

SECRETOMAS DE FUNGOS PATOGÊNICOS HUMANOS: UMA INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO

OLIVEIRA, Amanda Rodrigues de; ROCHA, Márcia Santos

amandaro.biomed@hotmail.com

Centro de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão Oswaldo Cruz

Resumo: *O secretoma pode ser definido como as proteínas secretadas por uma célula e a maquinaria celular envolvida em sua síntese. Engloba diferentes classes de moléculas, tais como citocinas, quimiocinas, hormônios, anticorpos, enzimas digestivas, proteinases extracelulares, toxinas, entre outras. O mecanismo clássico de secreção em eucariotos envolve o reconhecimento da sequência sinal e a exportação das proteínas via Retículo Endoplasmático/Golgi. Entretanto, algumas proteínas secretadas não possuem peptídeo sinal, sugerindo a existência de rotas de transporte não clássico. Micro-organismos patogênicos se utilizam de proteínas secretadas não apenas para obtenção de nutrientes, como também, para virulência e sobrevivência em condições adversas do hospedeiro. Dessa maneira, o secretoma auxilia na compreensão dos mecanismos de patogênese entre espécies fúngicas, acrescentando informações sobre as coleções de moléculas que estão sendo expressas em determinadas condições e se as diferenças podem ser relacionadas à capacidade destes isolados se consolidarem no hospedeiro e causarem doença. Portanto, a análise de secretomas, principalmente de micro-organismos patogênicos, torna-se uma ferramenta útil no entendimento das interações patógeno-hospedeiro.*

Palavras-chave: Secretoma, Fungos, Virulência.

Abstract: *The secretome can be defined as the proteins secreted by a cell and the cellular machinery involved in its synthesis. The secretome comprises several classes of molecules, such as cytokines, chemokines, hormones, antibodies, digestive enzymes, extracellular proteinases, toxins, among others. The classical mechanism of secretion in eukaryotes involves the recognition of the signal sequence and the export of proteins via the Endoplasmic Reticulum / Golgi. However, some secreted proteins have no signal peptide, suggesting the existence of non-classical transport routes. Pathogenic microorganisms utilize secreted proteins not only for obtaining nutrients as well as for virulence and survival in adverse conditions of the host. Thus, the secretome assists in understanding the mechanisms of pathogenesis of fungal species, adding information about collections of molecules that are expressed under certain conditions and the differences may be related to the ability of these isolates to consolidate in the host and cause disease. Therefore, the analysis of secretomes mainly of pathogenic micro-organisms, it becomes a useful tool in the understanding of host-pathogen interactions.*

Keywords: Secretome, Fungi, Virulence.

1. INTRODUÇÃO

A fim de estabelecer infecção, fungos patogênicos que colonizam uma variedade de substratos dos tecidos humanos devem ter a habilidade de se adaptar e modificar sua expressão gênica, em resposta às mudanças no ambiente. A virulência e a patogenicidade de fungos é influenciada por proteínas que auxiliam na interação com o hospedeiro, conferindo

um fenótipo mais patogênico, por permitir ao fungo aderir com maior facilidade aos tecidos do hospedeiro, invadir novos compartimentos, evadir-se da resposta imune, bem como outras interações hospedeiro-específicas (MARCOS, 2011).

O termo secretoma foi primeiramente utilizado para descrever o repertório de proteínas que são processadas e lançadas via Retículo Endoplasmático (RE) → complexo de Golgi (TJALSMA et al., 2000), mas é corriqueiramente mais usado para denotar proteínas secretadas por células em regiões extracelulares (GREENBAUM et al., 2001).

Na verdade, duas categorias funcionais podem caracterizar o secretoma de fungos. A primeira, inclui atividades essenciais que permitem a célula fúngica se desenvolver como saprofitas e a segunda, inclui qualquer sistema que permite que o organismo fúngico cresça às custas ou em associação com um hospedeiro vivo. Os diferentes comportamentos dos fungos nestas condições, sapróbota/parasita, culminam na necessidade de caracterizar estritamente o secretoma de cada organismo em relação a seu nicho (GIRARD et al., 2013).

Em muitos fungos, proteínas secretadas também foram descritas desempenhando funções não clássicas. Moléculas citosólicas podem ser lançadas pra fora da célula, desempenhar novas funções e atuar diretamente sobre o hospedeiro, a fim de conseguir sobrevivência e estabelecer infecção. Desta maneira, o secretoma engloba proteínas que desempenham importantes funções, tais como obtenção de nutrientes, comunicação célula-célula, colonização do substrato, detoxificação do meio, entre outros. Logo, o secretoma pode ser considerado como um compartimento biológico real, tendo um papel essencial na estratégia da infecção fúngica (SILVA et al., 2012).

A análise de secretomas, principalmente de micro-organismos patogênicos, é necessária, visto sua importância no entendimento das interações patógeno-hospedeiro. Diante disso, são levantadas as seguintes questões: Quais os mecanismos envolvidos na secreção proteica em fungos patogênicos humanos? Quais os principais fatores de virulência já descritos em secretomas fúngicos? Este artigo de revisão tem o propósito de contextualizar o leitor sobre a importância de se estudar os secretomas de espécies fúngicas, explicar o seu papel no estabelecimento e sucesso da infecção, explicitando as principais rotas de secreção proteicas abordando trabalhos relevantes na área.

2. SECRETOMAS FÚNGICOS

2.1 Secretoma

O secretoma representa cerca de 30% do proteoma de um organismo. Engloba o conjunto completo de produtos de genes secretados por uma célula e inclui funcionalmente diferentes classes de moléculas, tais como citocinas, quimiocinas, hormônios, anticorpos, enzimas digestivas, proteinases extracelulares, toxinas, entre outras (RANGANATHAN; GARG, 2009). O secretoma pode ainda ser definido como as proteínas secretadas e a maquinaria celular envolvida em sua síntese (TJALSMA et al., 2000).

A secreção de proteínas em uma célula é um mecanismo altamente dinâmico e sua composição muda em resposta à estímulos externos (CACCIA et al., 2013). Nesse sentido, proteínas secretadas podem, diretamente ou indiretamente, estar envolvidas no diálogo molecular com células do hospedeiro, capacitando sua sobrevivência, multiplicação e disseminação (SILVA et al., 2012).

A secreção de proteínas por fungos tem a função de cumprir diversos papéis biológicos, para garantir sobrevivência e multiplicação do micro-organismo nas diversas condições ambientais. Uma delas é a digestão de potenciais substratos presentes no meio e quebra de matéria orgânica para obtenção de nutrientes, tais como carbono e nitrogênio. Muitas dessas

proteínas são de grande interesse em biotecnologia e no estudo de patógenos (CARBERRY et al., 2006; FERNÁNDEZ-ACERO et al., 2007; YAJIMA; KAV, 2006).

2.2 Secretomas fúngicos

Micro-organismos patogênicos se utilizam de proteínas secretadas não apenas para obtenção de nutrientes, como também, para virulência e sobrevivência em condições hostis do hospedeiro.

Um estudo comparou o secretoma de *C. albicans* sob diferentes condições de crescimento, em diferentes condições de temperatura e pH e na presença do indutor de hifas N-acetilglucosamina, com o intuito de caracterizar o lançamento de proteínas extracelulares sob condições ambientais adversas e obteve achados interessantes. Foram identificadas 44 proteínas secretórias, sendo 29 delas apresentando uma localização ou função relacionada com a parede celular. Também foi detectada uma forma solúvel da proteína da membrana plasmática Msb2 e 6 proteínas preditas de estarem associadas com os compartimentos precoces da via secretora (Ape2, Cyp5, Kar2, Mnt1, Pdi1 e Ubi3). Ainda 28 proteínas citosólicas foram encontradas. Os achados refletem a dinâmica natural do secretoma. Um alto potencial imunogênico foi detectado em muitas proteínas encontradas (SORGO et al., 2010).

Vallejo et al., (2012) caracterizaram o proteoma extracelular e de vesículas de leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis*, isolado Pb18 e compararam as proteínas identificadas com ortólogos de outras vesículas secretórias fúngicas. Oitenta e cinco proteínas foram identificadas exclusivamente nas frações vesiculares, 140 foram detectadas apenas em frações livres de vesícula, e 120 sequências se sobrepunham em ambas as frações. Cerca de 70 % das proteínas foram preditas de serem secretadas, sendo que destas apenas 10% foram preditas de possuírem o peptídeo sinal. Houve um enriquecimento das seguintes categorias funcionais: tradução e metabolismo de carboidratos, seguido por oxidação / redução, transporte, metabolismo de proteínas, resposta ao stress, e os processos de sinalização. Algumas destas desempenham funções claras durante a infecção, modulando a resposta imune e promovendo a adesão à componentes da matriz.

Utilizando uma abordagem proteômica combinando eletroforese bidimensional e espectrometria de massas (MALDI-Q-TOF MS / MS) Weber et al., (2012) analisaram o perfil de expressão de proteínas secretadas por células de levedura e micélio de *P. brasiliensis*, isolado Pb01. Neste estudo, 160 proteínas / isoformas não redundantes foram identificados, incluindo 30 preferencialmente secretadas em micélio e 24 preferencialmente secretadas em levedura. A análise de predição de adesinas utilizando o servidor web *Faapred* revelou que aproximadamente 21% do secretoma de *Paracoccidioides* era composto por proteínas *like*-adesinas, proteínas estas que são muito importantes na estratégia de infecção fúngica. Weber ainda investigou o efeito da secreção proteica na adesão/internalização de células fúngicas por macrófagos, utilizando um inibidor de secreção proteica, Brefeldin A, e mostrou que a inibição da secreção diminui a associação de macrófagos com células de levedura. Dezoito proteínas de *Paracoccidioides* foram encontradas no citoplasma de macrófagos infectados, sugerindo o papel de proteínas extracelulares na sobrevivência do fungo dentro dos macrófagos.

A fim de tentar elucidar os mecanismos envolvidos na interação patógeno-hospedeiro, Fekkar et al., (2012) realizaram uma análise proteômica por meio de gel de eletroforese diferencial (DIGE) para averiguar o secretoma de células epiteliais brônquicas infectadas por *Aspergillus fumigatus*. Foram identificadas proteínas de origem humana classicamente localizadas no compartimento lisossomal: Nagase, catepsina B e catepsina D e algumas proteínas pertencentes ao sistema tiorredoxina, por exemplo. Estes achados sugerem que a habilidade das células epiteliais de reagir à infecção fúngica segue dois caminhos: (1) a

libertação de enzimas lisossomais que podem estar envolvidos, posteriormente, na resposta imune e (2) a libertação de proteínas envolvidos no sistema redox que pode proteger as células contra os danos causados quer pela agressão por fungos ou pela resposta inflamatória do hospedeiro.

Ainda no gênero *Aspergillus*, em um levantamento realizado com dados proteômicos foram encontradas 28 proteínas de superfície, 102 proteínas secretadas e 139 proteínas intracelulares a partir de 10 diferentes estudos. Foi vista a importância dos estudos proteômicos para o entendimento do gênero e ressaltada a necessidade de implementação de novas técnicas para suprimir as dificuldades da metodologia de eletroforese bidimensional na identificação de proteínas com baixa abundância. Quanto ao secretoma, é destacada a importância das enzimas secretadas por fungos saprofitos na aquisição de fontes de nutrientes do meio e da forte influência da condição da cultura e da fonte de nutrientes (KIM; NANDAKUMAR; MARTEN, 2008).

Utilizando uma combinação de ferramentas de bioinformática um grupo de pesquisadores conseguiu prever o secretoma do fungo *Fusarium graminearum* e ainda, compararam com genoma de 57 outros fungos e oomicetos. Noventa e nove por cento do secretoma predito foi suportado por evidências transcricionais. Foi possível prever 1369 proteínas localizadas no espaço extracelular, incluindo as com âncoras GPI. Em um segundo momento, a fim de refinar esse número de proteínas para proteínas com alta probabilidade de serem secretadas, novas análises foram feitas, o que reduziu as proteínas secretadas para 574. A análise comparativa com outras espécies dentro do gênero *Fusarium* revelou alto grau de similaridade entre eles, sendo que a espécie *F. solanum* apresentou-se mais dissimilar, com 82,75% de conservação, mostrando que um pequeno número de proteínas preditas de serem secretadas é encontrado de maneira espécie específica (BROWN; ANTONIW; HAMMOND-KOSACK, 2012).

Albuquerque et al., (2009) demonstraram que, leveduras de *Histoplasma capsulatum* produzem vesículas heterogêneas que são secretadas extracelularmente. Grande parte destas vesículas foi composta de fosfolípidos e proteínas associadas à resposta ao estresse, patogenicidade, vias de transdução de sinal, metabolismo de aminoácidos, arquitetura da parede celular e virulência. Foi demonstrado ainda, que algumas proteínas das vesículas, tais quais, histona 2B e a proteína de choque térmico Hsp60 reagiram com soro de pacientes com histoplasmose, sugerindo o envolvimento destas vesículas nas interações patógeno-hospedeiro. Culturas do sobrenadante de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *Sporothrix schenckii* e *S. cerevisiae* revelaram que outros ascomicetos também produzem estas vesículas extracelulares.

2.3 Rotas de secreção

A maioria das proteínas secretadas em eucariotos é exportada pela via Retículo Endoplasmático/Golgi, guiadas pelo peptídeo sinal (BLOBEL; DOBBERSTEIN, 1975). As sequências sinal são extensões N-terminais das cadeias polipeptídicas nascentes que direcionam a proteína alvo para a membrana do retículo endoplasmático (RE) (VON HEIJNE, 1985). Em eucariotos, sequências sinal orientam a inserção de proteínas na membrana do retículo endoplasmático e são normalmente clivadas pela peptidase de sinal (SPases) (PAETZEL et al., 2002). Os peptídeos sinal resultantes são presumivelmente rapidamente degradados, mas alguns ainda têm funções por conta própria (KAPP et al., 2009).

As proteínas são removidas do RER através de um processo de invaginação da membrana e, em seguida, eles são embalados em vesículas membranosas transicionais. Essas vesículas caminham para uma organela vizinha, o complexo de Golgi. Dentro do Golgi existem

enzimas especializadas, as chamadas chaperonas auxiliam as proteínas recentemente sintetizadas a se dobrarem nas suas conformações adequadas. Estas, então, migram para a membrana plasmática onde se fundem a esta e descarregam o seu conteúdo para o exterior, processo este que é chamado exocitose (LODISH et al., 2000).

No entanto, tem sido descrito a existência, no meio extracelular, de inúmeras proteínas, sem a sequência sinal e funcionalmente ativas sugerindo a existência de rotas de transporte não clássicas (NOMBELA et al., 2006; CUERVO et al., 2009; NICKEL & RABOUILLE, 2009; DING et al., 2012). Nombela et al., (2006) descreveram rotas alternativas de secreção hipotéticas, tais quais, adesão de proteínas à vesículas endossomais, transferência passiva/translocação através da membrana, reconhecimento de um substrato específico. Nickel & Rabouille (2009) também descreveram que algumas proteínas contendo peptídeo sinal eram secretadas de forma não-convencional, sendo que, a saída do RE não envolvia a secreção por vesículas COPII ou não envolvia a passagem pelo aparelho de Golgi. Eles também descreveram quatro mecanismos alternativos de secreção de proteínas citoplasmáticas solúveis, um envolvendo a translocação direta através da membrana plasmática sem passar por Golgi, e outros três mecanismos envolvendo o transporte vesicular.

2.4 Fatores de Virulência em Fungos Patogênicos

A produção de enzimas por micro-organismos está intimamente relacionada com as principais condições que determinam o crescimento em cultura e o desenvolvimento fúngico. A secreção de peptidases que clivam substratos extracelulares pode ser considerada como um fator de virulência durante a infecção. Santos et al., (2006) identificaram duas novas classes de peptidases extracelulares em um isolado clínico de *Candida albicans*: uma metalopeptidase de 60kDa e uma serina peptidase de 50kDa. Neste estudo detectou-se que a serina peptidase de 50kDa foi hábil em degradar IgG, principalmente sua cadeia leve e que possivelmente participa nos mecanismos de escape da resposta imune do hospedeiro, o que leva a uma maior sobrevivência do fungo nas condições hostis do hospedeiro.

C. albicans dispõe de muitos fatores de virulência que contribuem para a patogênese da infecção. Eventos iniciais na patogênese da candidíase em uma superfície mucosa englobam: germinação das células de levedura, a penetração na mucosa e a fagocitose induzida de uma levedura por uma célula da mucosa. Estes eventos são promovidos por adesinas [Als1p, Als5p (Ala1p), Hwp1p e Int1p] e enzimas secretadas (Sap e Plb1p) (CALDERONE; FONZI, 2001). O fungo entomopatogênico *Magnaporthe grisea* também utiliza serino proteases secretadas em resposta ao estresse nutricional de nitrogênio extracelular. A deleção do gene que codifica para estas proteases indicou que ele está envolvido na patogenicidade de *M. grisea* à plantas (DONOFRIO et al., 2006).

O processo de adesão, também muito importante para o sucesso da infecção, implica que o patógeno reconheça carboidratos e/ou proteínas ligantes na superfície da célula do hospedeiro ou proteínas constituintes da membrana basal para favorecer sua interação (PATTI et al., 1994). A adesão à células endoteliais assim como, componentes da matriz extracelular mostra-se essencial para o sucesso da invasão e para o estabelecimento da relação patógeno-hospedeiro.

Lima et al., (1999) estudaram a capacidade de ligação de *Sporothrix schenckii* a diversas proteínas da matriz celular. Por meio da imobilização de fibronectina, trombospondina e fibrinogênio em uma placa de ELISA e a incubação com células leveduriformes e conídios, verificou-se que ambas as fases fúngicas se ligavam à fibronectina e que os conídios se ligaram também ao fibrinogênio. Ambas as fases também se ligaram à laminina de diferentes fontes (murina e humana) e verificou-se que a razão da ligação à fibronectina e à laminina era

similar. Por último demonstrou-se que conídios e leveduras eram capazes de se ligar também ao colágeno tipo II, mas que os conídeos apresentavam uma maior adesão comparadas às células leveduriformes. A identificação destas adesinas é importante para o entendimento da doença, bem como para a criação de novas terapias antifúngicas.

Em *Paracoccidioides*, a adesão às células da matriz extracelular (MEC) também é vista como um importante determinante de patogenicidade. Algumas proteínas fúngicas incluindo a glicoproteína de 43 kDa (gp43), a proteína de 30 kDa, proteínas de 19 e 32 kDa, a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e a enolase, tem sido identificadas mediando a adesão à componentes da matriz celular em células humanas (VICENTINI et al., 1994; ANDREOTTI, 2006; NOGUEIRA et al., 2010; GONZÁLES et al., 2005; BARBOSA et al., 2006; MENDES-GIANNINI et al., 2006). No mesmo modelo, a presença de proteínas com localização predita no citoplasma em outros compartimentos celulares foi descrita para a gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase - GAPDH (BARBOSA et al., 2006), para a triose fosfato isomerase - TPI (PEREIRA et al., 2007) e para a formamidase (BORGES et al., 2009), localizadas no citoplasma e na parede celular. Muito se especula que estas proteínas podem ser proteínas “moonlightings” isto é, realizam mais de uma função na célula, dependendo da sua localização (NOMBELA; GIL; CHAFFIN, 2006).

Ainda em *Paracoccidioides* grande parte dos estudos em concentram-se no maior antígeno descrito que é a glicoproteína secretada de 43 kDa (Gp43). A função desta proteína na patogênese da PCM está relacionada ao mecanismo de evasão durante a instalação da infecção primária (POPI; LOPES; MARIANO, 2002) estimula a formação de granulomas *in vitro* (VIGNA et al., 2006). Estudos utilizando cultura primária de macrófagos oriundos de medula óssea tratados com epítomos de Gp43 levaram a concluir que esta glicoproteína também apresenta capacidade de inibir a resposta inflamatória e a função macrofágica, podendo atuar como mecanismo de escape do fungo durante o curso da infecção por *Paracoccidioides* (KONNO et al., 2009).

Uma série de características da levedura *Malassezia* está relacionada com implicações patogênicas. A parede celular das células tem uma alta composição lipídica, o que pode estar relacionada à resistência e adesão às células do hospedeiro, assim como atuando na regulação negativa da resposta inflamatória. Para conseguir assimilar ácidos graxos de fontes externas, os fungos desse gênero secretam diversas lipases e fosfolipases. A produção de pigmentos é outro fator fortemente relacionado à patogenicidade em espécies fúngicas e, até o momento, tem-se descritas duas vias metabólicas levando à síntese de pigmentos em leveduras de *Malassezia*. Essas vias metabólicas secundárias resultam na produção de melanina e de um amplo espectro de compostos indólicos e as características bioquímicas de vários dos compostos isolados pode ser de impacto na patogênese da pitíriase versicolor (HORT; MAYSER, 2011).

Ainda a respeito da melanina, Langfelder et al., (2003) revisaram na literatura o papel de dois tipos de melanina [diidroxifenilalanina (DOPA)-melanina e diidroxinaftaleno (DHN)-melanina] na virulência de fungos patogênicos humanos. Melaninas têm diversas funções que influenciam a aptidão fúngica. Em diversos fungos, a falta de melanina leva à uma diminuição ou ausência de patogenicidade. A via de biossíntese de DHN-melanina é altamente similar entre diversas espécies fúngicas. Ressalte-se ainda que além da síntese de pigmentos, os fungos têm que possuir outros fatores de virulência para se adaptarem ao ambiente da infecção, tais como, capacidade de crescer à 37° C e de produzir melanina por certo estágio ou tecido-específico.

O maior fator de virulência do fungo *Cryptococcus neoformans*, a glucuronoxilmanana (GXM), foi encontrada em vesículas que atravessam a parede celular para atingir o espaço extracelular. A caracterização morfológica e do conteúdo proteico de vesículas secretórias de *C. neoformans* foi realizada por meio de microscopia eletrônica e proteômica, e demonstrou

que estas vesículas apresentam vários tamanhos e morfologias. A análise proteômica revelou 76 proteínas, sendo diversas relacionadas à virulência e proteção contra o estresse oxidativo, tais como, síntese da cápsula, urease, laccase, proteínas de choque térmico, superóxido dismutase, tioredoxina, tioredoxina redutase, catalase A, entre outras (RODRIGUES et al., 2008).

Oliveira et al., (2010) demonstraram que vesículas extracelulares de *C. neoformans* podem estimular a função dos macrófagos, aparentemente ativando estas células fagocíticas para melhorar a sua atividade antimicrobiana. Verificou-se que as frações de vesículas induziram a produção de óxido nítrico e citocinas por macrófagos. A incubação das vesículas criptocócicas com macrófagos murinos resultou em um aumento dos níveis extracelulares de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-10 (IL-10), e fator de crescimento transformante (TGF- β). E ainda foi visto que a atividade fagocítica e microbicida de macrófagos é estimulada por vesículas secretadas.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta presente revisão teve o propósito de contextualizar o leitor sobre a importância de se estudar os secretomas de espécies fúngicas, explicando o seu papel no estabelecimento e sucesso da infecção, explicitando as principais rotas de secreção proteicas abordando trabalhos relevantes na área.

Os avanços na compreensão das propriedades bioquímicas e funcionais de vesículas extracelulares fúngicas, nos últimos anos, são incontestáveis (RODRIGUES et al., 2013). Importantes pesquisas têm sido desenvolvidas para identificar genes/proteínas provavelmente envolvidos na interação patógeno-hospedeiro. Muitos dos trabalhos abordados nesta revisão tiveram esse propósito. Diante disso, entende-se que a análise de secretomas, principalmente de micro-organismos patogênicos, torna-se uma ferramenta útil no entendimento destas interações (KNIEMEYER; BRAKHAGE, 2008; GIRARD et al., 2013; WEBER et al., 2012; CUERVO et al., 2009). Foi possível ainda notar que os fungos patogênicos humanos estudados utilizam vários fatores de virulência para tentar vencer a batalha pela sobrevivência em condições hostis do hospedeiro. Entre eles, a produção de proteases para destruição de potenciais substratos, a produção de melanina e os mecanismos de adesão aos tecidos e evasão do sistema imune.

A via clássica de secreção em fungos envolve o reconhecimento da sequência do peptídeo sinal e a exportação via Retículo Endoplasmático/Golgi. No entanto, um grande número de proteínas sem o peptídeo sinal tem sido encontrado em secretomas, tornando-se evidente a relevância das vias de secreção alternativa na virulência e na dinâmica da parede celular de fungos. Os trabalhos mostraram que esse mecanismo de secreção alternativa em fungos é muito comum e carece de uma melhor caracterização em fungos.

Os secretomas refletem a variabilidade extraordinária entre os organismos, mesmo dentro de uma mesma espécie e, portanto, há a necessidade absoluta de caracterizar plenamente todos os seus componentes com o objetivo de compreender os mecanismos fundamentais responsáveis pela plasticidade do secretoma e suas aplicações em direção a um melhor controle das doenças causadas por estes agentes patogênicos (GIRARD et al., 2013). Diante disso, estudos nessa área vêm ganhando cada vez mais destaque.

Sendo assim, o secretoma torna-se uma ferramenta útil para ajudar a compreender os mecanismos de patogênese entre espécies fúngicas, acrescentando informações sobre as coleções de moléculas que estão sendo expressas nos diferentes isolados e se as diferenças

podem ser relacionadas à capacidade destes isolados se consolidarem no hospedeiro e causarem doença. Estudos nessa área vêm ganhando cada vez mais destaque.

4. REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, Priscila Costa; NAKAYASU, Ernesto S; RODRIGUES, Marcio L et al. Vesicular transport in *Histoplasma capsulatum*: an effective mechanism for trans-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes. **Cell Microbiol.**, v. 10, n. 8, p. 1695–1710, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18419773>>. Acesso em: 15 abr 2012.

ANDREOTTI, Patrícia Ferrari. **Interação de *Paracoccidioides brasiliensis* com células epiteliais. Caracterização de prováveis fatores de virulência.** Tese - Pós-Graduação em Análises Clínicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Araraquara, 2006. Disponível em:<http://www.dominiopublico.gov.br/pesquisa /DetalheObraForm.do ?select_action=&co_obra=23171>. Acesso em: 10 fev 2013.

BARBOSA, Santiago Mônica; BÁO, Sônia Nair; ANDREOTTI, Patrícia Ferrari et al. Glycerdehyde-3-Phosphate Dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* Is a Cell Surface Protein Involved in Fungal Adhesion to Extracellular Matrix Proteins and Interaction with Cells. **Infection and Imunity**, v. 74, n. 1, p. 382–389, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1346668/>>. Acesso em: 05 mai 2013.

BLOBEL, Gunter; DOBBERSTEIN, Bernhard. Transfer of proteins across membranes. I. Presence of Proteolytically Processed and Unprocessed Nascent Immunoglobulin Light Chains On Membrane-Bound Ribosomes of Murine Myeloma. **The Journal of cell biology**, v. 67, p. 835–851, 1975. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2111658/>>. Acesso em: 07 jan 2014.

BORGES, Clayton Luiz; PARENTE, Juliana Alves; BARBOSA, Mônica Santiago et al. Detection of a homotetrameric structure and protein-protein interactions of *Paracoccidioides brasiliensis* formamidase lead to new functional insights. **FEMS yeast research**, v. 10, p. 104–113, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20002196>>. Acesso em: 13 ago 2013.

BROWN, Neil A; ANTONIW, John; HAMMOND-KOSACK, Kim E. The predicted secretome of the plant pathogenic fungus *Fusarium graminearum*: a refined comparative analysis. **PloS one**, v. 7, n. 4, p. e33731, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3320895&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 7 mar 2013.

CACCIA, Dario; DUGO, Matteo; CALLARI, Maurizio et al. Bioinformatics tools for secretome analysis. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1834, n. 11, p. 2442–2453, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23395702>>. Acesso em: 14 abr 2013.

CALDERONE, R A; FONZI, W A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends in microbiology**, v. 9, n. 7, p. 327–35, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11435107>>. Acesso em 23 jun 2013.

CARBERRY, Stephen; NEVILLE, Claire M; KAVANAGH, Kevin A et al. Analysis of major intracellular proteins of *Aspergillus fumigatus* by MALDI mass spectrometry: identification and characterisation of an elongation factor 1B protein with glutathione transferase activity. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 341, n. 4, p. 1096–104, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16455047>>. Acesso em: 17 jun 2013.

CUERVO, Patricia; DE JESUS, Jose B; SABOIA-VAHIA, Leonardo et al. Proteomic characterization of the released/secreted proteins of *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes. **Journal of proteomics**, v. 73, n. 1, p. 79–92, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19703603>>. Acesso em: 29 abr 2013.

DING, Yu; WANG, Juan; WANG, Junqi et al. Unconventional protein secretion. **Trends in plant science**, v. 17, n. 10, p. 606–15, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22784825>>. Acesso em: 12 mar 2013.

DONOFRIO, N M; OH, Y; LUNDY, R et al. Global gene expression during nitrogen starvation in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. **Fungal genetics and biology**, v. 43, n. 9, p. 605–17, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16731015>>. Acesso em: 6 mar 2013.

FEKKAR, a; BALLOY, V; PIONNEAU, C et al. Secretome of human bronchial epithelial cells in response to the fungal pathogen *Aspergillus fumigatus* analyzed by differential in-gel electrophoresis. **The Journal of infectious diseases**, v. 205, n. 7, p. 1163–72, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22357658>>. Acesso em: 15 mai 2013.

FERNÁNDEZ-ACERO, Francisco Javier; JORGE, Inmaculada; CALVO, Enrique et al. Proteomic analysis of phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea* as a potential tool for identifying pathogenicity factors, therapeutic targets and for basic research. **Archives of microbiology**, v. 187, n. 3, p. 207–15, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17124592>>. Acesso em: 17 jun 2013.

GIRARD, Vincent; DIERYCKX, Cindy; JOB, Claudette et al. Secretomes: The fungal strike force. **Proteomics**, v. 13, n. 3-4, p. 597–608, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23349114>>. Acesso em: 1 mar 2013.

GONZÁLES, Angel; GO, Beatriz L; DIEZ, Soraya et al. Purification and Partial Characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* Protein with Capacity To Bind to Extracellular Matrix Proteins. **Infection and immunity**, v. 73, n. 4, p. 2486–2495, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1087412/>>. Acesso em: 20 jul 2014.

GREENBAUM, D; LUSCOMBE, N M; JANSEN, R et al. Interrelating different types of genomic data, from proteome to secretome: 'oming in on function. **Genome research**, v. 11, n. 9, p. 1463–8, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11544189>>. Acesso em: 3 mar 2014.

HORT, Wiebke; MAYSER, Peter. *Malassezia* virulence determinants. **Current opinion in infectious diseases**, v. 24, n. 2, p. 100–5, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21192258>>. Acesso em: 15 mai 2013.

KAPP, Katja; SCHREMPF, Sabrina; LEMBERG, Marius K et al. Post-targeting Functions of Signal Peptidases. *In: ZIMMERMANN, R. (Org.). Protein transport into the Endoplasmic Reticulum*. Landes Bio. [s.l.: s.n.], 2009, p. 1–16, 2009.

KIM, Yonghyun; NANDAKUMAR, M P; MARTEN, Mark R. The state of proteome profiling in the fungal genus *Aspergillus*. **Briefings in functional genomics & proteomics**, v. 7, n. 2, p. 87–94, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18187513>>. Acesso em: 1 abr 2013.

KNIEMEYER, OLAF; BRAKHAGE, AXEL A. Proteomics and its Application to the Human-Pathogenic Fungi *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans*. *In: BRAKHAGE, A.A.; ZIPFEL, P.F. (Orgs.). Human and Animal Relationships, 2nd Edition*. Springer. [s.l.: s.n.], 2008, p. 155–177, 2008.

KONNO, Adriana Y C; MARICATO, Juliana T; KONNO, Fabiana T C et al. Peptides from *Paracoccidioides brasiliensis* GP43 inhibit macrophage functions and inflammatory response. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 11, n. 1, p. 92–9, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19026760>>. Acesso em: 13 ago 2013.

LANGFELDER, Kim; STREIBEL, Martin; JAHN, Bernhard et al. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 38, n. 2, p. 143–158, 2003. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1087184502005261>>. Acesso em: 16 abr 2013.

LIMA, O C; FIGUEIREDO, C C; PEREIRA, B A et al. Adhesion of the human pathogen *Sporothrix schenckii* to several extracellular matrix proteins. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 32, n. 5, p. 651–7, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10412578>>. Acesso em: 26 jul 2014.

LODISH H, BERK A, ZIPURSKY SL, et al. Overview of the Secretory Pathway. *In: FREEMAN, W. H. (Org.). Molecular Cell Biology*. 4th. ed. New York: [s.n.], 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21471/>>. Acesso em: 20 set 2013.

MARCOS, Caroline Maria. **Caracterização da enolase de *Paracoccidioides brasiliensis* e identificação proteômica de novas moléculas**. Tese -Pós- Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Araraquara – UNESP, 2011. Disponível em: <<http://www2.fcfar.unesp.br/Home/Pos-graduacao/BiocienciaseBiotecnologiasAplicadasaFarmacia/CarolineMariaMarcosMECF.pdf>>. Acesso em: 16 jun 2013.

MENDES-GIANNINI, Maria José Soares; ANDREOTTI, Patrícia Ferrari; VINCENZI, Luciana Raquel et al. Binding of extracellular matrix proteins to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 8, n. 6, p. 1550–9, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16698299>>. Acesso em: 13 ago 2012.

NICKEL, Walter; RABOUILLE, Catherine. Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 10, n. 2, p. 148–55, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19122676>>. Acesso em: 28 jun 2014.

NOGUEIRA, Sarah Veloso; FONSECA, Fernanda L; RODRIGUES, Marcio L et al. *Paracoccidioides brasiliensis* enolase is a surface protein that binds plasminogen and mediates interaction of yeast forms with host cells. **Infection and immunity**, v. 78, n. 9, p. 4040–50, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2937444&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 15 mai 2013.

NOMBELA, César; GIL, Concha; CHAFFIN, W LaJean. Non-conventional protein secretion in yeast. **Trends in microbiology**, v. 14, n. 1, p. 15–21, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16356720>>. Acesso em: 13 abr 2013.

OLIVEIRA, Débora L; FREIRE-DE-LIMA, Célio G; NOSANCHUK, Joshua D et al. Extracellular vesicles from *Cryptococcus neoformans* modulate macrophage functions. **Infection and immunity**, v. 78, n. 4, p. 1601–9, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2849392&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 1 jul 2013.

PAETZEL, Mark; KARLA, Andrew; STRYNADKA, Natalie C J et al. Signal peptidases. **Chemical reviews**, v. 102, n. 12, p. 4549–80, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12475201>>. Acesso em: 12 jul 2014.

PATTI, J M; ALLEN, B L; MCGAVIN, M J et al. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. **Annual review of microbiology**, v. 48, p. 585–617, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7826020>>. Acesso em 20 jun 2014.

PEREIRA, Luiz Augusto; BÁO, Sônia Nair; BARBOSA, Mônica Santiago et al. Analysis of the *Paracoccidioides brasiliensis* triosephosphate isomerase suggests the potential for adhesin function. **FEMS yeast research**, v. 7, n. 8, p. 1381–8, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17714474>>. Acesso em: 13 ago 2012.

POPI, Ana Flavia; LOPES, José Daniel; MARIANO, Mario. GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. **Cellular immunology**, v. 218, n. 1-2, p. 87–94, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12470616>>. Acesso em: 09 ago 2014.

RANGANATHAN, Shoba; GARG, Gagan. Secretome: clues into pathogen infection and clinical applications. **Genome medicine**, v. 1, n. 11, p. 113, 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2808748&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 10 jun 2014.

RODRIGUES, Marcio L; NAKAYASU, Ernesto S; ALMEIDA, Igor C et al. The impact of proteomics on the understanding of functions and biogenesis of fungal extracellular vesicles. **Journal of proteomics**, p. 1–10, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23583696>>. Acesso em: 10 jun 2013.

RODRIGUES, Marcio L; NAKAYASU, Ernesto S; OLIVEIRA, Debora L et al. Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. **Eukaryotic cell**, v. 7, n. 1, p. 58–67, 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2224146&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 1 jul 2014.

SANTOS, André Luis Souza dos; CARVALHO, Isabela Miller de; SILVA, Bianca Alcântara da et al. Secretion of serine peptidase by a clinical strain of *Candida albicans*: influence of growth conditions and cleavage of human serum proteins and extracellular matrix components. **FEMS immunology and medical microbiology**, v. 46, n. 2, p. 209–20, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16487302>>. Acesso em: 15 mai 2013.

SILVA, Bianca Alcântara da; SODRÉ, Cátia Lacerda; SOUZA-GONÇALVES, Ana Luiza et al. Proteomic analysis of the secretions of *Pseudallescheria boydii*, a human fungal pathogen with unknown genome. **Journal of proteome research**, v. 11, n. 1, p. 172–88, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22142336>>. Acesso em: 16 jul 2014.

SORGO, Alice G; HEILMANN, Clemens J; DEKKER, Henk L et al. Mass spectrometric analysis of the secretome of *Candida albicans*. **Yeast**, v. 27, p. 661–672, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20641015>>. Acesso em: 25 jul 2013.

TJALSMA, Harold; BOLHUIS, Albert; JONGBLOED, Jan D H et al. Signal Peptide-Dependent Protein Transport in *Bacillus subtilis*: a Genome-Based Survey of the Secretome Secretome. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 64, n. 3, p. 515–547, 2000. Disponível em: <<http://mmbbr.asm.org/content/64/3/515.abstract>>. Acesso em: 29 jul 2014.

VALLEJO, Milene C; NAKAYASU, Ernesto S; MATSUO, Alisson L et al. Vesicle and vesicle-free extracellular proteome of *Paracoccidioides brasiliensis*: comparative analysis with other pathogenic fungi. **Journal of proteome research**, v. 11, n. 3, p. 1676–85, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22288420>>. Acesso em: 13 ago 2013.

VICENTINI, A P; GESZTESI, J L; FRANCO, M F et al. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. **Infection and immunity**, v. 62, n. 4, p. 1465–9, 1994. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=186304&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 28 jun 2014.

VIGNA, Ana Flávia; ALMEIDA, Sandro Rogério; XANDER, Patricia et al. Granuloma formation in vitro requires B-1 cells and is modulated by *Paracoccidioides brasiliensis* gp43 antigen. **Microbes and infection**, v. 8, n. 3, p. 589–97, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16500129>>. Acesso em: 15 out 2013.

VON HEIJNE, G. Signal sequences. The limits of variation. **Journal of molecular biology**, v. 184, n. 1, p. 99–105, 1985. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4032478>>. Acesso em: 28 jun 2014.

WEBER, Simone Schneider; PARENTE, Ana Flávia Alves; BORGES, Clayton Luiz et al. Analysis of the secretomes of *Paracoccidioides* mycelia and yeast cells. **PloS one**, v. 7, n. 12, p. e52470, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3525554&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 24 abr 2013.

YAJIMA, William; KAV, Nat N V. The proteome of the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **Proteomics**, v. 6, n. 22, p. 5995–6007, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17051649>>. Acesso em: 17 jun 2014.