation of horse heart cytochrome C. Evidence for methionine-80 as a heme ligand.* **FEBS Letters** 6 (3), 267-269, 1970a.

JORI, G.; GALIAZZO, G.; TAMBURRO, A. M.; SCOFFONE, E. *Dye-sensitized photooxidation as a tool for determining the degree of exposure of amino acids residues in proteins. The methionyl residues in ribonuclease A.* **The Journal of Biological Chemistry** 245 (13), 3375, 3383, 1970b.

JORI, G.; GENNARI, G.; FOLIN, M.; GALIAZZO, G. *Probing the topography of proteins in solution by photosensitized oxidation. The heme environment in horse heart ferrocytochrome c.* **Biochimica et Biophysica Acta** 229, 525, 528, 1971a.

JORI, G.; GENNARI, G.; TONIOLO, C.; SCOFFONE E. *Probing the topography of proteins in solution by photosensitized oxidation. The catalytic region of papain.* **Journal of Molecular Biology** 59, 151-168, 1971b.

JÜRGENS, G.; LANG, J.; ESTERBAUER, H. *Modification of human low-density lipoprotein by the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal.* **Biochimica et Biophysica Acta** 875, 103-114, 1986.

KENKARE, U. W.; RICHARDS, F. M. *The histidyl residues in ribonuclease-S. Photooxidation in solution and in single crystals; the iodination of histidine-12.* **The Journal of Biological Chemistry** 241 (13), 3197-3206, 1966.

KERSHAW, M. J.; MOORHOUSE, E. R.; BATEMAN, R.; REYNOLDS, S. E.; CHARNLEY, A. K. *The role of destruxins in the pathogenicity of Metarhizium anisopliae for three species of insect.* **Journal of Invertebrate Pathology** 74, 213-223, 1999.

KIM, S. Y.; TAK, J. K.; PARK, J-W. *Inactivation of NAD⁺-dependent isocitrate dehydrogenase by singlet oxygen derived from photoactivated rose bengal.* **Biochimie** 86, 501-507, 2004.

KRIETSCH, W. K. G.; PENTCHEV, P. G.; KLINGENBÜRG, H.; HOFSTÄTTER, T.; BÜCHER, T. *The isolation and crystallization of yeast and rabbit liver triose phosphate isomerase and a comparative characterization with the rabbit muscle enzyme.* **European Journal of Biochemistry** 14 (2), 289-300, 1970.

KROLL, K.; PÄHTZ, V.; KNIEMEYER, O. *Elucidating the fungal stress response by proteomics.* **Journal of Proteomics**, v. 97, 151-163, 2014.

KUBOI, S.; ISHIMARU, T.; TAMADA, S.; BERNARD, E. M.; PERLIN, D. S.; ARMSTRONG, D. *Molecular characterization of AfuFleA, an L-fucose-specific lectin from Aspergillus fumigatus.* **Journal of Infection and Chemotherapy** 19, 1021-1028, 2013.

LAEMMLI, U. K. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* **Nature** 227, 680-686, 1970.

LAMBRECHTS, S. A. G.; AALDERS, M. C. G.; VAN MARLE, J. *Mechanistic study of the photodynamic inactivation of Candida albicans by a cationic porphyrin.* **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 49 (5), 2026-2034, 2005.

- LENG, W.; LIU, T.; LI, R.; YANG, J.; WEI, C.; ZHANG, W.; JIN, Q. *Proteomic profile of dormant Trichophyton rubrum conidia*. **BMC Genomics** 9, doi: 10.1186/1471-2164-9-303, 2008.
- LI, F.; SHI, H-Q.; YING, S-H.; FENG, M-G. *Distinct contributions of one Fe- and two Cu/Zn-cofactored superoxide dismutases to antioxidation, UV tolerance and virulence of Beauveria bassiana*. **Fungal Genetics and Biology**, doi: 10.1016/j.fgb.2014.09.006, 2014.
- LIU, F.; LU, W.; FANG, Y.; LIU, J. *Evolution of oxidation dynamics of histidine: non-reactivity in the gas phase, peroxides in hydrated clusters, and pH dependence in solution*. **Physical Chemistry Chemical Physics** 16, 22179-22191, 2014.
- LORD, J. C. *From Metchnikoff to Monsanto and beyond: the path of microbial control*. **Journal of Invertebrate Pathology** 89, 19-29, 2005.
- MAGI, B.; ETTORRE, A.; LIBERATORI, S.; BINI L.; FROSALI, S.; NERI, P.; PALLINI, V.; DI STEFANO, A. *Selectivity of protein carbonylation in the apoptotic response to oxidative stress associated with photodynamic therapy: a cell biochemical and proteomic investigation*. **Cell Death and Differentiation** 11, 842-852, 2004.
- MANN, M.; WILM, M. *Error-tolerant identification of peptide in sequence databases by peptide sequence tags*. **Analytical Chemistry** 66, 4390-4399, 1994.
- MOONEY, J. L.; YAGER, L. N. *Light is required for conidiation in Aspergillus nidulans*. **Genes & Development** 4, 1473-1482, 1990.
- NADKARNI, D.; SAYRE, L. M. *Structural definition of early lysine and histidine adduction chemistry of 4-hydroxynonenal*. **Chemical Research in Toxicology** 8, 284-291, 1995.
- NAGAOKA, Y.; OTSU, K.; OKADA, F.; SATO, K.; OHBA, Y.; KOTANI, N.; FUJII, J. *Specific inactivation of cysteine protease-like cathepsin by singlet oxygen generated from naphthalene endoperoxides*. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 331, 215-223, 2005.
- NANHSEN, S.; BIELOW, C.; REINERT, K.; KOHLBACHER, O. *Tools for label-free peptide quantification*. **Molecular & Cellular Proteomics**, doi:10.1074/mcp.R112.025163, 2013.
- NASCIMENTO, É.; DA SILVA, S. H.; MARQUES, E. R.; ROBERTS, D. W.; BRAGA, G. U. L. *Quantification of cyclobutane pyrimidine dimers induced by UV-B radiation in conidia of the fungi Aspergillus fumigatus, Aspergillus nidulans, Metarhizium acridum and*

- Metarhizium robertsii. **Photochemistry and Photobiology** 86, 1259-1266, 2010.
- NOIR, S.; COLBY, T.; HARZEN, A.; SCHMIDT, J.; PANSTRUGA, R. *A proteomic analysis of powdery mildew (Blumeria graminis f. sp. hordei) conidiospores*. **Molecular Plant Pathology** 10(2), 223-226, 2009.
- OMATA, Y.; LEWIS, J. B.; ROTENBERG, S.; LOCKWOOD, P. E.; MESSER, R. L. W.; NODA, M.; HSU, S. D.; SANO, H.; WATAHA, J. C. *Intra- and extracellular reactive oxygen species generated by blue light*. **Journal of Biomedical Materials Research Part A** 77(3), 470-477, 2005.
- ORTIZ-URQUIZA, A.; LUO, Z.; KEYHANI, N. O. *Improving mycoinsecticides for insect biological control*. **Applied Microbiology and Biotechnology** 99, 1057-1068, 2015.
- PENG, J.; GYGI, S. P. *Proteomics: the move to mixtures*. **Journal of Mass Spectrometry** 36, 1083-1091, 2001.
- PFALLER, M. A.; JONES, R. N.; MESSER, S. A.; EDMOND, M. B.; WENZEL, R. P. *National surveillance of nosocomial blood stream infection due to Candida albicans: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE program*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** 31 (1), 327-332, 1998.
- PURSCHWITZ, J.; MÜLLER, S.; KASTNER, C.; SCHÖSER, M.; HAAS, H.; ESPESO, E. A.; ATOUI, A.; CALVO, A. M.; FISCHER, R. *Functional and physical interaction of blue- and red-light sensors in Aspergillus nidulans*. **Current Biology** 18, 255-259, 2008.
- QIN, L.; LIU, X.; LI, J.; CHEN, H.; YAO, Q.; YANG, Z.; WANG, L.; CHEN, K. *Protein profile of Nomuraea rileyi spore isolated from infected silkworm*. **Current Microbiology** 58, 578-585, 2009.
- QUAITE, F. E.; SUTHERLAND, B. M.; SUTHERLAND, J. C. *Action spectrum for DNA damage in alfalfa lowers predicted impact of ozone depletion*. **Nature** 358, 576-578, 1992.
- RANGEL, D. E. N.; BRAGA, G. U. L.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. *Variability in conidial thermotolerance of Metarhizium anisopliae isolates from different geographic origins*. **Journal of Invertebrate Pathology** 88, 116-125, 2005a.
- RANGEL, D. E. N.; BRAGA, G. U. L.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. *Influence of growth environment on tolerance to UV-B radiation, germination speed, and morphology of Metarhizium anisopliae var. acridum conidia*. **Journal of Invertebrate Pathology** 90, 55-58, 2005b.

RANGEL, D. E. N.; FERNANDES, É. K. K.; BRAGA, G. U. L.; ROBERTS, D. W. *Visible light during mycelial growth and conidiation of Metarhizium robertsii produces conidia with increased stress tolerance*. **FEMS Microbiology Letters** 315, 81-86, 2011.

RANGEL, D. E. N.; FERNANDES, É. K. K.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. *Culture of Metarhizium robertsii on salicylic-acid supplemented medium induces increased conidial thermotolerance*. **Fungal Biology** 116(3), 438-442, 2012.

REQUENA, J. ; CHAO, C-C.; LEVINE, R. L.; STADTMAN, E. R. *Glutamic and aminoadipic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of proteins*. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America** 98 (1), 69-74, 2001.

RIVETT, A. J.; LEVINE, R. L. *Metal-catalyzed oxidation of Escherichia coli glutamine synthetase: correlation of structural and functional changes*. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 278 (1), 26-34, 1990.

RODRIGUES, G. B.; DIAS-BARUFFI, M.; HOLMAN, N.; WAINWRIGHT, M. BRAGA, G. U. L. *In vitro photodynamic inactivation of Candida species and mouse fibroblasts with phenothiazinium photosensitisers and red light*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy** 10, 141-149, 2013.

RODRIGUEZ-ROMERO, J.; HEDTKE, M.; KASTNER, C.; MÜLLER, S.; FISCHER, R. *Fungi, hidden in soil or up in the air: light makes a difference*. **Annual Review of Microbiology** 64, 585-610, 2010.

ROGOWSKA-WRZESINSKA, A.; LE BIHAN, M-C.; THAYSEN-ANDERSEN, M.; ROEPSTORFF, P. *2D gels still have a niche in proteomics*. **Journal of Proteomics** 88, 4-13, 2013.

RUGER-HERREROS, C.; RODRIGUEZ-ROMERO, J.; FERNÁNDEZ-BARRANCO, R.; OLMEDO, M.; FISCHER, R.; CORROCHANO, L. M.; CANOVAS, D. *Regulation of conidiation by light in Aspergillus nidulans*. **Genetics** 188, 809-822, 2011.

SANGEORZAN, J. A.; BRADLEY, S. F.; HE, X.; ZARINS, L. T.; RIDENOUR, G. L.; TIBALLI, R. N.; KAUFFMAN, C. A. **The American Journal of Medicine** 97, 339-346, 1994.

SCHOLTE, E-J.; KNOLS, B. G. J.; SAMSON, R. A.; TAKKEN, W. *Entomopathogenic fungi for mosquito control: a review*. **Journal of Insect Science** 4 (19), <http://insectscience.org/4.19>, 2004.

- SHEN, H-R.; SPIKES, J. D.; KOPEČKOVÁ, P.; KOPEČEK, J. *Photodynamic crosslinking of proteins, II. Photocrosslinking of a model protein–ribonuclease A*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** 35, 213-219, 1996.
- SHEN, H-R.; SPIKES, J. D.; SMITH, C. J.; KOPEČEK, J. *Photodynamic cross-linking of proteins, IV. Nature of the His-His bond(s) formed in the rose bengal-photosensitized cross-linking of N-benzoyl-L-histidine*. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry** 130, 1-6, 2000.
- SHEVCHENKO, A.; TOMAS, H.; HAVLIS, J.; OLSEN, J. V.; MANN, M. *In-gel digestion for mass spectrometry characterization of proteins and proteome*. **Nature Protocols** 1 (6), 2856-2860, 2006.
- SILVESTER, J. A.; TIMMINS, G. S.; DAVIES, M. J. *Protein hydroperoxides and carbonyl groups generated by porphyrin-induced photo-oxidation of bovine serum albumin*. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 350 (2), 249-258, 1998.
- SINOHARA, H. *Induction of enzymes in dormant spore of Aspergillus oryzae*. **Journal of Bacteriology** 101(3), 1070-1072, 1970.
- SMITH, K. M.; SANCAR, G.; DEKHANG, R.; SULLIVAN, C. M.; LI, S.; TAG, A. G.; SANCAR, C.; BREDEWEG, E. L.; PRIEST, H. D.; MCCORMICK, R. F.; THOMAS, T. L.; CARRINGTON, J. C.; STAJICH, J. E.; BELL-PEDERSEN, D.; BRUNNER, M. FREITAG, M. *Transcription factors in light and circadian clock signaling networks revealed by genomewide mapping of direct targets for Neurospora white collar complex*. **Eukaryotic Cell** 9(10), 1549-1556, 2010.
- SPRIGGS, K. A.; BUSHELL, M.; WILLIS, A. *Translational regulation of gene expression during conditions of cell stress*. **Molecular Cell** 40, 228-237, 2010.
- ST LEGER, R. J.; CHARNLEY, A. K.; COOPER, R. M. *Production of polyphenol pigments and phenoloxidase by the entomopathogen, Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology** 52, 215-220, 1988.
- STOLL, D. A.; LINK, S.; KULLING, S.; GEISEN, R.; SCHMIDT-HEYDT, M. *Comparative proteome analysis of Penicillium verrucosum grown under light of short wavelength shows an induction of stress-related proteins associated with modified mycotoxin biosynthesis*. **International Journal of Food Microbiology** 175, 20-29, 2014.
- SUGUI, J. A.; STANLEY-KIM, H.; ZAREMBER, K. A.; CHANG, Y. C.; GALLIN, J. I.; NIERMAN, W. C.; KWON-CHUNG, K. J. *Gene differently expressed in conidia and hyphae of Aspergillus fumigatus upon exposure to human neutrophils*. **PLoS ONE** 3 (7), doi: 10.1371/journal.pone.0002655, 2008.

TALORA, C.; FRANCHI, L.; LINDENT, H.; BALLARIO, P.; MACINO, G. *Role of a White collar-1–white collar-2 complex in blue-light signal transduction*. **The EMBO Journal** 18(8), 4961-1968, 1999.

TEUTSCHBEIN, J.; ALBRECHT, D.; PÖTSCH, M.; GUTHKE, R.; AIMANIANDA, V.; CLAVAUD, C.; LATGÉ, J-P.; BRAKHAGE, A. A.; KNIEMEYER, O. *Proteome profiling and functional classification of intracellular proteins from conidia of the human-pathogenic mold Aspergillus fumigatus*. **Journal of Proteome Research** 9, 3427-3442, 2010.

TOMITA, M.; MASACHIKA, I.; UKITA, T. *Sensitized photooxidation of histidine and its derivatives. Products and mechanism of the reaction*. **Biochemistry** 8 (12), 5149-5160, 1969.

TSENG, M. N.; CHUNG, P. C.; TZEAN, S. S. *Enhancing the stress tolerance and virulence of an entomopathogen by metabolic engineering of dyhydroxynaphthalene melanin biosynthesis genes*. **Applied and Environmental Microbiology** 77(13), 4508-4519, 2011.

UCHIDA, K.; STADTMAN, E. R. *Covalent attachment of 4-hydroxynonenal to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. A possible involvement of intra- and intermolecular cross-linking reaction*. **The Journal of Biological Chemistry** 268 (9), 6388-6393, 1993.

VAN STEVENINCK, J.; DUBBELMAN, T. M. A. R. *Photodynamic intramolecular crosslinking of myoglobin*. **Biochimica et Biophysica Acta** 791, 98-101, 1984.

VÖDISCH, M.; SCHERLACH, K.; WINKLER, R.; HERTWECK, C.; BRAUN, H-P.; ROTH, M.; HAAS, H. WERNER, E. R.; BRAKHAGE, A. A.; KNIEMEYER, O. *Analysis of the Aspergillus fumigatus proteome reveals metabolic changes and the activation of the pseurotin A biosynthesis gene cluster in response to hypoxia*. **Journal of Proteome Research** 10, 2508-2524, 2011.

WAINWRIGHT, M.; PHOENIX, D. A.; LAYCOCK, S. L.; WAREING, D. R. A.; WRIGHT, P. A. *Photobacterial activity of phenothiazinium dyes against methicillin-resistant strains of Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiology Letters** 160, 177-181, 1998.

WANG, N.; YOSHIDA, Y.; HASUNUMA, K. *Loss of catalase-1 (Cat-1) results in decreased conidial viability enhanced by exposure to light in Neurospora crassa*. **Molecular Genetics and Genomics** 227, 13-22, 2007.

WANG, T.; CUI, Y.; JIN, J.; GUO, J.; WANG, G.; XINGFENG, Y.; HE, Q-Y.; ZHANG, G. *Translating mRNAs strongly correlate to protein in a multivariate manner and their translation ratios are phenotype specific*. **Nucleic Acids Research** 41 (9), 4743-4754, 2013.

WASHBURN, M. P.; WOLTERS, D.; YATES III, J. R. *Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology*. **Nature Biotechnology** 19, 242-247, 2001.

WEIL, L.; GORDON, W. G.; BUCHERT, A. R. *Photooxidation of amino acids in the presence of methylene blue*. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 33, 90-109, 1951.

WILKINS, M. R.; PASQUALI, C.; APPEL, R. D.; OU, K.; GOLAZ, O.; SANCHEZ, J-C.; YAN, J. X.; GOOLEY, A. A.; HUGHES, G.; HUMPHERY-SMITH, I.; WILLIAMS, K. L.; HOCHSTRASSER, D. F. *From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis*. **Nature Biotechnology** 14, 61-65, 1996.

WILM, M. *Quantitative proteomics in biological research*. **Proteomics** 9, 4590-4605, 2009.

WOLOSHUK, C. P.; KOLATTUKUDY, P. E. *Mechanism by which contact with plant cuticle triggers cutinase gene expression in the spores of Fusarium solani f. sp. pisi*. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA** 83, 1704-1708, 1986.

WU, C.; YANG, F.; SMITH, K. M.; PETERSON, M.; DEKHANG, R.; ZHANG, Y.; ZUCKER, J.; BREDEWEG, E. L.; MALLAPPA, C.; ZHOU, X.; LYUBTSKAYA, A.; TOWNSEND, J. P.; GALAGAN, J. E.; FREITAG, M.; DUNLAP, J. C.; BELL-PEDERSEN, D.; SACHS, M. S. *Genome-wide characterization of light-regulated genes in Neurospora crassa*. **G3: Genes, Genomes, Genetics** 4, 1731-1745, 2014.

YU, S-M.; RAMKUMAR, G.; LEE, Y. H. *Light quality influences the virulence and physiological responses of Colletotrichum acutatum causing anthracnose in pepper plants*. **Journal of Applied Microbiology** 115, 509-516, 2013.

ZHU, W.; SMITH, J. W.; HUANG, C-M. *Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics*. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, doi: 10.1155/2010/840518, 2010.

APÊNDICE A – Géis 2-D de conídios de *M. acridum* obtidos após crescimento em fotoperíodo de luz (12/12h) e no escuro

APÊNDICE B – Tabela das 501 proteínas identificadas nos conídios de *M. acridum*

Proteínas identificadas após busca no MASCOT e tratamento dos dados no Scaffold. Os critérios utilizados para correta identificação foram: 99% protein threshold, 1.0% peptide FDR e no mínimo 2 peptídeos. O número de acesso do gene pode ser usado para obtenção de maiores informações sobre cada proteína no UniProtKB.

ID	Proteína	Gene
1	1,2-a-D-mannosidase	MAC_09392
2	1,4-alpha-glucan branching enzyme	MAC_08053
3	14-3-3-like protein	MAC_00535
4	20S-pre-rRNA D-site endonuclease NOB1	MAC_05127
5	26S protease regulatory subunit 6A	MAC_09083
6	26S protease regulatory subunit 6B	MAC_01460
7	26S protease regulatory subunit 7	MAC_03025
8	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12	MAC_02053
9	26S proteasome regulatory subunit rpn1	MAC_01350
10	2-methylcitrate dehydratase	MAC_07576
11	30S ribosomal protein S9	MAC_01651
12	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	MAC_05937
13	3-isopropylmalate dehydratase	MAC_07916
14	3-isopropylmalate dehydrogenase	MAC_07201
15	3-octaprenyl-4-hydroxybenzoate carboxy-lyase, putative	MAC_08104
16	3-oxoacyl-(Acyl-carrier-protein) reductase	MAC_05785
17	3'-phosphoadenosine 5'-phosphatase isoform A	MAC_02729
18	40 kDa peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	MAC_08517
19	40S ribosomal protein S11	MAC_07279
20	40S ribosomal protein S14 (CRP2)	MAC_07998
21	40S ribosomal protein S15	MAC_03208
22	40S ribosomal protein S17	MAC_09611
23	40S ribosomal protein S18	MAC_06135
24	40S ribosomal protein S22	MAC_03740
25	40S ribosomal protein S25	MAC_03645
26	40S ribosomal protein S5	MAC_03646
27	40S ribosomal protein S7	MAC_06339
28	40S ribosomal protein S9	MAC_05355
29	40S ribosomal proteinS0	RPS0
30	40S ribosomal proteinS1	RPS1
31	40S ribosomal proteinS19	MAC_05422

32	40S ribosomal proteinS2	MAC_07611
33	40S ribosomal proteinS24	MAC_02834
34	40S ribosomal proteinS27	MAC_06880
35	40S ribosomal proteinS3, putative	MAC_08347
36	40S ribosomal proteinS6	MAC_05650
37	40S ribosomal proteinS8	MAC_05647
38	4-aminobutyrate aminotransferase	MAC_05007
39	60S acidic ribosomal protein P0	MAC_01037
40	60S acidic ribosomal protein P2	MAC_09327
41	60S ribosomal protein L13	MAC_04792
42	60S ribosomal protein L18	MAC_00798
43	60S ribosomal protein L25	MAC_01898
44	60S ribosomal protein L27a	MAC_07700
45	60S ribosomal protein L3	MAC_06540
46	60S ribosomal protein L33	MAC_07519
47	60S ribosomal protein L34	MAC_01669
48	60S ribosomal protein L6	MAC_07085
49	60S ribosomal protein L8	MAC_03422
50	60S ribosomal protein L9	MAC_04221
51	60S ribosomal proteinL10-A-like protein	MAC_02587
52	60S ribosomal proteinL11	MAC_05246
53	60S ribosomal proteinL12	MAC_06451
54	60S ribosomal proteinL2	MAC_03128
55	60S ribosomal proteinL20	MAC_07636
56	60S ribosomal proteinL22	MAC_02606
57	60S ribosomal proteinL23	MAC_05496
58	60S ribosomal proteinL26	MAC_03568
59	60S ribosomal proteinL27	MAC_02017
60	60S ribosomal proteinL32	MAC_01650
61	60S ribosomal proteinL4, putative	MAC_08397
62	60S ribosomal proteinL5	MAC_06901
63	60S ribosomal proteinL7	MAC_07999
64	60S ribosome biogenesis protein Sgt1	MAC_06665
65	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	MAC_05273
66	Acetolactate synthase	MAC_08298
67	Acetyl-CoA acetyltransferase	MAC_00682
68	Acetyl-CoA acetyltransferase	MAC_06608
69	Acetyl-CoA carboxylase	MAC_00440
70	Acetyl-coenzyme A synthetase	MAC_06547
71	Acid trehalase	MAC_06283
72	Actin	MAC_05223
73	Actin-like protein 3	MAC_03557
74	Acyl-CoA dehydrogenase	MAC_03998
75	Adenosine kinase	MAC_03129

76	Adenosylhomocysteinase	MAC_09337
77	ADP,ATP carrier protein	MAC_03644
78	ADP-ribosylation factor	MAC_07087
79	AIF-like mitochondrial oxidoreductase (Nfr1)	MAC_04473
80	Alanine--glyoxylate aminotransferase	MAC_03614
81	Alcohol dehydrogenase	MAC_04226
82	Alcohol dehydrogenase I	MAC_03558
83	Alcohol dehydrogenase, putative	MAC_07590
84	Aldehyde dehydrogenase	MAC_00094
85	Aldehyde reductase (GliO), putative	MAC_08973
86	Aldose 1-epimerase family protein	MAC_07642
87	Aldose-1-epimerase, putative	MAC_01909
88	Allergen Ale o 13	MAC_01083
89	Alpha-mannosidase	MAC_01035
90	Alpha-N-acetylglucosaminidase, putative	MAC_02272
91	Aminopeptidase 2	MAC_02189
92	Aminopeptidase, putative	MAC_02783
93	Ankyrin repeat protein	MAC_08653
94	ANTH domain protein	MAC_05353
95	Anthranilate phosphoribosyltransferase	MAC_03058
96	Aquaporin	MAC_08930
97	Argininosuccinate lyase	MAC_08123
98	Argininosuccinate synthase	MAC_07115
99	Aspartate carbamoyltransferase catalytic subunit	MAC_06383
100	Aspartate-tRNA ligase	MAC_06778
101	Aspartyl aminopeptidase	MAC_01421
102	Aspartyl-tRNA synthetase	MAC_06808
103	Asp-hemolysin	MAC_04084
104	ATP citrate lyase	MAC_03629
105	ATP phosphoribosyltransferase	MAC_04579
106	ATP synthase alpha chain	MAC_05245
107	ATP synthase D chain	MAC_04838
108	ATP synthase delta chain	MAC_00411
109	ATP synthase subunit beta	MAC_08054
110	ATP-binding cassette transporter ABC1	MAC_07971
111	ATP-citrate synthase subunit 1	MAC_03628
112	ATP-dependent RNA helicase DHH1	MAC_01471
113	BAR domain protein	MAC_08619
114	Beta-flanking protein	MAC_09545
115	Beta-tubulin	MAC_02727
116	Bifunctional purine biosynthesis protein	MAC_03077
117	Branched-chain-amino-acid aminotransferase	MAC_04541
118	C3HC4 type (RING finger) zinc finger containing protein	MAC_00251
119	Calmodulin	MAC_08562

120	Calreticulin	MAC_03794
121	cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit	MAC_02310
122	Carbonic anhydrase	MAC_01179
123	Carboxylesterase family protein	MAC_08008
124	Carboxylesterase family protein	MAC_09145
125	Carboxypeptidase Y	MAC_06140
126	Catalase	MAC_03712
127	Catalase	MAC_04470
128	Catalase	MAC_05389
129	Catalase-peroxidase	KATG
130	Cell cycle control protein	MAC_01024
131	Cell division control protein Cdc48	MAC_02555
132	Cell lysis protein-like protein	MAC_06431
133	Cell surface protein, putative	MAC_03904
134	Cell wall biogenesis protein phosphatase Ssd1, putative	MAC_05956
135	Cell wall protein	MAC_05133
136	Chaperonin	MAC_01313
137	Chitinase 18-7	MAC_01944
138	Choline dehydrogenase, putative	MAC_05829
139	Chorismate synthase	MAC_06131
140	Citrate synthase	MAC_06855
141	Citrate synthase	MAC_00023
142	Clathrin heavy chain	MAC_07821
143	Coatomer subunit alpha, putative	MAC_01675
144	Coatomer subunit delta, putative	MAC_08350
145	Coatomer subunit gamma	MAC_00977
146	Cobalamin-independent methionine synthase	MAC_03585
147	Cofilin, putative	MAC_09573
148	Cold response protein1	MAC_08666
149	COM1 regulatory protein	MAC_06243
150	Conidiation-specific protein 10	MAC_08011
151	Cortical patch protein	MAC_04870
152	Cut9 interacting protein Scn1, putative	MAC_06754
153	Cyclin-dependent kinases regulatory subunit	MAC_07667
154	Cystathionine beta-synthase	MAC_08907
155	Cystathionine gamma-lyase	MAC_04206
156	CysteinyI-tRNA synthetase	MAC_07879
157	Cytochrome c biogenesis factor	MAC_05167
158	Cytochrome c oxidase polypeptide VIb	MAC_06526
159	Cytochrome P450, putative	MAC_01110
160	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase 1	MAC_02396
161	D-arabinitol dehydrogenase ArbD, putative	MAC_00831
162	Dienelactone hydrolase family	MAC_08363
163	Dihydrolipoamide acetyltransferase component	MAC_08157

164	Dihydrolipoamide succinyltransferase, putative	MAC_00129
165	Dihydrolipoyl dehydrogenase	MAC_00111
166	Dipeptidyl peptidase	MAC_05261
167	Dipeptidyl peptidase, putative	MAC_07084
168	Disulfide isomerase	MAC_06576
169	DNA binding regulatory protein AmdX	MAC_01626
170	Dolichyl-phosphate-mannose-protein mannosyltransferase containing protein	MAC_08610
171	DsDNA-binding protein PCD5	MAC_07593
172	DUF52 domain-containing protein	MAC_00348
173	DUF833 domain-containing protein	MAC_04809
174	Elongation factor 1-alpha	MAC_00964
175	Elongation factor 1-beta	MAC_06028
176	Elongation factor 1-gamma	MAC_00457
177	Elongation factor 2	MAC_07773
178	Elongation factor 3	MAC_04249
179	Epoxide hydrolase 1	MAC_05449
180	Esterase, putative	MAC_07187
181	Esterase, putative	MAC_08887
182	Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha subunit	MAC_01300
183	Eukaryotic translation initiation factor 2 gamma subunit	MAC_01022
184	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	TIF32
185	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B	PRT1
186	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M	MAC_01057
187	Eukaryotic translation initiation factor eIF-5A	MAC_08632
188	Eukaryotic translation initiation factor subunit eIF-4F, putative	MAC_08336
189	Exonuclease	MAC_05995
190	Fatty acid synthase beta subunit dehydratase	MAC_06765
191	Ferulic acid esterase (FaeA), putative	MAC_09361
192	Fes/CIP4 domain-containing protein	MAC_00253
193	Flavin-containing amine oxidase dehydrogenase, putative	MAC_01894
194	Formamidase	MAC_07379
195	Formate dehydrogenase	MAC_08932
196	Fructose-bisphosphate aldolase, class II	MAC_08874
197	Fumarate reductase Osm1, putative	MAC_07651
198	Gamma-glutamyl phosphate reductase	MAC_03822
199	Glucose repressible protein Grg1	MAC_00515
200	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	MAC_07520
201	Glucose-6-phosphate isomerase	MAC_00280
202	Glucose-regulated protein	MAC_02661
203	Glucosidase I	MAC_03939
204	Glutamate carboxypeptidase	MAC_01080
205	Glutamate decarboxylase	MAC_00941
206	Glutamate synthase	MAC_00032
207	Glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase	MAC_04171

208	Glutamyl-tRNA synthetase	MAC_06052
209	Glutathione S-transferase family protein, putative	MAC_08912
210	Glutathione S-transferase II	MAC_07906
211	Glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase	MAC_03913
212	Glutathione-disulfidereductase	MAC_05615
213	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	MAC_09584
214	Glycine-rich cell wall structural protein 1	MAC_06488
215	Glycogen debranching enzyme	MAC_03960
216	GNAT family acetyltransferase	MAC_02718
217	G-protein beta subunit	MAC_00794
218	GTP cyclohydrolase II, putative	MAC_06455
219	GTP-binding nuclear protein RAN/TC4	MAC_05258
220	GTP-binding protein YchF	MAC_08311
221	HAD superfamily hydrolase, putative	MAC_09821
222	Heat shock 70 kDa protein	MAC_00721
223	Heat shock protein 101	MAC_05034
224	Heat shock protein 30	MAC_06364
225	Heat shock protein 30	MAC_07554
226	Heat shock protein 60 (Antigen HIS-62)	MAC_09574
227	Heat shock protein 70	MAC_02927
228	Heat shock protein 70	MAC_07411
229	Heat shock protein 70-like protein	MAC_03589
230	Heat shock protein 90	MAC_01954
231	Heat shock protein Hsp88	MAC_08627
232	Hexokinase	MAC_02975
233	HHE domain containing protein	MAC_07529
234	High mobility group protein	MAC_07492
235	Histone H1	MAC_01474
236	Histone H2B	MAC_00126
237	Histone H4	MAC_02515
238	Homogentisate 1,2-dioxygenase	MAC_01544
239	Hsp70 nucleotide exchange factor (Fes1)	MAC_05224
240	Hsp90 co-chaperone Cdc37	MAC_03732
241	Hypercellular protein HypA	MAC_06724
242	Imidazole glycerol phosphate synthase subunit hisF	MAC_02594
243	Immunogenic protein	MAC_06206
244	Importin beta-3 subunit	MAC_01684
245	Importin beta-4 subunit, putative	MAC_03351
246	Inorganic pyrophosphatase	MAC_03799
247	Integral membrane protein	MAC_04164
248	Iron/copper transporter Atx1, putative	MAC_03559
249	Isocitrate dehydrogenase subunit 2	MAC_07779
250	Isocitrate lyase	MAC_06856
251	Isoflavone reductase family protein	MAC_06003

252	Isoleucyl-tRNA synthetase	MAC_08748
253	Laccase	MAC_05384
254	Lactoylglutathione lyase	MAC_02674
255	Lcc2	MAC_02006
256	Leukotriene A-4 hydrolase	MAC_00333
257	Long-chain acyl-CoA synthetases & Acyl-protein synthetase	MAC_02652
258	L-PSP endoribonuclease family protein Brt1	MAC_04767
259	L-xylulose reductase	MAC_06617
260	Malate dehydrogenase	MAC_01200
261	Malate dehydrogenase	MAC_06678
262	Malate synthase	MAC_00864
263	Malic enzyme	MAC_05499
264	Mannitol-1-phosphate 5-dehydrogenase	MAC_00279
265	Mannose phospho-dolichol synthase	MAC_02268
266	Mannose-6-phosphate isomerase	MAC_07720
267	Membrane bound C2 domain protein (Vp115), putative	MAC_09253
268	Membrane protein, putative	MAC_09840
269	Mercuric reductase	MAC_04544
270	Merozoite capping protein-1	MAC_07539
271	Methionine aminopeptidase	MAC_07036
272	Methylmalonate semialdehyde dehydrogenase	MAC_03793
273	Minor allergen Alt a 7	MAC_01868
274	Mismatched base pair and cruciform DNA recognition protein, putative	MAC_01097
275	Mitochondrial aconitate hydratase, putative	MAC_01681
276	Mitochondrial ATPase inhibitor, putative	MAC_01019
277	Mitochondrial import receptor subunit TOM40	MAC_05227
278	Mitochondrial outer membrane 72kDa protein	MAC_01160
279	Mitochondrial peroxiredoxin PRX1	MAC_09051
280	Mitochondrial processing peptidase beta subunit	MAC_06204
281	Mitochondrial translation initiation factor IF-2, putative	MAC_08628
282	mRNA binding post-transcriptional regulator	MAC_07476
283	Multifunctional beta-oxidation protein	MAC_08073
284	MYB and HSA domain protein	MAC_02538
285	N-acetylglucosamine-phosphate mutase	MAC_05299
286	NAD binding Rossmann fold oxidoreductase	MAC_05582
287	NAD dependent epimerase/dehydratase family protein	MAC_03968
288	NAD kinase, putative	MAC_00513
289	NADP:D-xylulose dehydrogenase	MAC_06557
290	NADP-dependent glycerol dehydrogenase	MAC_01604
291	NADP-dependent leukotriene B4 12-hydroxydehydrogenase	MAC_04434
292	NADPH-dependent alpha-keto amide reductase, putative	MAC_07216
293	Neutral zinc metallopeptidase	MAC_02068
294	NIMA-interacting protein TinC	MAC_07493
295	NmrA family transcriptional regulator	MAC_02196

296	Nonribosomal peptide synthase	MAC_04406
297	NTF2 and RRM domain-containing protein	MAC_00397
298	Nucleolar protein NOP58-like protein	MAC_03597
299	Nucleoside diphosphate kinase A	MAC_07866
300	Nucleosome assembly protein	MAC_02397
301	Nucleosome binding protein	MAC_03215
302	O-acetylhomoserin (Thiol)-lyase	MAC_09440
303	Oleate-induced peroxisomal protein	MAC_03895
304	Oligosaccharyl transferase STT3 subunit	MAC_03175
305	Outer mitochondrial membrane protein porin	MAC_01165
306	Oxalate decarboxylase oxdC	MAC_05481
307	Oxidoreductase CipA-like, putative	MAC_01235
308	Oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family	MAC_09698
309	Oxidoreductase, shortchain dehydrogenase/reductase family	MAC_00812
310	Oxidoreductase,short chain dehydrogenase, putative	MAC_03790
311	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	MAC_02420
312	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	MAC_03621
313	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	MAC_05473
314	Perilipin-like protein	MAC_05605
315	Peroxiredoxin 5, prdx5, putative	MAC_07460
316	PH domain protein	MAC_03460
317	PH domain protein	MAC_04714
318	Phenazine biosynthesis protein, putative	MAC_03439
319	Phosphatidylserine decarboxylase family protein	MAC_00228
320	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	MAC_04725
321	Phosphoglucomutase 2	MAC_03213
322	Phosphoglycerate kinase	MAC_05705
323	Phosphoglycerate mutase, 2,3-bisphosphoglycerate-independent	MAC_01915
324	Phosphoketolase	MAC_04659
325	Phospholipase PldA, putative	MAC_06774
326	Phosphomannomutase	MAC_01048
327	Phosphoribosylformylglycinamide synthase	MAC_01754
328	Phosphorylase	MAC_08083
329	Phosphoserine aminotransferase	MAC_07927
330	Pirin domain protein,putative	MAC_04881
331	Plasma membrane ATPase (Proton pump)	MAC_00026
332	Poly(A) RNA binding protein	MAC_03484
333	Polyketide synthase	MAC_09549
334	Pre-mRNA processing splicing factor 8	MAC_04098
335	Profilin	MAC_06398
336	Proteasome activator subunit 4, putative	MAC_03367
337	Proteasome component C5	MAC_04215
338	Proteasome regulatory particle subunit (RpnC), putative	MAC_01925
339	Proteasome regulatory particle subunit Rpt4	MAC_04178

340	Proteasome subunit alpha type	MAC_00725
341	Proteasome subunit alpha type	MAC_01125
342	Proteasome subunit alpha type-7	MAC_00615
343	Proteasome subunit beta type	MAC_07804
344	Protein bli-3	MAC_02303
345	Protein disulfide isomerase	MAC_00546
346	Protein disulfide-isomerase tigA	MAC_08392
347	Protein mlo3-like protein (Fragment)	MAC_03580
348	Protein phosphatase PP2A regulatory subunit A	MAC_08344
349	Protein phosphatase PP2A regulatory subunit B	MAC_09072
350	Protein transport protein (SEC31)	MAC_06523
351	Protein transport protein SEC24	MAC_00097
352	Protein wos2, putative	MAC_03579
353	Putative acetohydroxy-acid isomeroreductase	MAC_03805
354	Putative B56-delta regulatory subunit of protein phosphatase 2A	MAC_06039
355	Putative cyanate lyase	MAC_02505
356	Putative enolase	MAC_04594
357	Putative KAP95 protein	MAC_04896
358	Putative MAP kinase	MAC_08024
359	Putative NAD(P)H-dependent oxidoreductase	MAC_05938
360	Putative O-methyltransferase	MAC_04314
361	Putative oxoglutaratedehydrogenase	MAC_08058
362	Putative pig glycolipid transfer protein	MAC_06775
363	Putative pyruvate decarboxylase	MAC_00102
364	Putative serine-tRNA ligase, cytosolic	MAC_02392
365	Putative TOM1 protein	MAC_05649
366	Putative transcription factor BTF3a	MAC_00877
367	Putative uncharacterized protein	MAC_00502
368	Putative uncharacterized protein	MAC_01137
369	Putative uncharacterized protein	MAC_01280
370	Putative uncharacterized protein	MAC_02301
371	Putative uncharacterized protein	MAC_02859
372	Putative uncharacterized protein	MAC_03164
373	Putative uncharacterized protein	MAC_04039
374	Putative uncharacterized protein	MAC_04377
375	Putative uncharacterized protein	MAC_04766
376	Putative uncharacterized protein	MAC_06535
377	Putative uncharacterized protein	MAC_07416
378	Putative uncharacterized protein	MAC_07531
379	Putative uncharacterized protein	MAC_00231
380	Putative uncharacterized protein	MAC_00434
381	Putative uncharacterized protein	MAC_00648
382	Putative uncharacterized protein	MAC_00776
383	Putative uncharacterized protein	MAC_01531

384	Putative uncharacterized protein	MAC_01532
385	Putative uncharacterized protein	MAC_01545
386	Putative uncharacterized protein	MAC_01747
387	Putative uncharacterized protein	MAC_02118
388	Putative uncharacterized protein	MAC_03530
389	Putative uncharacterized protein	MAC_03977
390	Putative uncharacterized protein	MAC_04123
391	Putative uncharacterized protein	MAC_04227
392	Putative uncharacterized protein	MAC_04233
393	Putative uncharacterized protein	MAC_04454
394	Putative uncharacterized protein	MAC_04758
395	Putative uncharacterized protein	MAC_04840
396	Putative uncharacterized protein	MAC_05022
397	Putative uncharacterized protein	MAC_05425
398	Putative uncharacterized protein	MAC_05447
399	Putative uncharacterized protein	MAC_06750
400	Putative uncharacterized protein	MAC_06965
401	Putative uncharacterized protein	MAC_07019
402	Putative uncharacterized protein	MAC_07092
403	Putative uncharacterized protein	MAC_07175
404	Putative uncharacterized protein	MAC_07308
405	Putative uncharacterized protein	MAC_07358
406	Putative uncharacterized protein	MAC_07370
407	Putative uncharacterized protein	MAC_07570
408	Putative uncharacterized protein	MAC_08016
409	Putative uncharacterized protein	MAC_08088
410	Putative uncharacterized protein	MAC_08204
411	Putative uncharacterized protein	MAC_08578
412	Putative uncharacterized protein	MAC_08604
413	Putative uncharacterized protein	MAC_08911
414	Putative uncharacterized protein	MAC_09004
415	Putative uncharacterized protein	MAC_09240
416	Putative uncharacterized protein	MAC_09470
417	Putative uncharacterized protein	MAC_09506
418	Putative uncharacterized protein	MAC_09586
419	Pyridoxal-dependent decarboxylase domain protein	MAC_09521
420	Pyruvate carboxylase	MAC_06145
421	Pyruvate dehydrogenase protein x component	MAC_08665
422	Pyruvate kinase	MAC_02385
423	QDE2-like protein	MAC_03515
424	Quinone oxidoreductase	MAC_02039
425	Rab GDP-dissociation inhibitor	MAC_00732
426	RAS small monomeric GTPase Rab6	MAC_08169
427	Ribitol kinase	MAC_00029

428	Ribosomal protein	MAC_03121
429	Ribosomal protein L14	MAC_04839
430	Ribosomal protein L15	MAC_05673
431	Ribosomal protein L19	MAC_00790
432	Ribosomal protein S4	MAC_00881
433	RNA binding effector protein Scp160, putative	MAC_02684
434	RNA recognition motif containing protein	MAC_09755
435	Rnapii degradation factor def1	MAC_03054
436	RNP domain protein	MAC_00108
437	RNP domain protein	MAC_07937
438	S-(Hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase	MAC_07552
439	Saccharopine dehydrogenase	MAC_01390
440	Saccharopine dehydrogenase	MAC_09690
441	Sec14 cytosolic factor	MAC_01463
442	Ser/Thr protein phosphatase	MAC_03388
443	Serine hydroxymethyltransferase	MAC_04626
444	Serine hydroxymethyltransferase	MAC_00791
445	Serine/threonine-protein kinase SRPK2	MAC_08254
446	Serine/threonine-protein phosphatase	MAC_08661
447	SH3 domain protein	MAC_09613
448	Short-chain dehydrogenase/reductase family protein	MAC_06857
449	Signal recognition particle subunit SRP72	MAC_06435
450	Single-stranded DNA-binding protein	MAC_00609
451	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1	MAC_08139
452	Sphingolipid long chain base sensory protein, putative	MAC_07392
453	Sphingolipid long chain base-responsive protein PIL1	MAC_03800
454	Stress response protein (Ish1), putative	MAC_09082
455	Suaprga1-like protein	MAC_07455
456	Subtilisin-like serine protease PR1A	MAC_01059
457	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	MAC_01061
458	Succinate semialdehyde dehydrogenase	MAC_06209
459	Sulfate adenylyltransferase	MET3
460	Superoxide dismutase	MAC_01763
461	Superoxide dismutase	MAC_01993
462	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	MAC_04849
463	T-complex protein 1 subunit alpha	MAC_01257
464	TH14-3-3 like protein	MAC_01018
465	Thiamine thiazole synthase	MAC_01186
466	ThiJ/PfpI domain-containing protein	MAC_05717
467	ThiJ/PfpI family protein	MAC_06731
468	ThiJ/PfpI family protein	MAC_07323
469	Thioredoxin	MAC_05509
470	Thioredoxin reductase	MAC_06194
471	Threonyl-tRNA synthetase, putative	MAC_05023

472	TPR Domain containingprotein	MAC_08305
473	Transaldolase	MAC_04851
474	Transcription factor (Snd1/p100), putative	MAC_04850
475	Transketolase	MAC_01145
476	Translationally-controlled tumor protein	MAC_06692
477	Trehalose-6-phosphatesynthase 1	MAC_01919
478	Triosephosphate isomerase	MAC_00401
479	tRNA exportin	MAC_00423
480	Tropomyosin-1	MAC_02416
481	Tubulin alpha chain	MAC_05657
482	Tubulin beta chain	MAC_01776
483	Tyrosinase	MAC_02956
484	Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex core protein 2	MAC_05662
485	Ubiquitin	MAC_01946
486	Ubiquitin-activating enzyme E1 1	MAC_03978
487	UDP-glucose 4-epimerase Gal10	MAC_02038
488	UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase	MAC_01676
489	UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase	MAC_06193
490	Urg3	MAC_04059
491	Uricase	MAC_01658
492	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	MAC_02994
493	Vacuolar ATP synthasesubunit B	MAC_05655
494	Vacuolar protease A	MAC_01466
495	Vacuolar protein 8	MAC_08735
496	Vacuolar sorting protein 1	MAC_05118
497	Vip1	MAC_04751
498	Zinc-binding dehydrogenase	MAC_06620
499	Zinc-binding oxidoreductase CipB	MAC_07877
500	Zinc-binding oxidoreductase ToxD, putative	MAC_02299
501	Zinc-binding oxidoreductase ToxD, putative	MAC_08195

APÊNDICE C – Análise da variabilidade dos experimentos de LC-MS/MS

Em cada experimento de LC-MS/MS, as amostras de Escuro e de Claro (analisadas em duplicata técnica) receberam as nomenclaturas A1 e A2 (Escuro), e A3 e A4 (Claro). Todas as análises foram realizadas sempre na ordem A1, A2, A3 e A4.

De maneira geral (exceto no experimento 2), observou-se queda da quantidade de espectros em função da sequência da análise:

	Escuro		Claro	
	A1	A2	A3	A4
EXP 1	3540	3106	2736	1554
EXP 2	3368	3248	3599	3162
EXP 3	4053	3665	2255	1841

Além da evidente queda no número de espectros, observou-se também considerável variabilidade entre as duplicatas técnicas de cada experimento, sendo que muitas proteínas foram identificadas em uma amostra e não o foram na sua equivalente. É importante notar que as amostras analisadas em duplicata técnica são idênticas no que diz respeito à procedência (ver Materiais e Métodos). Por exemplo, as amostras A1 e A2 do experimento 1 identificaram, respectivamente, 270 e 230 proteínas. Porém, somente 163 proteínas foram encontradas em ambas, o que corresponde a apenas 60 e 71% do total, respectivamente. Esse padrão foi encontrado em todas as análises:

		Proteínas identificadas	Proteínas compartilhadas	% do total
EXP 1	A1	270	163	60,4
	A2	230		70,9
	A3	219	100	45,7
	A4	124		80,6
EXP 2	A1	293	188	64,2
	A2	270		69,6
	A3	284	181	63,7
	A4	247		73,3

EXP 3	A1	197	149	75,6
	A2	209		71,3
	A3	158	108	68,4
	A4	150		72,0

Se considerarmos todas as amostras de Escuro analisadas (ou seja, A1 e A2 dos experimentos 1, 2 e 3), o total compartilhado é de apenas 53 proteínas. O mesmo se repete para as amostras de Claro, porém com 38 proteínas.

Além disso, foi analisada a correlação (em termos de abundância) das proteínas compartilhadas entre as duplicatas técnicas. Para isso, foram usados os valores de emPAI (*exponentially modified-Protein Abundance Index*) fornecidos pelo MASCOT. De maneira geral, foi observada uma correlação entre 60 e 85% das proteínas compartilhadas entre duplicatas técnicas, conforme mostram os gráficos a seguir:

Em função desses resultados, optou-se por combinar os dados obtidos para cada uma das condições estudadas (Claro e Escuro). Dessa forma, as diferentes amostras de Claro ou de Escuro foram estudadas como uma única amostra cada, minimizando os problemas de reprodutibilidade na identificação das mesma proteínas nas amostras.

APÊNDICE D – Géis 2-D de *C. albicans* após exposição somente ao fotossensibilizador (FS Escuro) e após TFA com 3 e 10 J cm⁻²