

CÂMPUS ANÁPOLIS DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
HENRIQUE SANTILLO DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
MESTRADO EM CIÊNCIAS APLICADAS A PRODUTOS PARA SAÚDE

**ANÁLISE DAS PROTEÍNAS GLICOSILADAS SECRETADAS PELO
ISOLADO *Trichoderma harzianum* (ALL-42) INDUZIDAS POR PAREDE
CELULAR DE FITOPATÓGENOS**

STEPHANIE NAOUM

ANÁPOLIS - GO
2016

STEPHANIE NAOUM

**ANÁLISE DAS PROTEÍNAS GLICOSILADAS SECRETADAS PELO
ISOLADO *Trichoderma harzianum* (ALL-42) INDUZIDA POR PAREDE
CELULAR DE FITOPATÓGENOS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para a Saúde da Universidade Estadual de Goiás como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof.^a Dra. Valdirene Neves Monteiro

ANÁPOLIS - GO
2016

STEPHANIE NAOUM

**ANÁLISE DAS PROTEÍNAS GLICOSILADAS SECRETADAS PELO
ISOLADO *Trichoderma harzianum* (ALL-42) INDUZIDA POR PAREDE
CELULAR DE FITOPATÓGENOS**

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Valdirene Neves Monteiro
Universidade Estadual de Goiás

Profª. Dra. Raphaela de Castro Georg
Universidade Federal de Goiás

Prof. Dr. Fausto Bruno dos Reis Almeida
Universidade de São Paulo

Aprovada em: ___/___/_____

DEDICATÓRIA

“Bendize, ó minha alma, ao Senhor, e tudo que há em mim bendiga ao seu santo nome. Bendize, ó minha alma, ao Senhor, e não te esqueças de nem um só de seus benefícios. Ele é quem perdoa todas as tuas iniquidades; quem sara todas as tuas enfermidades; quem da cova redime a tua vida e te coroa de graça e de misericórdia; quem farta de bens a tua velhice, de sorte que a tua mocidade se renova como a da águia.”

Salmos 103.1-5

À **Deus**, único digno de honra e glória, por me abençoar sempre além dos meus merecimentos, por me proteger e guiar durante a busca pelos meus sonhos e pela salvação maravilhosa em Cristo Jesus.

“Filho meu, ouve o ensino do teu pai e não deixes a instrução de tua mãe. Porque serão diadema de graça para a tua cabeça e colares, para o teu pescoço.”

Provérbios 1.8

Aos meus **pais** pelo amor, carinho e paciência. Vocês são anjos de Deus na minha vida e colo pronto sempre que preciso. Amor incondicional, vocês são minha vida!

“Ora, o seu mandamento é este: que creiamos em o nome de seu filho, Jesus Cristo, e nos amemos uns aos outros, segundo o mandamento que nos ordenou.”

I João 3.23

Às minhas **irmãs** pela amizade e cumplicidade, e por entenderem os momentos de ausência. Espero que minha luta às inspire a nunca desistirem dos seus sonhos e acreditar na capacidade de vocês. Estarei sempre pronta para o que precisarem, com muito amor.

“O amor é paciente, é benigno...”

I Coríntios 13.4

Ao meu **marido**, que desde o início me motivou e não poupou esforços para que eu realizasse meu sonho. Por acreditar em mim quando nem eu mesma acreditava. Você é minha força.
Amo-te!

“Em todo tempo ama o amigo, e na angústia se faz o irmão.”

Provérbios 17.17

Às minhas amadas amigas **Luanna Fernandes, Viviane Gomes, Aline Voltan, Dayane Moreira, Karla Pinheiro de Sá, Denise, Marcela Suriani, Joice, Emanuelle, Lara Christine, Ludmila Assis**, pelas orações, companhia, conversas, desabafos, alegrias compartilhadas. E aos meus amigos **Paulo Roberto, Paulo Isaac e Bruce** pelo conhecimento e experiências compartilhadas.

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Deus, que me sustentou e guardou por toda esta caminhada, cumprindo os Teus propósitos na minha vida e tornando este sonho possível.

À minha família pelo apoio nas adversidades e compreensão nas ausências. Vocês fazem parte desta conquista!

Ao meu marido amado pelo incentivo desde o início e por me fazer acreditar em minha capacidade.

À minha orientadora Professora Dra. Valdirene Neves Monteiro pela dedicação e paciência, pelo conhecimento compartilhado e por ser uma das peças chave para que esta etapa fosse iniciada e concluída. Costumo dizer que não fomos nós que nos escolhemos, mas Deus te escolheu como minha orientadora, e tudo o que o Senhor faz é perfeito! Que o Senhor Deus abençoe ricamente a sua vida e te faça alcançar os desejos mais profundos do seu coração. Você foi benção em minha vida!

Aos professores Dr. Cirano José Ulhoa e Dr. Roberto Nascimento por disponibilizarem seus laboratórios e parte do seu conhecimento, tornando este trabalho ainda mais interessante. E ao pesquisador Dr. Fausto Bruno dos Reis Almeida pela paciência em compartilhar conhecimento e esforço!

Aos meus colegas de laboratório, sala de aula e de mestrado: Joice, Emanuelle, Bruce, Paulo Isaac, Denise, Marcela, Paulo Roberto, Juliana, Amanda, Mariana, Letícia, Gabrielle, Aline, Luanna, Dayane, Danilo, Benedito Neto! Obrigada pelo auxílio no laboratório, na pesquisa, pelo companheirismo, compartilhamento do conhecimento, risadas, suporte, desabafos. Vocês fizeram esta caminhada muito mais prazerosa!

“Porque eu estou bem certo de que nem a morte, nem a vida, nem os anjos, nem os principados, nem as coisas do presente, nem do porvir, nem os poderes, nem a altura, nem a profundidade, nem qualquer outra criatura poderá separar-nos do amor de Deus, que está em Cristo Jesus, nosso Senhor.”

Romanos 8.38-39

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
OBJETIVOS	16
Objetivo geral	16
Objetivos específicos	16
REVISÃO DE LITERATURA	17
1. Glicosilação de proteínas	17
2. Glicoproteínas em fungos	18
3. Estratégias de identificação de glicoproteínas	23
4. Fungos filamentosos	26
4.1 <i>Trichoderma harzianum</i>	27
5. Fitopatógenos	30
5.1 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	30
5.2 <i>Fusarium oxysporum</i>	31
6. Composição da parede celular de fungos	31
7. Secretoma	32
MATERIAL E MÉTODOS	33
1. Manutenção dos isolados	33
2. Produção das paredes dos fitopatógeno	33
3. Tratamento da parede celular dos fitopatógeno	33
4. Condições de crescimento	33
5. Dosagem de proteínas totais pelo método de Bradford	34
6. Dosagem de proteínas totais pelo método de Smith ou BCA	34
7. Cromatografia por afinidade Concanavalin A (Con A) Agarose	34
8. Eletroforese Desnaturante (SDS-PAGE)	34
9. Coloração por Comassie Brilliant Blue	35
10. Detecção de glicoproteínas por Pro-Q Emerald 488	35
11. Preparo de amostras para a espectrometria de massas	36
12. Espectrometria de massas	36
13. Análise por RT-PCR	37
14. Atividade enzimática	37
14.1 β -1,3-glucanase	37

<i>14.2 N-acetil-glicosaminidase</i>	37
<i>14.3 β-1,3-endoglucanase</i>	38
<i>14.4 Protease</i>	38
<i>14.5 β-glicosidase</i>	38
<i>14.6 α-manosidase</i>	39
<i>14.7 α-arabinofuranosidase</i>	39
15. Predição dos sítios de glicosilação das proteínas identificadas	39
RESULTADOS E DISCUSSÕES	40
CONSIDERAÇÕES FINAIS	57
REFERÊNCIAS	58

LISTA DE ABREVIATURAS

ConA	Concanavalin A
AAL	<i>Aleuria aurantia</i>
ACN	Acetonitrila
BCA	Ácido Bicinchoninico
BSA	Albumina Sérica Bovina
DTT	Ditioteritol
ECL	<i>Erythrina cristagalli</i> agglutinin
GH	Glicosídeo hidrolases
IAA	Iodoacetamida
PNA	<i>Peanut Agglutinin</i>
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
SDS	Dodecil-sulfato de sódio
TFA	Ácido Trifluoracético
WGA	<i>Wheat Germ Agglutinin</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Proteínas encontradas através da espectrometria de massas e análise no banco de dados JGI MycoCosm.....	43
Tabela 2. Famílias identificadas e exemplos de enzimas de cada família (CAZy)	45
Tabela 3. Atividade enzimática nos glicosecretomas.....	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas da cromatografia por afinidade em coluna contendo lectina imobilizada ...	24
Figura 2. Técnica de blotting utilizando-se lectinas para a detecção de glicoproteínas	25
Figura 3. SDS-PAGE dos secretomas e glicosecretomas para <i>S. sclerotiorum</i> e <i>F. oxysporum</i>	40
Figura 4. SDS-PAGE após coloração por Pro-Q Emerald 488	41
Figura 5. Análise da expressão gênica relativa à glicose nas diferentes condições de crescimento	48
Figura 6. Análise da expressão gênica relativa ao glicerol nas diferentes condições de crescimento	49
Figura 7. Predição dos sítios de O-glicosilação e N-glicosilação em Galactose Oxidase	50
Figura 8. Predição dos sítios de O-glicosilação e N-glicosilação em Beta-manosidase	51
Figura 9. Predição dos sítios de O-glicosilação e N-glicosilação em Beta-1,3-exoglucanase	51
Figura 10. Predição dos sítios de O-glicosilação e N-glicosilação Beta-1,3-endoglucanase	51
Figura 11. Predição dos sítios de O-glicosilação e N-glicosilação em enzimas da família GH 17	51
Figura 12. Predição dos sítios de O-glicosilação e N-glicosilação em alfa-manosidase	52
Figura 13. Predição dos sítios de O-glicosilação e N-glicosilação em Serinopeptidases	52
Figura 14. Predição dos sítios de O-glicosilação e N-glicosilação em Six-hairpin	52
Figura 15. Predição dos sítios de O-glicosilação e N-glicosilação em enzimas da família GH 27	52
Figura 16. Predição dos sítios de O-glicosilação e N-glicosilação em enzimas da família GH 30	53
Figura 17. Predição dos sítios de O-glicosilação e N-glicosilação em Caboxipeptidase	53
Figura 18. Predição dos sítios de O-glicosilação e N-glicosilação em Tirosinase	53

RESUMO

As glicoproteínas são moléculas formadas pela união de proteínas à glicanos por um processo pós-traducional denominado glicosilação. Este processo é realizado nos mais variados tipos celulares, entre eles a célula fúngica, e as glicoproteínas produzidas por estas células possuem papéis biológicos essenciais à vida. *Trichoderma harzianum* (ALL-42) é um fungo muito estudado devido ao seu papel de biocontrole e indução de crescimento vegetal. Estudos envolvendo substâncias produzidas por este microrganismo podem colaborar para o entendimento deste mecanismo. O objetivo principal deste trabalho foi identificar e analisar as proteínas glicosiladas secretadas pelo *T. harzianum* quando induzido por meio de cultura contendo paredes celulares de diferentes fitopatógenos. Os secretomas produzidos para as paredes de *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium oxysporum* foram então submetidos à cromatografia por afinidade Concanavalin A e posteriormente realizada a eletroforese SDS-PAGE e coloração por Pro-Q Emerald 488 para identificação de glicoproteínas. As bandas apresentadas no gel foram recortadas e submetidas à espectrometria de massa. Os resultados demonstraram a presença de algumas proteínas como galactose oxidases, glicosídeo hidrolases, β -1,3-exoglucanases e proteases, com funções enzimáticas importantes no mecanismo de degradação de parede celular de fitopatógeno e a presença destas proteínas coincide com resultados obtidos em outros estudos. As amostras demonstraram atividade enzimática para sete substratos testados, escolhidos de acordo com as enzimas identificadas por espectrometria de massas e análise da expressão gênica relativa. Os genes relacionados a estas proteínas identificadas no glicosecretoma foram encontrados em maior expressão quando *T. harzianum* (ALL-42) foi crescido com as paredes de fitopatógenos em relação a duas outras situações, crescido em glicose e em glicerol, como fontes de carbono.

Palavras-chave: glicoproteínas, secretoma, *Trichoderma harzianum*, enzimas, parede celular.

ABSTRACT

Glycoproteins are molecules formed by the union of proteins to glycans by a post-translational process called glycosylation. This process is carried out in a variety of cell types, including fungal cell and the produced glycoproteins have biological roles essential for life. *Trichoderma harzianum* (ALL-42) is a fungus widely studied due to its role of biocontrol and plant growth induction. Studies involving substances produced by this microorganism may contribute to the understanding of this mechanism. The aim of this study was to identify and analyze the glycosylated proteins secreted by *T. harzianum* when grown in culture medium containing cell walls of different pathogen. The secretomas produced for walls of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Fusarium oxysporum* were then subjected to Concanavalin A affinity chromatography and subsequently carried to SDS-PAGE electrophoresis and staining with Pro-Q Emerald 488 for identifying glycoproteins. The bands displayed in the gel were cut out and subjected to mass spectrometry. The results showed the presence of some proteins, galactose oxysdases, glycoside hydrolases, β -1,3-exoglucanases e proteases, with important functions in enzymatic cell wall degradation mechanism of pathogen and the presence of these proteins coincides with results from other studies. The samples showed enzymatic activity for seven substrates tested, chosen in accordance with the enzymes identified by mass spectrometry and analyzing the relative gene expression. Genes related to these proteins were identified in glicosecretoma found in higher expression as *T. harzianum* (ALL -42) was grown on the walls of plant pathogens compared to two other situations , grown in glucose and glycerol as carbon sources.

Keywords: glycoproteins, secretome, *Trichoderma harzianum*, enzymes, cell wall.

INTRODUÇÃO

A glicosilação é uma modificação pós-traducional importante na maioria das células, por gerar produtos que desempenham importantes papéis biológicos como, por exemplo, a sinalização celular. A glicosilação de proteínas, ligação de carboidratos a proteínas, formam estruturas específicas, as glicoproteínas, cujas atividades biológicas estão intimamente ligadas à suas estruturas. Qualquer modificação no tamanho e na estrutura dos carboidratos influencia diretamente na atividade da glicoproteína (MARIÑO et al., 2010).

A glicosilação é um processo comum nos mais diferentes reinos e espécies. Por serem microrganismos eucariotos os fungos apresentam um conjunto de enzimas que os tornam capazes de realizar modificações pós-traducionais, entre elas a glicosilação. Essas modificações estruturais estão totalmente relacionadas à função e ao papel desempenhado pelas glicoproteínas formadas e secretadas por estes microrganismos (POURCQ et al, 2010).

As glicoproteínas produzidas por fungos podem ter funções variadas e algumas são consideradas importantes como proteínas de parede com função na patogênese, podendo gerar imunogenicidade e permitir a comunicação com o ambiente externo e outros organismos. Muitas dessas glicoproteínas estão envolvidas nos processos de interação, por exemplo, com outros fungos (PINTO et al., 2008).

O fungo *Trichoderma harzianum* vem sendo estudado e utilizado como agente de biocontrole na agricultura, combatendo outros fungos, denominados fitopatógenos. Por possuir essa propriedade este fungo é considerado um micoparasita (GÖRGEN et al., 2009; MUTHUKUMAR et al., 2011; KHALILI et al., 2012; ASAD et al., 2014). Os fitopatógenos são responsáveis por perdas consideráveis na produção agrícola e, por isso, estudos envolvendo alternativas para o combate destes microrganismos despertam o interesse de diferentes grupos de pesquisa.

O micoparasitismo envolve uma série de mecanismos, entre eles, a produção de substâncias importantes no combate a outros fungos. Uma vez identificadas, essas moléculas, com atividades biológicas específicas, poderão servir como precursoras de produtos considerados biopesticidas ou biofertilizantes. O grande interesse nestes produtos é que são alternativas naturais e seu uso possui menor impacto, sobre vários aspectos, do que os pesticidas e fertilizantes comuns (SHARMA et al., 2013; VINALE et al., 2014).

Durante o micoparasitismo, o *T. harzianum* é capaz de utilizar das paredes celulares dos fitopatógenos como fonte de energia, carbono e nitrogênio. Para realizar tal processo

torna-se necessária a secreção de substâncias produzidas pelo micoparasita. O estudo dessas substâncias secretadas pode colaborar para o desenvolvimento biotecnológico e com a busca de alternativas que diminuam a perda agrícola.

Justifica-se a realização de estudos sobre a glicosilação de proteínas e glicanos como aprofundamento do conhecimento da relação estrutura-atividade, uma vez que o processo de glicosilação está relacionado à secreção de proteínas. Descobertas neste sentido têm colaborado com a busca por novas possíveis novidades biotecnológicas. Estas, futuramente, poderão contribuir para o desenvolvimento de novos produtos importantes economicamente e que influenciarão benéficamente a saúde humana.

Diante disso, objetivou-se avaliar as glicoproteínas secretadas pelo fungo *T. harzianum* (ALL-42), microrganismo utilizado efetivamente como biocontrole, produzidas na presença de parede celular de dois fitopatógenos muito comuns, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium oxysporum*, importantes agentes de fitopatologias e responsáveis por prejuízos em produções agrícolas.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Analisar a secreção de proteínas glicosiladas por *T. harzianum* (ALL-42) induzida pela presença de parede celular dos fitopatógenos *S. sclerotiorum* e *F. oxysporum*.

Objetivos específicos

- Obter o secretoma de *T. harzianum* (ALL-42) usando como fonte de carbono parede celular de *S. sclerotiorum* e de *F. oxysporum*;
- Purificação do secretoma através da utilização de cromatografia por afinidade do tipo Concanavalin A;
- Identificar as proteínas glicosiladas presentes nas amostras de secretoma de *T. harzianum* (ALL-42) por Espectrometria de Massas;
- Predizer os sítios de glicosilação, das glicoproteínas identificadas nos secretomas, através de software apropriado;
- Comparar o perfil de proteínas glicosiladas nas diferentes amostras;
- Relacionar as glicoproteínas identificadas com sua possível função, demonstrando sua importância e atividade em *T. harzianum* (ALL-42);
- Avaliar a expressão gênica relativa dos genes relacionados às proteínas identificadas, através de análise por RT-PCR em amostra reproduzida nas mesmas condições utilizadas para obtenção do secretoma de *T. harzianum* (ALL-42);
- Avaliar a atividade de enzimas identificadas.

REVISÃO DA LITERATURA

1. Glicosilação de proteínas

Após a formação das proteínas, pelo processo conhecido como tradução, algumas dessas moléculas passam por modificações em suas estruturas. Estas modificações garantem a estrutura necessária para que as proteínas produzidas desempenhem seu papel de forma eficiente, alterando características como estabilidade, volume e solubilidade. A glicosilação, ligação de carboidratos a lipídeos e proteínas, é uma modificação realizada pelo complexo de Golgi, formando glicoproteínas e glicolipídeos que desempenham importantes funções.

Dentre as modificações pós-traducionais, a glicosilação de proteínas é a mais comumente observada, sendo um processo importante tanto funcionalmente quanto estruturalmente, responsável pela formação das chamadas glicoproteínas. Este mecanismo de modificação pós-traducional abrange não somente os mamíferos, mas também as plantas e microrganismos. Estes possuem em suas células um conjunto de enzimas responsáveis pelas reações envolvidas no processo de formação das glicoproteínas, dentre elas as glicosidases e glicosiltransferases (EASTON, 2011).

Assim, a glicosilação de proteínas é um processo enzimático observado em diversos tipos celulares gerando um número expressivo de proteínas ligadas a carboidratos. As glicoproteínas formadas participam dos processos de adesão, reconhecimento e comunicação celular, transporte de moléculas, ativação de receptores celulares e endocitose, papéis biológicos importantes e indispensáveis às atividades vitais de um organismo (OHTSUBO; MARCH, 2006). Este tipo de glicosilação envolve uma variedade enorme de ligações carboidrato-peptídeo que ocorrem naturalmente desde os mais primitivos microrganismos até os organismos pluricelulares mais complexos. Isso demonstra que a glicosilação de proteínas, como processo pós-traducional, desempenha papel biológico essencial à vida (SPIRO, 2002).

A maioria das proteínas secretadas e presentes nas membranas celulares passam pelo processo de glicosilação. Os oligossacarídeos, estruturas contendo diversos açúcares (manose, galactose, fucose, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina), são ligados covalentemente às proteínas por dois tipos básicos de ligações: as N-glicosídicas e as O-glicosídicas. A estrutura dos oligossacarídeos pode variar de estruturas simples até estruturas muito complexas com vários tipos de resíduos de carboidrato (VOET; VOET, 2013).

A chamada N-glicosilação envolve glicanos de estruturas e quantidades variadas ligadas a uma sequência Asparagina-X-Serina/Treonina (onde X representa qualquer

aminoácido, com exceção da Prolina) e a O-glicosilação, envolve glicanos que se ligam a Serina ou Treonina, formando estruturas menos robustas. A ligação dos N-glicanos às proteínas são realizadas pelo monossacarídeo N-Acetilglucosamina e a ligação dos O-glicanos às proteínas são realizadas, na maioria das vezes, pelo monossacarídeo N-Acetilgalactosamina (EASTON, 2011).

Os produtos da glicosilação, as glicoproteínas, são objeto de estudo em várias áreas, envolvendo diferentes campos do conhecimento. Mostram-se uma importante fonte de novas terapias, nos projetos de desenvolvimento de novas drogas e no campo da descoberta de novas tecnologias. Muitas mudanças estruturais em glicoproteínas estão sendo vinculadas à ocorrência de doença, por isso essas proteínas modificadas são vistas como possíveis novas fontes terapêuticas ou alvos terapêuticos (MARINÕ et al., 2010).

O ramo da ciência que se destina ao estudo estrutural, químico, sintético e funcional dos glicanos (carboidratos) e seus derivados, inclusive as glicoproteínas, é a glicobiologia. Os glicanos são componentes celulares importantes e diversificados, com a habilidade de unir-se tanto a proteínas, como também a lipídeos (OHTSUBO; MARCH, 2006). Com o desenvolvimento desta ciência, da química e da biologia molecular, tornou-se possível o estudo das glicoproteínas como possíveis fontes de novas terapias, utilizando estas moléculas no estudo e no desenvolvimento de novos fármacos ou como sítios de ação para outras substâncias (DALZIEL et al., 2014).

A caracterização estrutural das glicoproteínas, devido a sua grande diversidade, é um processo complexo e dependente de várias técnicas. A Espectrometria de Massas e o uso de métodos cromatográficos têm demonstrado resultados satisfatórios no processo de identificação e caracterização dessas moléculas (EASTON, 2011). Assim, o desenvolvimento tecnológico possibilitou que as técnicas de espectrometria de massa se tornassem cada vez mais específicas e sensíveis possibilitando caracterização e identificação fidedignas (STAVENHAGEN et al., 2015).

2. Glicoproteínas em fungos

Os fungos são organismos vivos, eucariotos e heterotróficos. Sua parede celular é rica em quitina e possuem a capacidade de armazenar glicogênio, assim como as células animais. Estão inclusos em reino próprio denominado reino *Fungi*, e encontram-se dispersos nos mais diversos ecossistemas, contribuindo para diversos ciclos naturais, biológicos e ecológicos.

Podem ser leveduriformes, com somente um núcleo, ou filamentosos, possuindo maior número de núcleos (LOBATO et al., 2009).

A importância dos fungos no desenvolvimento e fabricação de produtos é conhecida desde os tempos mais remotos. A utilização da fermentação possibilitou que produtos hoje, amplamente consumidos, fossem introduzidos no mercado e melhorados com o passar dos anos. Muito do que é utilizado proveniente desses microrganismos surgiram graças à glicoproteínas produzidas por eles. Estas substâncias são utilizadas, dentre muitas atividades, no processamento industrial e no tratamento de resíduos químicos em efluentes, o que é de grande importância para o meio ambiente.

A utilização biotecnológica de fungos e seus produtos tem se tornado cada vez mais ampla. Um exemplo disto é o uso de fungos basidiomicetos para limpeza de efluentes resultantes do processamento têxtil. Esses fungos possuem complexos enzimáticos responsáveis pela degradação de produtos químicos, principalmente corantes, que podem ser prejudiciais à natureza e aos seres vivos se permanecerem nos efluentes. Grande parte destes complexos possuem glicoproteínas, dentre elas a lignina peroxidase, a manganês peroxidase, e a lacase. A biodegradação fúngica evita a utilização de produtos químicos para a limpeza dos efluentes o que diminui a concentração de compostos que podem alterar processos ambientais naturais (SOUZA; ROSADO, 2009).

A indústria farmacêutica também é responsável por forte impacto ao meio ambiente, uma vez que contamina efluentes com produtos resultantes da produção de medicamentos em larga escala. A utilização de fungos para limpeza desses efluentes parece ser um produto biotecnológico de grande valor que diminui os impactos da produção de medicamentos sobre os ecossistemas. Fungos como o *Pycnoporus sanguineus* e *Trametes versicolor* são produtores da glicoproteína Lacase e poderão ser utilizados para tratamento de efluentes industriais diminuindo o impacto desta atividade sob a natureza (WATANABE et al., 2006).

Fungos produtores de Lacase, Lignina peroxidase e Manganês peroxidase também podem ser utilizados para degradação de matéria orgânica. O *Trametes villosa* é um exemplo desses fungos que apresentam grande potencial para degradação e remoção de substâncias húmicas em ambientes aquáticos. Demonstram ser uma biotecnologia melhor que as bactérias nesse sentido, pois crescem normalmente em meio ao estresse destes ambientes, ao contrário destes seres procariontes (CAMPOS, 2011).

Existe uma glicoproteína, que é de grande importância industrial, chamada Tanase. Esta pode ser produzida por fungos e é utilizada em larga escala na produção industrial de produtos como cerveja, sucos de frutas e vinhos. Sua obtenção não biotecnológica é cara, por

isso os fungos seriam uma ótima alternativa para essa produção (YAO et al., 2014). Pode-se produzir as tanases por fermentação através, por exemplo, da utilização de fungos *Aspergillus sp.*, tendo como substrato resíduos agroindustriais de diversos produtos, como laranja, uva e café, com produção satisfatória da glicoproteína (NASCIMENTO et al., 2014).

As glicoproteínas produzidas por fungos são importantes meios para se conhecer a estrutura do fungo e sua patogenicidade quando este é de causar doença no homem e em outros animais. São importantes no conhecimento da imunidade e no desenvolvimento de substâncias farmacologicamente ativas que algum dia poderá originar novos medicamentos, bem como, o uso destas como proteínas recombinantes.

O uso de proteínas recombinantes como moléculas ativas farmacologicamente é cada vez mais comum. Grande parte dessas proteínas necessita ser glicosiladas para exercerem sua função, por esta depender de sua estrutura. Assim, as proteínas recombinantes glicosiladas são produzidas em células de mamíferos em laboratório. Os fungos têm sido estudados como sistemas de produção dessas glicoproteínas, sendo uma forma alternativa ao uso de células de mamíferos e tem demonstrado eficiência nessa síntese. Sua parede celular rígida confere aos fungos maior resistência ao estresse e maior facilidade de manipulação em laboratório (POURCQ et al., 2010).

Algumas glicoproteínas produzidas por fungos já demonstraram possuir potencial farmacológico. O *Aspergillus nidulans* da linhagem RT2 é capaz de produzir uma glicoproteína chamada Nandina que possui diferentes graus de glicosilação. Esta glicoproteína foi estudada *in vitro* e *in vivo* e demonstrou-se a sua atividade anti-inflamatória. Esta molécula inibe *in vitro* a produção da ciclooxygenase-2 e *in vivo* mostrou atividade em dois modelos de inflamação diferentes (QUEIROZ, 2007).

O fungo *Scleroderma nitidum* possui polissacarídeos que tiveram suas atividades farmacológicas avaliadas e demonstraram atividade anti-inflamatória e antioxidante. Ao analisar-se as estruturas desses polissacarídeos em infravermelho observou-se que eles provavelmente tenham estrutura glicosilada, formando um complexo polissacarídeo-proteína (NASCIMENTO, 2010).

A célula eucariótica dos fungos possui o conjunto de enzimas necessárias para a produção de glicoproteínas pelo método pós-traducional da glicosilação. Essas glicoproteínas podem exercer variadas funções relacionadas à estrutura da parede celular e da célula como um todo, auxiliando na integridade e crescimento, diferenciação e sinalização, nas interações com outros seres vivos e com o ambiente externo (PINTO et al., 2008). Pode-se inferir que a glicosilação de proteínas é essencial para a manutenção das atividades vitais do fungo e,

juntamente, colabora para a grande utilidade desses microrganismos para o ambiente e para as atividades humanas.

A presença de glicoproteínas na superfície celular de fungos é a responsável, juntamente com outras proteínas, pelo potencial patogênico do fungo, em relação ao ser humano. O desenvolvimento de micoses depende diretamente destas estruturas. Elas permitem aderência aos tecidos do hospedeiro, invasão de tecidos, evasão à resposta imune, dentre outras ações invasivas do microrganismo agressor. A expressão destas moléculas está diretamente ligada às ferramentas genômicas desses fungos (SANTOS et al., 2012).

O fungo *Candida albicans* possui uma parede celular rica em carboidratos isolados e carboidratos ligados a proteínas. Essas glicoproteínas têm importante papel antigênico ou alergênico quando é analisada a interação desse fungo leveduriforme com seus possíveis hospedeiros, principalmente o homem. A concentração dessas substâncias pode variar ainda entre diferentes cepas, dependendo da variabilidade genética e expressão gênica de cada uma, e também de suas variações bioquímicas (SIPPERT et al., 2010).

Outro fungo patogênico ao homem é o *Paracoccidioides brasiliensis*, responsável por desenvolver uma patologia denominada paracoccidioidomicose. Estudo envolvendo a produção de anticorpos monoclonais contra a glicoproteína GP70 deste fungo, demonstrou que esta molécula desempenha função importante na instalação da infecção, dando ao fungo a capacidade de escape do sistema imunológico. A GP70 mostrou inibir a atividade fagocítica de macrófagos e também a liberação de substâncias importantes na destruição do patógeno (GROSSO, 2013).

A paracoccidioidomicose é uma doença de grande importância em saúde pública no Brasil. As técnicas utilizadas para diagnóstico são baseadas na procura de antígenos uma vez que os anticorpos são de difícil detecção. A própria GP70 tem sido procurada nas técnicas que avaliam a presença de antígeno. Além dela, a glicoproteína GP43, de grande importância para a patogênese do fungo também é o principal antígeno para o diagnóstico sorológico da infecção (PEREIRA et al., 2012).

Certos fungos tem também a capacidade de interagir com plantas de forma benéfica ou maléfica. Associações simbióticas com raízes de plantas formam o que denominamos micorrizas. Esse grupo de fungos é chamado de fungos micorrízicos arbusculares e são de grande importância na microbiota do solo e também para a agricultura (MERGULHÃO, 2006).

Essa importância deve-se principalmente a glomalina, uma glicoproteína que auxilia na fertilização do solo, permeabilidade da água e retenção de carbono e outras partículas.

Pesquisas com a glomalina podem aprofundar conhecimento acerca da estrutura e qualidade dos solos, assim como, promover o desenvolvimento de novas tecnologias e produtos para agricultura (RILLIG, 2004).

Os benefícios da presença de fungos micorrízicos no solo estão intimamente ligados à presença das glomalinas. Além da retenção de carbono e da permeabilidade da água, essa glicoproteína permite a formação de aglomerados de metais, que funcionam como agentes quelantes do solo. O teor de glomalina presente no solo pode indicar quão degradado ou saudável este solo está (PEREIRA et al., 2010).

Os fungos não causam patologias somente em seres humanos, interagem também de forma maléfica com plantas. Existem alguns tipos de fungos chamados fitopatógenos que são responsáveis por desenvolver patologias em plantas e, por isso, podem comprometer a produção agrícola e a produção de produtos para consumo humano. Um exemplo destes fungos é o *Fusarium subglutinans*. Para desenvolver mecanismos que combatam esse fungo é imprescindível conhecer sua estrutura e composição química (SANTOS; RICARDO, 2010).

Além do *Fusarium subglutinans* existem diversas espécies de fungos fitopatógenos. Podemos destacar o *Botrytis cinérea* (LISBOA et al., 2007), *Sclerotinia sclerotiorum* (ETHUR et al., 2001), *Rhizoctonia solani* e *Fusarium solani* (PEREIRA et al., 2014).

Fungos leveduriformes tem mostrado capacidade de combate a fitopatógenos por meio da produção de toxinas que possuem efeito inibitório sobre o crescimento das hifas e a germinação de esporos (FAZIO, 2009). Muitas toxinas produzidas por estas leveduras têm estrutura glicoproteica e esta estrutura está relacionada intimamente com o mecanismo de ação destas substâncias frente a outros fungos (MARTINAC et al., 1990).

Para o combate a esses fitopatógenos uma alternativa que visa a substituição da utilização de pesticidas é o uso de mecanismos de biocontrole. Um desses mecanismos muito estudado é a utilização de outros fungos que sejam antagonistas aos fitopatógenos e estes, podem até mesmo, favorecer o desenvolvimento dos vegetais. *Trichoderma harzianum* é um fungo filamentosos que tem demonstrado papel importante no controle de fitopatógenos (STEINDORFF et al., 2014).

Os fungos utilizados como agentes de biocontrole de fitopatógenos, apresentam importância econômica na manutenção de grandes lavouras e evitam as perdas de produção por patologias que acometem as plantas. Além disso, são importantes componentes do solo, influenciando na fertilidade e composição, facilitando a permeabilidade da água, sendo importantes indicadores de degradação.

3. Estratégias de identificação de glicoproteínas

Devido à importância das glicoproteínas dentro dos processos biológicos, os métodos de purificação, detecção e identificação dessas estruturas estão sendo bastante utilizados na biomedicina, biofarmácia e na biotecnologia. Porém, apesar destes avanços, a separação, identificação e quantificação das glicoproteínas contidas em misturas complexas continuam sendo de difícil execução e necessitam de várias etapas de processamento e ainda da utilização conjunta de algumas metodologias (ONGAY et al., 2012).

No passado, as pesquisas com glicanos e glicoproteínas envolviam métodos como a ressonância nuclear magnética e a cristalografia de raio-X. Estes métodos caíram em desuso por elucidarem apenas estruturas mais simples e por possuírem limitações, como por exemplo, a necessidade de grande quantidade de amostra ou analito requerida para a análise e ainda o grau de pureza desta amostra, que deve ser considerável (JOO AN et al., 2009).

Atualmente, a espectrometria de massas é uma alternativa muito utilizada e já proporcionou grandes avanços na identificação não somente de glicoproteínas, mas de proteínas em geral (ONGAY et al., 2012). Uma das dificuldades encontradas em relação à glicoproteínas é que, quando estão contidas em misturas complexas, a presença de proteínas e peptídeos não glicosilados emitem um sinal mais intenso na espectrometria de massas e são mais facilmente detectados, inibindo ou mascarando os sinais emitidos pelas glicoproteínas e glicopeptídeos, que estão em menor número (WOHLGEMUTH et al., 2009).

Existem alguns métodos utilizados para selecionar ou separar glicoproteínas de uma amostra complexa. Um destes métodos consiste na utilização de lectinas que possuem a propriedade de afinidade com glicanos e, por isso, selecionam e separam glicoproteínas dentro de uma amostra rica em diversas proteínas. As lectinas disponíveis e comercializadas são as mais variadas e cada exemplar é responsável por selecionar tipos de glicanos diferentes (HONGSACHART et al., 2008).

Exemplos de lectinas importantes são a Concanavalin A (ConA), específica para o monossacarídeo manose, a *Peanut Agglutinin* (PNA) e a *Erythrina cristagalli* agglutinin (ECL), específicas para a galactose e para a N-acetilgalactosamina, a *Wheat Germ Agglutinin* (WGA), específica para o ácido siálico e N-acetilglucosamina, e a *Aleuria aurantia* (AAL), específica para a fucose (HONGSACHART et al., 2008).

A Concanavalin A (ConA) é uma lectina produzida e extraída de *Canavalia ensiformis*, mais comumente conhecida como Jack Bean ou feijão-de-porco. Esta lectina

seleciona proteínas N-glicadas por possuírem uma alta afinidade por oligossacarídeos que contem três manoses, formando a estrutura $\text{Man}\alpha 1-6(\text{Man}\alpha 1-3)\text{Man}$ (OHYAMA et al., 1985).

A lectina Jacalina é uma proteína produzida e retirada da planta *Artocarpus heterophyllus*, conhecida pelo nome de Jaca, uma planta comum em países de clima tropical (SOARES et al., 1982; BUNN-MORENO; CAMPOS-NETO, 1981; KABIR, 1998). É uma lectina de aplicabilidade ampla e variada (AKKOUH et al., 2015). A Jacalina é utilizada para o enriquecimento e seleção de glicoproteínas O-glicadas, mais especificamente aquelas que contêm a estrutura O-GalNAc α (HORTIN; TRIMPE, 1990; DARULA; MEDZIHRADSKY, 2009).

As variadas lectinas podem ser utilizadas de forma isolada em coluna, em misturas de lectinas em uma mesma coluna ou ainda mais de uma coluna empacotada com uma lectina diferente, isoladamente. Estes últimos processos aperfeiçoam os resultados produzindo uma amostra mais rica em diferentes tipos de glicoproteínas, aumentando as chances de seleção de um maior número de glicoproteínas (CALVANO et al., 2008; CHEN et al., 2014).

O princípio da utilização de lectinas se baseia na ligação das glicoproteínas a esta, através da porção glicosilada (Figura 1), ficando retidas na resina. As outras proteínas, por não possuírem a ligação aos glicanos, não ficam aderidas à resina e fluem naturalmente sendo recolhidas separadamente (ONGAY et al., 2012).

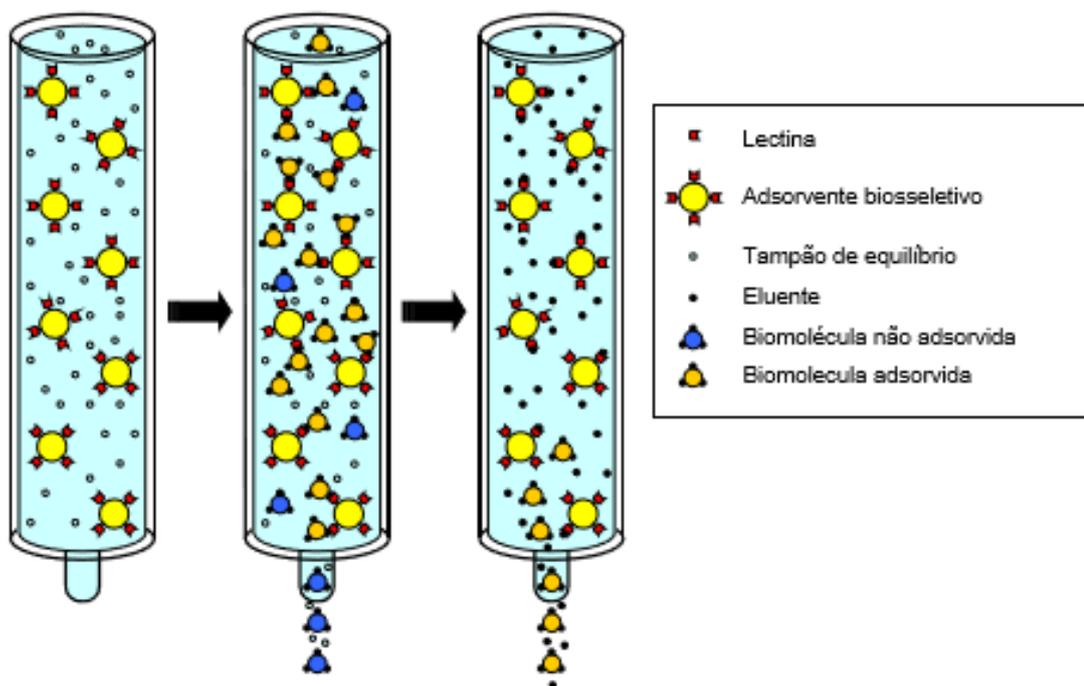


Figura 1. Etapas da cromatografia por afinidade em coluna contendo lectina imobilizada (SANTOS FILHO, 2001).

Em processo de seleção de glicoproteínas em coluna contendo uma única lectina, a lectina utilizada está aderida a uma substância adsorvente, inerte, que funciona como suporte. Para que a lectina seja mantida em condições ideais esta precisa estar em solução tampão, denominada solução de equilíbrio. Aplica-se a amostra complexa e pela a afinidade as glicoproteínas de interesse ficam aderidas à lectina e o restante da amostra é recolhido. Através da utilização de uma solução eluente, que possui maior afinidade pela lectina, desliga a ligação resina-carboidrato e as glicoproteínas são recolhidas posteriormente. O resultado é uma amostra mais seletiva e purificada.

A seleção de uma amostra mais rica em glicoproteínas e reduzida na quantidade de proteínas não glicosiladas favorece a identificação destas estruturas por espectrometria de massas. A abundância de glicopeptídeos favorece a captação do sinal emitido por essas estruturas, em uma amostra onde a presença de proteínas e peptídeos não glicosilados é drasticamente reduzida (WOHLGEMUTH et al., 2009).

As lectinas também podem ser usadas associadas à técnica de *Blotting*. O uso desta técnica associada às lectinas é uma variação do western blotting, usada para a detecção de glicoproteínas. Após a realização da eletroforese desnaturante, SDS-PAGE, as proteínas contidas no gel são transferidas para uma membrana de PVDF. Ao final de sucessivas lavagens com soluções específicas a membrana é colocada na presença de uma solução contendo tipos variados de lectinas, as quais após o período de incubação estarão ligadas aos carboidratos contidos nas glicoproteínas (Figura 2). Para revelação da reação é utilizado um reagente específico capaz de se ligar às lectinas e emitir luz em comprimento de onda específico (HONGSACHART et al., 2008).

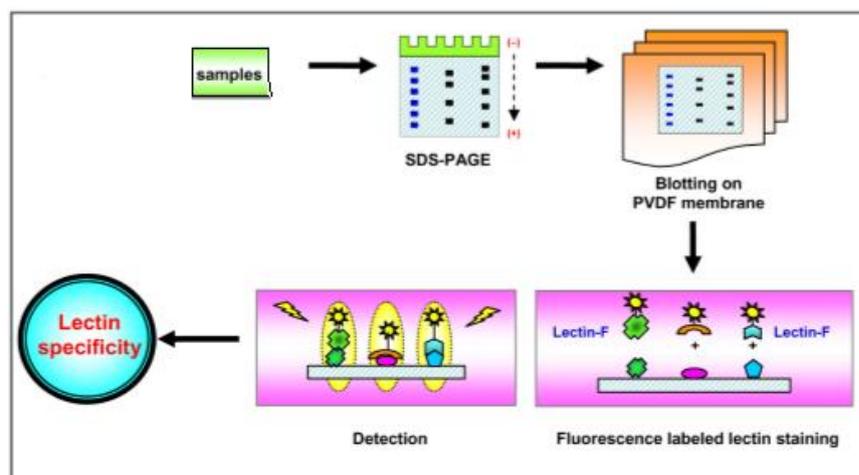


Figura 2. Técnica de blotting utilizando-se lectinas para a detecção de glicoproteínas (HONGSACHART et al., 2008).

Após a realização da eletroforese desnaturante SDS-PAGE é importante realizar a coloração do gel para revelação das bandas formadas. Para identificação das bandas contendo glicoproteínas, especificamente, existe a coloração por Pro-Q Emerald. Neste caso, em um mesmo gel, é possível diferenciar bandas que contém glicoproteínas daquelas que contém apenas proteínas não glicosiladas. Esta técnica de coloração é uma das mais sensíveis para a detecção de glicoproteínas (0,5 ng). O reagente ao entrar em contato com a glicoproteína, mais especificamente com a parte glicídica, emite uma coloração verde fluorescente visualizada à 300 nm. É uma técnica de fácil execução, quando comparada com as demais colorações (MOLECULAR PROBES, 2007).

A coloração por Pro-Q Emerald envolve algumas etapas. Na primeira delas o gel resultante da eletroforese desnaturante SDS-PAGE é colocado em ácido periódico. Neste momento, os glicanos presentes nas glicoproteínas são oxidados formando aldeídos. Reagentes específicos para coloração reagem com os aldeídos liberando a coloração verde fluorescente. Esta emissão fluorescente pode ser lida em comprimento de onda específico e programas informáticos podem facilitar a identificação das glicoproteínas e seus níveis de expressão (HART et al., 2003).

As informações sobre proteínas glicosiladas em espécies de *Trichoderma* são escassas na literatura. Este trabalho procurou identificar proteínas glicosiladas secretadas por *T. harzianum* (ALL-42) quando este foi crescido e induzido por paredes celulares de fungos fitopatógeno. Através deste trabalho espera-se conhecer e contribuir com informações a respeito de proteínas, especificamente proteínas glicosiladas, produzidas por *T. harzianum* (ALL-42), que podem estar envolvidas em mecanismos importantes para o biocontrole. Para alcançar os objetivos previstos neste trabalho foram utilizadas algumas das técnicas destacadas acima.

4. Fungos filamentosos

Os fungos podem ser divididos em grupos distintos de acordo com suas características morfológicas e estruturais. Os fungos leveduriformes são constituídos de célula única, enquanto os fungos filamentosos são constituídos por hifas, longos filamentos e ramificações, que em conjunto formam o micélio. Existem aqueles que, dependendo das características ambientais, hora possuem estrutura leveduriforme, hora possuem estrutura filamentosa, os chamados fungos dimórficos (RODRIGUES et al., 2007; ESPOSITO; AZEVEDO, 2010).

Os fungos filamentosos despertam interesse pela facilidade de cultivo e principalmente, por produzirem e secretarem uma quantidade imensa de enzimas de grande importância industrial e biotecnológica (POLIZELI et al., 2005; FURBINO, 2012). São microrganismos pluricelulares eucariotos, que contém parede celular composta por proteínas e polissacarídeos como quitina, manana e glucana, ao redor de sua membrana celular (ALEXOPOULOS et al., 1969).

Neste grupo observa-se a presença de estruturas tubulares e ramificadas denominadas hifas que podem ser septadas, divididas em septos, ou cenocíticas, inteiriças ou sem divisões. Pelo conjunto e enovelamento das hifas forma-se o micélio. Este pode ser uma estrutura vegetativa, com função de captação de nutrientes, e também reprodutiva. Graças à estrutura filamentosa, estes fungos podem se desenvolver em variados ambientes e sobreviver em diferentes temperaturas e pH. Podem também se servir de diversas fontes de carbono e nitrogênio para manter atividade e metabolismo (ADRIO et al., 2003).

O fungo *T. harzianum* (ALL-42), objeto de estudo nesta pesquisa, pertence ao grupo dos fungos filamentosos, e assim, como outros representantes do grupo, secreta enzimas de grande importância biotecnológica, algumas delas identificadas neste estudo.

4.1 *Trichoderma harzianum*

T. harzianum pertence a um gênero de fungos habitantes do solo, vivendo sobre matéria orgânica em decomposição, absorvendo assim, nutrientes necessários a manutenção de suas atividades vitais. Dependendo do tipo de isolado seus esporos podem ser ovoides ou globosos. Esse fungo filamentoso apresenta crescimento rápido e facilidade de disseminação, por isso, vem sendo intensamente estudado como agente de biocontrole e já utilizado em larga escala para este propósito (SAMUELS, 1996; PERES; MELO, 1995).

A descoberta sobre a capacidade de biocontrole do gênero *Trichoderma* surgiu durante pesquisa com *T. lignorum*, que demonstrou atividade micoparásita contra *Rhizoctonia spp.* (WEINDLING, 1932). A partir de então, este gênero despertou o interesse de equipes de pesquisa que até os dias de hoje se empenham em conhecer o mecanismo de controle biológico com interesse agrícola.

Este agente de biocontrole é facilmente cultivado *in vitro* formando colônias inicialmente de cor branca, que depois da esporulação tornam-se verdes devido à coloração dos esporos. Assim como os outros fungos pertencentes a esse gênero, o *T. harzianum* possui a habilidade de produzir estruturas de resistência, mais conhecidas como clamidísporos, que

crecem nas extremidades das hifas, estas septadas, e formam halos de conídios brancos e verdes (RIFAI, 1969; GRONDONA et al., 1997).

Os estudos sobre a atividade de biocontrole de diferentes espécies de *Trichoderma* permitem conhecer a relação simbiótica desses fungos com as plantas e suas ações de micoparasitismo. Esses fungos tem alta capacidade de disseminação no ambiente onde vivem. Utilizam de forma eficiente o substrato fornecido, que pode constituir-se de diferentes fontes de carbono e nitrogênio para a produção de enzimas e outros metabólitos. Podem também se adaptar a diferentes condições climáticas e ajustar seus mecanismos de sobrevivência a diferentes condições de exposição (SCHUSTER; SCHMOOL, 2010).

O micoparasitismo é um processo complexo que envolve vários fatores e mecanismos combinados. Fungos do gênero *Trichoderma* são micoparasitas eficientes que atacam fungos parasitas de plantas por quimiotropismo. Esses micoparasitas crescem em direção ao fungo agressor por estímulos enzimáticos e são capazes de penetrar suas hifas. Esse processo de destruição das hifas do fitopatógeno envolve enzimas produzidas pelo *Trichoderma*, principalmente quitinases. A produção de substâncias antibióticas também pode ser considerada como fator de impacto sobre o fitopatógeno (BROTMAN et al., 2010).

O biocontrole também pode ser resultante da competição entre o fitopatógeno e o micoparásita por nutrientes e por espaço. Os agentes de biocontrole agem também produzindo substâncias que impedem a germinação de esporos, matam células ou até mesmo modificam as características do ambiente para impedir o crescimento do fungo agressor. A mudança de pH do solo pode ser um exemplo deste processo. O contato entre os fungos estimula a liberação de enzimas hidrolíticas, compostos tóxicos e antibióticos que agem de maneira sinérgica às enzimas. A planta também é beneficiada pelo agente de biocontrole que parece estimular o seu crescimento e induzir mecanismos de defesa contra o fungo agressor (BENÍTEZ et al., 2004).

Conhecer o conteúdo proteico produzido por um fungo filamentoso é imprescindível para o entendimento de seus processos biológicos e sua ação como agente de biocontrole. Esses tipos de fungos tem demonstrado grande importância biotecnológica e esses estudos podem resultar em novos alvos para atividade antifúngica ou uso terapêutico (GRINYER et al., 2004).

Ao interagir com diferentes estruturas do fitopatógeno, a expressão de genes do *T. harzianum*, relacionados ao biocontrole, é estimulada. Esta expressão está intimamente relacionada com a composição química da estrutura do fitopatógeno a qual o micoparásita interage. É importante ressaltar que quando o *Trichoderma* é cultivado isoladamente a

expressão desses genes não é observada, sendo estimulada pela presença do fitopatógeno (TROIAN et al., 2014).

O biocontrole por espécies de *Trichoderma* pode ser exercido de diferentes maneiras, de acordo com Viterbo e colaboradores (2002). Estes dividem os efeitos de biocontrole em dois grupos, os diretos e os indiretos. Pertencem ao primeiro grupo a competição por nutrientes e espaço, a produção de substâncias antibióticas e enzimas, a inativação de enzimas do parasita e a invasão das hifas do fitopatógeno (parasitismo). Os efeitos indiretos são a tolerância ao estresse, sequestro de nutrientes inorgânicos e a indução de mecanismos de resistência, no vegetal, a doenças causadas por fitopatógeno.

Microrganismos pertencentes ao grupo *Trichoderma spp* não são utilizados somente como agentes de biocontrole, mas como estimuladores do crescimento vegetal e indutores de mecanismos de defesa. Esses fungos produzem substâncias com a capacidade de induzir tais processos, aumentando a capacidade produtiva da planta, estimulando seu crescimento, e também aumenta sua capacidade de resistência a estresses externos (SABA et al., 2014; SCHIRMBÖCK et al., 1994).

Os benefícios relacionados ao uso de espécies de *Trichoderma* são a promoção do crescimento, estímulo da resposta defensiva e controle de doenças causadas por fungos, em vegetais. Ainda há muito que desvendar a respeito da diversidade de espécies desse gênero e suas interações com outras espécies (SAMUELS, 2006).

Diferentes espécies de *Trichoderma* interagem com plantas promovendo mudanças consideráveis em seu metabolismo. Essa mudanças metabólicas garantem ao vegetal maior resistência à fitopatologias, induz seu crescimento e desenvolvimento e ainda permite melhor nutrição e aproveitamento de nutrientes (HARMAN et al., 2004). *Trichoderma harzianum* T22 e *Trichoderma atroviride* P1 demonstraram-se bons indutores de crescimento em alface, tomate e pimenta, mostrando aumento considerável da produtividade, quando comparados aos vegetais não induzidos pelos fungos (VINALE et al, 2004).

A interação de espécies de *Trichoderma* com plantas e a ativação dos mecanismos de biocontrole estimulam a produção de metabólitos secundários pelo vegetal. Estes metabólitos podem ser estimuladores do crescimento de plantas, enzimas hidrolíticas, substâncias antibióticas e permeases de carbono e nitrogênio (BENÍTEZ et al., 2004). Os antibióticos produzidos por fungos dessa espécie apresentam diversos efeitos sobre microrganismos, tanto de importância médica como para a agricultura. Os mecanismos de ação destas substâncias envolvem atividade imunossupressora, citostática e inibidora de Adenosina Trifosfato (MELO, 1998).

5. Fitopatógenos

Os fitopatógenos são organismos que possuem a habilidade de desenvolver patologias em plantas. Muitas espécies situadas em diferentes reinos possuem esta habilidade. Os fungos se destacam também por possuírem este potencial e, conseqüentemente, afetar de forma direta ao homem, que se beneficia das plantas na alimentação, terapêutica e sustento. Vale destacar o grande prejuízo produtivo gerado nas grandes lavouras devido à ação de fungos fitopatógenos em diversas espécies de plantas. Fitopatógenos importantes neste sentido foram utilizados neste estudo e serão apresentados a seguir.

5.1 *Sclerotinia sclerotiorum*

O fungo *S. sclerotiorum* (Lib.) de Bary, é um ascomiceto conhecido pelo seu potencial fitopatogênico, agredindo plantações economicamente importantes como as de soja e feijão. Este fungo produz uma estrutura de resistência rica em melanina denominada escleródio que possui a capacidade de permanecer por muito tempo no solo até encontrar organismos susceptíveis ao parasitismo. A germinação de seu micélio, proveniente do escleródio, na superfície do solo, pode resultar em decomposição da matéria orgânica morta e infecção das plantas que vivem neste ambiente (HEGEDUS; RIMMER, 2005).

Este fitopatógeno é conhecido como mofo branco e podridão-de-esclerotínia e é responsável pela mais grave doença que incide sobre a soja (GÖRGEN et al., 2009). O nome mofo-branco se deve ao aspecto de algodão da colônia e pelos sintomas causados nas plantas nas quais causam doença (CARDOSO, 1990).

A *S. sclerotiorum*, assim como outros fitopatógenos, podem ser combatidos por substâncias químicas prejudiciais, os pesticidas e fungicidas. Estes podem ser substituídos por alternativas mais naturais e menos prejudiciais à saúde humana e ao meio ambiente, através de fungos que desempenham mecanismos de biocontrole, dentre eles, o *T. harzianum* (SABA et al., 2014). Além disso, o controle químico do mofo-branco em culturas de soja não alcança todas as partes da planta e é inviável em função dos custos (GÖRGEN et al., 2009).

O *T. harzianum* já demonstrou desempenho importante contra *S. sclerotiorum* durante o confronto em mesmo meio de cultura. O *Trichoderma* cresceu de forma mais rápida inibindo o crescimento do fitopatógeno. Este por sua vez, também apresentou hifas perfuradas pelas hifas do *T. harzianum* comprovando a capacidade deste fungo como agente de biocontrole (MATROUDI et al., 2009).

5.2 *Fusarium oxysporum*

O gênero *Fusarium* é um grupo composto por espécies de fungos que habitam regiões com características geográficas bem distintas, tanto de clima tropical como de clima frio, sendo cosmopolitas. O crescimento radial dessas espécies em culturas a 25 e 30 °C é o critério principal para a classificação neste gênero. As formas dos seus macro e microconídios são influenciadas pelo meio em que são crescidos e pelos diferentes nutrientes e disponibilidade de água disponíveis (BURGESS et al., 1994)

F. oxysporum é um fungo responsável pelo desenvolvimento de doença em plantas e dentro do gênero é o fitopatógeno mais comum. Muitos estudos ainda são necessários para elucidar os mecanismos patológicos desempenhados por este fungo em relação aos vegetais. Sabe-se que ele possui tropismo pelos troncos, influenciando na expressão gênica, na composição estrutural e na produção de metabólitos secundários por esta estrutura (CHEN et al., 2014).

O *T. harzianum* também é capaz de exercer o biocontrole sobre o fitopatógeno *F. oxysporum*. Neste sentido o mecanismo de destruição do fitopatógeno consiste na penetração e torção do micélio do *F. oxysporum*, produção de proteínas e grande quantidade de enzimas empregadas na destruição das estruturas deste fungo, secreção de substâncias antifúngicas e de substâncias complexas para o combate ao fitopatógeno (ZHANG et al., 2014).

6. Composição da parede celular de fungos

A célula fúngica tem sua membrana recoberta por uma parede celular de importância estrutural e que possui a propriedade de conferir forma à célula. Além disso, possui função de proteção contra choques mecânicos, resistência e comunicação com o ambiente externo e outros organismos vivos. Seus componentes e estrutura determinam suas propriedades físicas e biológicas (FONTAINE et al., 2000).

Essas paredes são constituídas quase que em sua totalidade por polissacarídeos. Possuem também quantidades menores de lipídeos e proteínas, podendo, em casos específicos, conter pigmentos, fosfatos, íons inorgânicos (BARTINICKI-GARCIA, 1968). A composição mista da parede possui rigidez devido às ligações covalentes realizadas entre seus diversos componentes. As ligações de hidrogênio e as interações hidrofóbicas são também responsáveis por essa rigidez (RUIZ; HERRERA, 1992).

Devido à composição de parede celular, estas podem ser utilizadas como fontes de carbono e nutrientes por outros organismos. Fungos que interagem entre si podem aproveitar-se dessa rica fonte para suprimento das necessidades energéticas e produção de metabólitos importantes. Para tanto, fungos que se aproveitam de paredes celulares de outros fungos são capazes de produzir um conjunto de enzimas e secreta-las para o ambiente externo no intuito de digerir e reaproveitar constituintes presentes nesta parede.

7. Secretoma

O termo secretoma se refere ao conjunto de proteínas produzidas e secretadas por um organismo. O estudo do secretoma de diferentes fungos filamentosos se torna importante para o desenvolvimento biotecnológico graças à capacidade desses fungos de produzir enzimas, sendo que, algumas delas são indispensáveis aos processos industriais de fabricação de vários produtos. Muito ainda há que se descobrir a respeito do secretoma de fungos filamentosos. Pesquisas envolvendo esses organismos parecem ser fontes inesgotáveis de conhecimento e prometem contribuir com o desenvolvimento biotecnológico.

Assim como os outros fungos filamentosos, *T. harzianum* possui a capacidade de secretar moléculas envolvidas no processo de controle biológico. Caracteriza-se como um dos objetivos deste estudo a identificação de proteínas secretadas por *T. harzianum* estimuladas por situação específica, ou seja, a exposição à paredes celulares de fitopatógenos como fonte de nutrientes.

Cabe ressaltar que a secreção de proteínas é um processo que está totalmente relacionado às modificações pós-traducionais, principalmente a glicosilação. Estas modificações são essenciais para a passagem das proteínas para o ambiente externo à célula (VOET; VOET, 2013; DESHPANDE et al., 2008).

As proteínas produzidas no citoplasma entram na via secretora, que se inicia no retículo endoplasmático. O processo de modificação pós-traducional inicia-se neste local, onde as proteínas adquirem suas conformações finais e núcleos glicosilados. Como continuação da via, as modificações são terminadas no complexo de Golgi e posteriormente, como etapa final, ocorre a exocitose, eliminação das proteínas com modificações pós-traducionais através da fusão de vesículas com a membrana plasmática (VALKONEN et al., 2003).

MATERIAL E MÉTODOS

1. Manutenção dos isolados

T. harzianum (ALL-42) da coleção do Laboratório de Enzimologia (UFG/ICB), *S. sclerotiorum* e *F. oxysporum* (EMBRAPA-ARROZ/FEIJÃO) foram mantidos com repiques periódicos em meio MYG (0,5% de extrato de malte, 0,25% de extrato de levedura, 1% de glicose e 2% de ágar) e estocados a 4°C.

2. Produção das paredes dos fitopatógenos

As paredes dos fitopatógenos *S. sclerotiorum* e *F. Oxysporum* foram obtidas pela adição de 500 mL de meio MYG (0,5% de extrato de malte, 0,25% de extrato de levedura, 1% de glicose) em frascos erlenmeyer de 1 litro. Os frascos foram autoclavados por 15 minutos a 121° C e, aos meios frios, foram adicionados 15 discos de 3 mm de ágar (meio MYG) contendo cada um dos micélios dos fitopatógenos. Os frascos foram incubados à temperatura de 28°C sob agitação constante de 160 rpm em agitador rotatório do tipo shaker por 7 dias. Após este período o micélio de cada isolado foi coletado por filtração a vácuo utilizando papel filtro Whatman n.1 e tratado para ser utilizado como fonte de produção das proteínas secretadas por *Trichoderma harzianum*.

3. Tratamento da parede celular dos fitopatógenos

O tratamento das paredes celulares dos fitopatógeno consistiu na lavagem abundante do micélio contido no filtro com água fervente, para a retirada de proteínas produzidas pelos fitopatógenos. Após a lavagem sucessiva do material este foi armazenado a -80 °C. Com o congelamento das paredes celulares estas foram liofilizadas e maceradas em cadinho até obtenção de pó, com utilização de nitrogênio líquido. Os pós foram incorporados ao meio de cultura para produção do secretoma de *T. harzianum* (ALL-42).

4. Condições de crescimento

Esporos (1×10^7) de *T. harzianum* (ALL-42) foram inoculados em frascos de 1L contendo 250 mL de meio TLE {CaCl₂ 0,1g L⁻¹, KH₂PO₄7,0 g L⁻¹, K₂HPO₄2,0 g L⁻¹,

(NH₄)₂SO₄ 0,1 g L⁻¹, MgSO₄.7H₂O 0,1 g L⁻¹, Bactopeptona g L⁻¹ e 0,1 mL de solução elementos traços}. Cada meio continha 1% de uma das paredes celulares de *S. sclerotiorum* e de *F. oxysporum*. Foi realizado também o crescimento de *T. harzianum* (ALL-42) em duas amostras controle contendo meio TLE acrescido de glicose e glicerol, respectivamente. Os frascos foram incubados em agitador rotatório à 28°C e velocidade de 160 rpm. Após 72 horas de incubação, os meios foram centrifugados a 10.000g e os sobrenadantes foram dialisados contra água, liofilizados e congelados a -80° C. Os materiais obtidos (secretomas) foram utilizados para dosagem de proteína total, cromatografia de afinidade Concanavalina A, e confecção de géis 1-D. Os micélios retidos no filtro foram coletados e armazenados para extração de RNA para realização da RT-PCR. Vale ressaltar que o material foi sempre mantido a temperaturas adequadas que evitavam sua degradação e aliqotado em recipientes de volumes variados para evitar o congelamento e descongelamento sucessivos.

5. Dosagem de proteínas totais pelo método de Bradford

A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método descrito por Bradford (1976) utilizando-se albumina sérica como padrão.

6. Dosagem de proteínas totais pelo método de Smith ou BCA

A concentração de proteínas totais foi estimada pelo método colorimétrico de BCA descrito por Smith e colaboradores (1985) utilizando-se albumina sérica como padrão.

7. Cromatografia por afinidade Concanavalin A (Con A) Agarose

Para enriquecimento do secretoma foram aplicadas 5 mg de proteínas para cada mL de resina Concanavalina A, previamente equilibrada com solução de equilíbrio (1M NaCl, 5mM MgCl₂, 5mM MnCl₂, 5mM CaCl₂, pH 6,5-7,5) e lavada com solução ligante (20mM Tris, 0,5M NaCl, pH 7,4). Após a aplicação da amostra a coluna foi lavada quatro vezes com a solução ligante e eluída solução de α-D-metilmanosídeo a 500mM. O material eluído foi submetido à diálise, com trocas sucessivas, e armazenado a -80 °C.

8. Eletroforese Desnaturante (SDS-PAGE)

O secretoma e o produto obtido do enriquecimento do secretoma em Concanavalin A foram submetidos à eletroforese desnaturante SDS-PAGE. A eletroforese foi realizada em condições desnaturantes, conforme descrito por Laemmli (1970). O gel foi confeccionado em poliacrilamida 12,5% (p/v), com dimensões de 25,5 cm x 20,5 cm x 0,15 cm, em cuba ETTAN DALT SIX (GE Healthcare). Para determinação da massa molecular das proteínas foi utilizado o marcador molecular Amersham Low Molecular Weight Kit for Eletroforesis.

100 µg de cada amostra foram tratadas com kit 2-D Clean-Up (GE Healthcare), adicionadas a 20 µL de tampão de amostra 1X (50 µL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 6,8; 1 µL de β-mercaptoetanol; 100 µL de SDS 10%; 100 µL de glicerol; azul de bromofenol e água destilada q.s.p. 1mL), fervida por cinco minutos e aplicada nos poços do gel. A corrida foi realizada sob uma voltagem de 120 volts, amperagem de 20 mA e 100 W de potência, em tampão de corrida 1X [Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1% (p/v)].

9. Coloração por Coomassie Brilliant Blue

O gel também foi submetido à coloração com o corante *Coomassie Brilliant Blue G250*. Realizou-se a lavagem com água mili-Q e incubação em solução corante (azul de Coomassie G-250 0,25%, metanol 50% e ácido acético 10%) overnight. Após este período, o gel foi lavado novamente com água mili-Q e descorado até o aparecimento das bandas em solução de etanol 30% e ácido acético 10%.

10. Detecção de glicoproteínas por Pro-Q Emerald 488

A detecção de glicoproteínas por Pro-Q Emerald 488 foi realizada após a eletroforese desnaturante SDS-PAGE, de acordo com protocolo fornecido pelo fabricante (Molecular Probes). O gel foi colocado em solução fixadora (metanol 50% e ácido acético 5%) durante trinta minutos em agitação constante. Foi então lavado com solução de lavagem (Ácido Acético Glacial 3%) por 10-20 minutos em agitação e incubado em solução oxidante (250 mL de Ácido Acético Glacial 3% adicionado ao ácido periódico contido no recipiente obtido do fabricante) por 30 minutos em agitação constante. Posteriormente, o gel foi lavado novamente com a solução de lavagem durante 15 minutos, sob agitação, e colocado em solução Pro-Q Emerald 488 Stainins Solution por 90 minutos, ao abrigo da luz e sob agitação constante. Lavou-se novamente o gel por 15 minutos e a imagem do gel foi adquirida através do equipamento Pharos FXTM Plus Molecular Imager (BioRad).

11. Preparo das amostras para Espectrometria de Massa

Os spots de proteínas diferencialmente expressos foram retirados do gel preparado contendo 100 µg de proteínas, com auxílio de um bisturi, e transferidos para tubos eppendorfs de 1,5 mL. Para a remoção do corante e SDS, os segmentos dos spots foram lavados três vezes em uma solução descorante (bicarbonato de amônio 50 mM que contém acetonitrila 50%) durante 15 minutos em agitação, sendo a última por 24 horas. Em seguida, os segmentos de spots foram submersos em uma solução de acetonitrila 100% por 10 minutos e completamente secos em *SpeedVac*.

Para a digestão das proteínas, os segmentos dos spots foram reidratados com 20 µl de solução de bicarbonato de amônio 50 mM com 0,3 µg de tripsina modificada de grau de sequenciamento. Após 30 minutos de reidratação com solução de tripsina, os segmentos de spots foram cobertos com a solução de bicarbonato de amônio 50 mM. A reação de hidrólise foi realizada a 37 °C durante 24 horas e foi adicionado 50 µl da solução bloqueadora (ácido fórmico 1% e acetonitrila 5%), para a interrupção da ação da tripsina.

Os peptídeos foram extraídos dos segmentos de spots com duas lavagens de 30 minutos, em solução de acetonitrila 49,5% e ácido fórmico 1%. Os sobrenadantes foram secos em *SpeedVac* e ressuspensos em 30 µL de solução de ácido fórmico 1% e acetonitrila 5%.

12. Espectrometria de massas

A espectrometria de massas para sequenciamento das proteínas foi realizada no equipamento Xevo-TQS (Waters) acoplada à cromatografia UPLC em coluna de 15 cm (HSS ACQUITY UPLC C18, 100 Å, 1,8 mM, 1 mm x 150 mm, Waters), em gradiente linear de 30 minutos de 5 a 30% de acetonitrila em ácido fórmico 0,1%, sob um fluxo de 150 µL/min. O espectrômetro de massa foi programado da seguinte forma: voltagem capilar de 3,5 kV, temperatura de capilar de 400 °C.

Os espectros foram adquiridos em um modo dependente de dados em m/z, com intervalos de 400 a 1500, com a seleção dos dois íons mais abundantes de cada espectro MS para análise por MS/MS. Os dados adquiridos foram convertidos em mzXML e processados automaticamente pelo programa Labkey Server v12, utilizando o algoritmo de busca X!Tandem (MACLEAN et al., 2006).

Os critérios mínimos de análise de peptídeos foram utilizados com Protein Prophet (KELLER et al., 2002) e pontuação superior a 0,8. Os peptídeos que alcançaram estes

critérios foram agrupados em sequências de proteínas, utilizando o algoritmo Protein Prophet (NESVIZHISKII et al., 2003). As identificações foram consideradas válidas para proteínas com uma taxa de erro igual ou menor a 5% e com elucidação de pelo menos duas sequências de peptídeos.

13. Análise por RT-PCR

Para análise dos genes responsáveis pela expressão das proteínas glicosiladas identificadas por espectrometria de massas foi utilizada a técnica de PCR em tempo real (qRT-PCR). Esta análise foi realizada conforme metodologia descrita em protocolo padrão do kit Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Aproximadamente 5 µg de RNA total extraído do micélio, crescido em 72 horas sob as condições descritas, foi digerido com DNase I e com o RNA total tratado de cada grupo de amostras foi feita transcrição reversa em cDNA. ABI Prism 7500 Fast-Real Time PCR (Applied Biosystems) foi utilizado para execução das reações. O gene da actina (ACT) foi utilizado como controle para comparação do nível de expressão nos diferentes tratamentos. Os “primers” desenhados baseados nas sequências de aminoácidos destas proteínas identificadas por espectrometria de massas, e utilizando-se o programa PRIMER3 PLUS.

14. Ensaio enzimáticos

14.1 β-1,3-glucanase

A atividade de β- 1,3 glucanase foi determinada pela mistura de 50 µL da amostra com 100 µL de tampão acetato de sódio (50 mmol L⁻¹ pH 5.0) contendo 0,25% de laminarina (Sigma). A mistura foi incubada a 40° C por 30 minutos. A concentração de açúcar redutor foi determinada por espectrofotometria a 550nm pelo método de DNS (MILLER, 1959), utilizando glicose como padrão. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1µmol de açúcar redutor por minuto de reação.

14.2 N-acetil-glicosaminidase

A atividade de N-acetil glicosaminidase foi determinada pela mistura de 50 μ L da amostra, 100 μ L de substrato (PNP-NAG 5mmol L⁻¹) e 350 μ L de tampão acetato de sódio (50 mmol L⁻¹ pH 5.0) e incubadas a 37°C por 15 minutos. A reação foi parada com a adição de 1mL de carbonato de sódio. A concentração de PNP liberada foi determinada por espectrofotometria a 405nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de PNP por minuto de reação.

14.3 β -1,3-endoglucanase

A atividade de β - 1,3-endoglucanase foi determinada pela mistura de 50 μ L da amostra com 100 μ L de tampão acetato de sódio (50 mmol L⁻¹ pH 5.0) contendo 0,25% de Lichenan (Sigma). A mistura foi incubada a 40° C por 30 minutos. A concentração de açúcar redutor foi determinada por espectrofotometria a 550nm pelo método de DNS (MILLER, 1959), utilizando glicose como padrão. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 μ mol de açúcar redutor por minuto de reação.

14.4 Protease

A atividade proteolítica foi determinada incubando 0,2 mL da amostra com 0,5 mL de solução de azocaseína 0,02% em tampão citrato-fosfato (0,1 mol L⁻¹) em tubos eppendorff de 1,5 mL. A mistura foi incubada por 15 minutos a 37° C. Após esse tempo a reação foi parada com a adição de 0,7 mL de solução de TCA 20% (m/v). Os tubos foram centrifugados a 12000g por 15 minutos e 1 mL do sobrenadante transferido para tubos de ensaio onde foram adicionados 0,2 mL de NaOH 3 mol L⁻¹ aos tubos de ensaio e determinada a absorbância a 440nm. Uma unidade (U) de protease foi definida o correspondente de 1 de absorbância (SARAH, ZEECE , PENHEITER, 2001).

14.5 β -glicosidase

A atividade de β -glicosidase foi determinada pela reação com p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (pNP-G 5mmol L⁻¹). Amostras de 50 μ L da enzima foram incubados com 100 μ L de substrato e 350 μ L de tampão acetato de sódio (50 mmol L⁻¹ pH 5.5) e incubadas a

37°C por 15 minutos e a reação foi parada com a adição de 1ml de carbonato de sódio. A concentração de PNP liberada foi determinada por espectrofotometria a 405nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1µmol de p-nitrofenol por minuto de reação.

14.6 *α*-manosidase

A atividade de *α*-manosidase foi determinada pela reação com p-nitrofenil-*α*-D-manopiranosídeo (*p*NP-M 10mmol L⁻¹). Amostras de 50µl da enzima foram incubados com 100 µL de substrato e 350µL de tampão citrato-fosfato (50 mmol L⁻¹ pH 5.5) e incubadas a 50°C por 15 minutos e a reação foi parada com a adição de 1ml de carbonato de sódio 0,1 Mol⁻¹. A concentração de PNP liberada foi determinada por espectrofotometria a 410nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1µmol de p-nitrofenol por minuto de reação.

14.7 *α*-arabinofuranosidase

A atividade de *α*-Arabinofuranosidase foi determinada pela reação com p-nitrofenil-*α*-L-arabinofuranosídeo (*p*NP-A 5mmol L⁻¹). Amostras de 50 µL da enzima foram incubados com 100 µL de substrato e 350 µL de tampão citrato-fosfato (50 mmol L⁻¹ pH 5.5) e incubadas a 50°C por 15 minutos e a reação foi parada com a adição de 1ml de carbonato de sódio 0,1 Mol⁻¹. A concentração de PNP liberada foi determinada por espectrofotometria a 405nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1µmol de p-nitrofenol por minuto de reação.

15. Predição dos sítios de glicosilação das proteínas identificadas

Para verificar a posição dos sítios de glicosilação na sequência de aminoácidos das proteínas identificadas utilizou-se o software NetNGlyc e NetOGlyc.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o crescimento de *T. harzianum* (ALL-42) em meio contendo paredes de fitopatógenos obteve-se o secretoma, induzido pela presença destas paredes. Estes secretomas foram submetidos à coluna de Concanavalin A para seleção das glicoproteínas e purificação das amostras. Após este procedimento, as amostras complexas (secretomas) e as amostras provenientes da coluna foram submetidas à eletroforese SDS-Page. O gel resultante foi corado em Comassie Brilliant Blue, para revelação das bandas de proteínas (Figura 3), e Pro-Q Emerald 488 para revelação das bandas contendo glicoproteínas (Figura 4).

O gel corado por Comassie demonstrou bandas de proteínas em perfil característico para *T. harzianum*, onde houve o aparecimento de bandas na parte superior do gel e ausência de bandas na parte inferior. Já no gel corado por Emerald as bandas da parte inferior apareceram coradas sugerindo a presença de glicoproteínas. A coloração por Emerald possui uma maior sensibilidade do que a de Comassie, ou seja, consegue revelar bandas que contém menores quantidades de proteína, além de ser específica para glicoproteína.

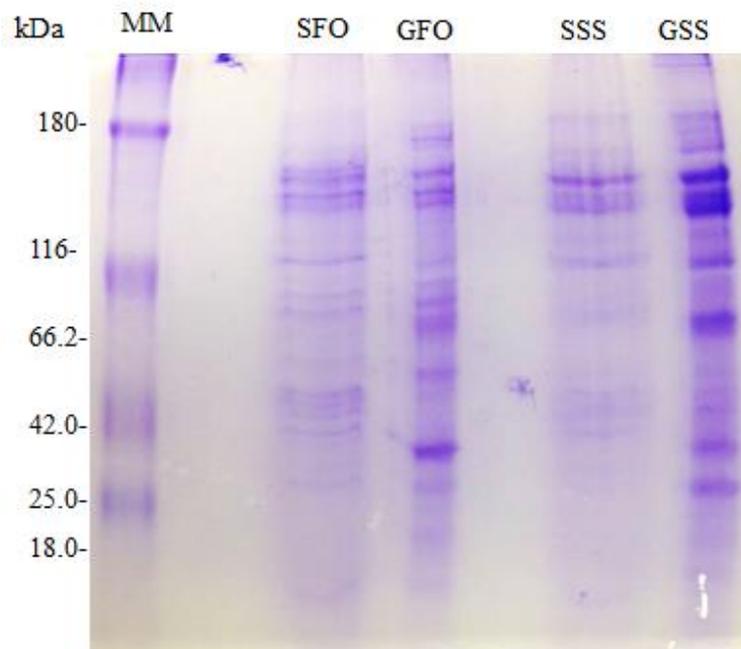


Figura 3. SDS-PAGE dos secretomas e glicosecretomas para *S. sclerotiorum* e *F. oxysporum*. 1)MM - Marcador Molecular; 2) SFO - Secretoma de *T. harzianum* em parede de *F. oxysporum*; 3) GFO - Glicosecretoma de *T. harzianum* em parede de *F. oxysporum*; 4) SSS- Secretoma de *T. harzianum* em parede de *S. sclerotiorum*; 5) GSS - Glicosecretoma de *T. harzianum* em parede de *S. sclerotiorum*.

A coloração Pro-Q Emerald 488 demonstrou a presença de bandas contendo glicoproteínas nos secretomas de *T. harzianum* (ALL-42) em parede de *S. sclerotiorum* e em parede de *F. oxysporum* e estas apareceram também após as amostras terem sido submetidas à cromatografia por afinidade Concanavalin A, para enriquecimento da amostra e seleção específica das glicoproteínas.

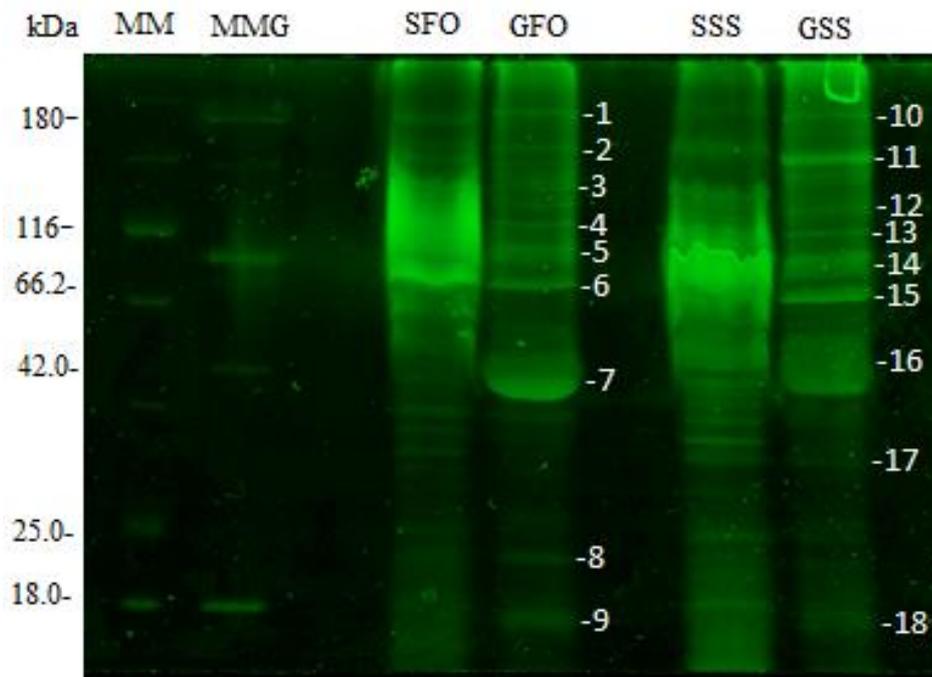


Figura 4. SDS-PAGE após coloração por Pro-Q Emerald 488. 1)MM - Marcador Molecular; 2) MMG - Marcador Molecular para Glicoproteínas; 3) SFO - Secretoma de *T. harzianum* em parede de *F. oxysporum*; 4) GFO - Glicosecretoma de *T. harzianum* em parede de *F. oxysporum*; 5) SSS- Secretoma de *T. harzianum* em parede de *S. sclerotiorum*; 6) GSS - Glicosecretoma de *T. harzianum* em parede de *S. sclerotiorum*.

Pode-se observar que após as amostras serem aplicadas em coluna Concanavalin A as bandas ficaram mais definidas e limitadas devido a menor concentração de proteínas não glicosiladas, retiradas da amostra pela coluna, resultando na seleção de glicoproteínas. O marcador molecular indica aproximadamente o tamanho das proteínas presentes nas bandas e demonstra que, tanto as amostras complexas quanto as submetidas à seleção possuem proteínas de tamanhos bem variados. As bandas selecionadas para recorte foram identificadas através das numerações descritas na imagem e submetidas ao recorte, processamento e análise por espectrometria de massas.

Os resultados obtidos através da espectrometria de massa (Tabela 1) possibilitaram a identificação de proteínas secretadas pelo *T. harzianum* (ALL-42) quando este foi submetido às paredes celulares dos fitopatógeno como fonte de carbono. As sequências de aminoácidos encontradas foram comparadas utilizando-se o banco de dados para *Trichoderma harzianum* em JGI MycoCosm (The Fungal Genomics Resource) para identificação e caracterização das proteínas. Este banco também sugere a possível função das proteínas encontradas.

Tabela 1. Proteínas encontradas através da espectrometria de massas e análise no banco de dados JGI MycoCosm.

Condition/Spot	Seq.n°	Protein ID	Description	Function	Prot Prophet	Subj. Coverage	MW (kDa)
FO/02	591	477855	hypothetical protein Galactose oxidase	Carbohydrate metabolism and transport	0,9915	239,50%	117,6
	267	16405	protein Glycoside hydrolase family 2-Predicted beta-mannosidase	hydrolysis O-glycosyl compounds	0,8950	96,10%	104,06
	512	129594	beta 1,3 exoglucanase-Glycoside Hydrolase Family 55 protein	hydrolysis of β -D-glucose units from the non-reducing ends	0,7031	120,20%	107,28
FO/03	704	479664	glycoside hydrolase family 81 Predicted endo-1,3-beta-glucanase	hydrolysis of the glycosidic bond	0,9944	100,70%	92,19
	624	84515	Six-hairpin glycosidase-like	glycosyltransferases	0,9450	94,20%	76,55
FO/04	807	487999	glycoside hydrolase family 47 protein 1, 2-alpha-mannosidase	mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase activity	0,9974	100%	55,65
FO 05	450	49445	glycoside hydrolase family 17 protein	catalysis of the hydrolysis of any O-glycosyl bond.	0,952	85,20%	42,78
FO/09	683	510908	hypothetical protein	N/D	0,7883	98,70%	93,82
SS/10	558	97285	hypotetical protein zinc-binding oxidoreductase	energy production and conversion	0,9932	100,70%	92,19
SS/11	363	477752	Peptidase S8	endopeptidase activity	0,9998	100%	92,55
	876	511791	hypothetical protein Amidase signature enzyme	N/D	0,9978	95,80%	60,06
	426	502570	glycoside hydrolase family 2 protein	hydrolysis of the glycosidic bond	0,9871	99,70%	68,38
	431	126657	hypothetical protein	N/D	0,9599	95,50%	56,95
SS/12	1152	509041	glycoside hydrolase family 27 protein Alpha-D-galactosidase	hydrolysis O-glycosyl compounds	0,9786	100%	48,25
	837	485240	glycoside hydrolase family 30 protein Beta-glucocebrosidase	glucosylceramidase activity	0,9764	100%	51,59
	254	1473	glycoside hydrolase family 38 protein Alpha-mannosidase	alpha-mannosidase activity	0,7847	100%	121,46
SS/13	159	506888	glycoside hydrolase family 92 protein Alpha-1,2-mannosidase, putative	hydrolysis of the glycosidic bond	0,9693	100%	89
	522	81392	Glycoside hydrolase, family 15	hydrolysis of the glycosidic bond	0,9553	95,20%	67,28
SS/14	230	514104	glycoside hydrolase family 64 protein	hydrolysis of the glycosidic bond	0,9990	100%	40,1
	74	514267	hypotetical peptidase M14	activity carboxypeptidase A	0,9988	100%	46,95
	635	483578	predicted protein	N/D	0,9962	100%	39,44
	257	86843	hypotetical Tyrosinase	oxidoreductase activity	0,9946	100%	60,05
SS/16	923	511848	hypothetical protein	N/D	0,9980	90%	25,47
SS/17	317	511478	hypothetical protein	N/D	0,9274	89,50%	151,2
	1406	478385	Alpha/beta-hydrolases (supefamily)	N/D	0,7147	100%	44,16

Nas bandas de *F. oxysporum* selecionadas foram identificadas quatro famílias de Glicosídeo Hidrolases (2, 17, 47, 55, 81) além da enzima galactose oxidase e a six-hairpin glicosidase. Para *S. sclerotiorum* foram identificadas as famílias 2, 15, 27, 30, 38, 64 e 92, e a enzima Tirosinase. Em algumas bandas recortadas do gel corado em Pro-Q Emerald 488 não foram identificadas as proteínas nelas presentes. Isso pode ter ocorrido devido a limitações na metodologia utilizada e a grande quantidade de proteínas contidas nas bandas, o que interfere na captação de sinais pelo equipamento durante a espectrometria de massas.

A enzima galactose oxidase foi identificada no secretoma induzido por parede de *F. oxysporum*. Esta é uma família de proteínas com função enzimática. Catalisam a reação de oxidação da galactose na posição do carbono 6, previamente descrita na literatura como enzimas secretadas por fungos. Possuem atividade com galactosídeos e polímeros que contenham a galactose e sua estrutura contém cobre na forma divalente. O átomo de cobre parece ter papel fundamental na atividade enzimática. Por esta razão são conhecidas como metaloproteínas (KELLY-FALCOZ et al., 1965).

Foi descoberta através de pesquisas com o meio extracelular de cultura de *Polyporus cincinatus* e recebeu o nome de galactose oxidase (COOPER et al., 1959). Posteriormente provou-se que estas enzimas poderiam ser usadas na determinação da concentração de galactose em uma mistura de açúcares, porém ainda não se conhecia a importância desta enzima do metabolismo do microrganismo (AVIGAD et al., 1962). O grupo das galactose oxidases é amplamente utilizado em processos biotecnológicos (ANASONTZIS et al., 2014).

A identificação deste grupo nos secretomas produzidos neste estudo indica que a produção dessas enzimas por *T. harzianum* (ALL-42) foi induzida por constituintes da parede celular dos fitopatógeno. Isso demonstra a importância deste estudo, sugerindo a importância desta enzima dentro do mecanismo de controle biológico e potencialmente importante dentro do desenvolvimento biotecnológico.

A presença de enzimas glicosídeo hidrolases foi verificada em ambos os secretomas produzidos. Este grupo é dividido em famílias de proteínas, onde cada família recebe uma numeração distinta. Para parede de *F. oxysporum* foram identificadas proteínas pertencentes às famílias 2, 17, 47, 55, 81. Enquanto para *S. sclerotiorum* identificou-se proteínas pertencentes às famílias 2, 15, 27, 30, 38, 64 e 92.

As enzimas glicosídeo hidrolases possuem a função comum de hidrolisar a ligação glicosídica entre carboidratos e entre carboidratos e outras estruturas não glicídicas. A nomenclatura destas enzimas está relacionados aos seus respectivos substratos ou ao seu

mecanismo de ação. A classificação em famílias se baseia na similaridade da sequência de aminoácidos destas enzimas (CAZy, 2015).

As enzimas encontradas em cada família (Tabela 2) de glicosídeo hidrolases sugerem que a presença de cada uma delas no secretoma está relacionada aos componentes das paredes de fitopatógeno utilizadas. É sugestivo que o *T. harzianum* (ALL-42) secreta estas enzimas para degradação das paredes de fitopatógeno e utilização dos produtos dessa degradação em benefício próprio e aproveitamento de nutrientes.

Tabela 2. Famílias identificadas e exemplos de enzimas de cada família (CAZy).

Família	Enzimas
2	β -galactosidase, β -mannosidase, β -glucuronidase, α -L-arabinofuranosidase
15	Glucoamilase, glucodextranase
17	1,3- β -glucosidase, Licheninase, β -1,3-glucanosyltransglycosylase
27	α -galactosidase, isomalto-dextranase, β -L-arabinopyranosidase
30	Endo- β -1,4-xylanase, β -glucosidase, β -glucuronidase, β -xylosidase, β -fucosidase
38	α -mannosidase, mannosyl-oligosaccharide α -1,2-mannosidase
47	α -mannosidase
55	Exo- β -1,3-glucanase, Endo- β -1,3-glucanase
64	β -1,3-glucanase
81	Endo- β -1,3-glucanase
92	α -mannosidase, α -1,3-mannosidase, α -1,4-mannosidase

Estudo prévio também identificou algumas dessas enzimas como sendo secretadas por espécies de *Trichoderma* com a função de enzimas de degradação de parede celular de *S. sclerotiorum*. Neste estudo o *T. asperellum* e *T. harzianum* demonstraram a maior capacidade de secreção de enzimas de degradação de parede celular do fitopatógeno em questão (LOPES et al., 2012), fato que também foi demonstrado no presente estudo.

Ramada e colaboradores (2015) observaram a presença de diversas hidrolases em secretoma quando o *T. harzianum* (ALL-42) foi crescido em meio de cultura contendo parede celular de *Fusarium solani* como fonte de nutrientes. Foi identificada a presença de quitinases, β -1,3-glucanases, glucoamilases, α -1,3-glucanases e proteases, além de algumas proteínas de função desconhecida. O secretoma de *T. harzianum* (ALL-42), neste estudo, mostrou-se uma mistura complexa e diversificada de proteínas secretadas em resposta à presença da parede de *F. solani*.

A secreção de β -1,3-glucanases e quitinases foi detectada também no secretoma de três diferentes espécies de *Trichoderma*. A síntese dessas enzimas foi induzida pelos biopolímeros presentes na parede celular de alguns fungos fitopatógeno, entre eles *F.*

oxysporum. A parede celular de *F. oxysporum* foi a mais efetiva quantitativamente na indução da secreção dessas enzimas (WITKOWSKA; MAJ, 2002).

As paredes celulares de outras espécies de fitopatógeno também induzem a produção de enzimas, entre elas as β -1,3-glucanases, por espécies de *Trichoderma*. Monteiro e Ulhoa (2006) realizaram a caracterização bioquímica de uma β -1,3-glucanase isolada de secretoma de *Trichoderma koningii* induzido por parede celular de *Rhizoctonia solani*. Dentre os parâmetros definidos neste estudo destaca-se o pH e a temperatura ótimos de funcionamento da enzima e mercúrio com inibidor desta.

Monteiro e colaboradores (2010) realizaram um estudo onde foi analisado o secretoma de *T. harzianum* (ALL-42) induzido por parede celular de *M. phaseolina*, *Fusarium sp.* e *Rhizoctonia solani*. As proteínas extracelulares secretadas foram analisadas por espectrometria de massa, totalizando sete proteínas identificadas e 53 spots de proteínas ainda não sequenciadas, não identificadas, ou mesmo novas proteínas não previamente descobertas. As enzimas identificadas foram endoquitinase, β -glucosidase, α -mannosidase, fosfatase ácida, α -1,3-glucanase e proteases.

Muitos estudos demonstram a secreção destas enzimas por *T. harzianum* induzida por paredes celulares de diferentes fitopatógeno (QUALHATO et al., 2013, FERNANDES et al., 2013, VIEIRA et al., 2013, SILVA et al., 2011).

Enzima pertencente à família 55, identificada em secretoma induzido por parede de *F. oxysporum* foi a β -1,3-exoglucanase. Estas são enzimas, as glucanases, estão envolvidas no catabolismo de glicanos (STUBBS et al., 2015). Segundo Nombela e colaboradores (1988) e Larriba e colaboradores (1993), endoglucanases e exoglucanases são secretadas por vários microrganismos possuindo diversas funções, entre elas, a hidrólise de materiais exógenos para o aproveitamento de nutrientes.

T. harzianum secreta enzimas, principalmente glucanases e quitinases, que tem a função de degradar a parede celular de fungos fitopatogênicos, um dos passos cruciais no processo de micoparasitismo, aproveitando os produtos da degradação dos constituintes da parede e o conteúdo celular como fonte de nutrientes. A enzima β -1,3-exoglucanase foi identificada no secretoma de *T. harzianum* quando crescido em meio contendo parede celular de fitopatógenos (COHEN-KUPIEC et al., 1999).

Para Stubbs e colaboradores (2015) a β -1,3-exoglucanase está claramente envolvida no metabolismo de paredes celulares. Portanto, pode-se inferir que a presença desta enzima em secretoma de *T. harzianum* sugere a importância da ação desta enzima sobre o metabolismo das paredes celulares utilizadas no presente estudo.

A enzima six-hairpin glycosidase-like também foi encontrada no secretoma de *T. harzianum* (ALL-42) para parede de *F. oxysporum*. Esta enzima tem função catalítica sobre a formação de dissacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos. Por isso, está incluída no grupo das glicosiltransferases, também classificadas pelo CAZy (INTERPRO, 2015). Até o presente momento, a presença desta enzima no secretoma de *T. harzianum* não apresenta explicação clara, sendo que na literatura ainda não há relatos da presença de glicosiltransferases em secretoma de *T. harzianum*.

Outra enzima identificada foi a tirosinase, esta em secretoma induzido por parede de *S. sclerotiorum*. Esta enzima possui a função de catalisar a reação de oxidação do aminoácido Tirosina e por isso participa de processos biológicos essenciais. Entender o mecanismo de ação desta enzima possibilita a aplicação desta enzima em vários contextos (MATTINEN et al., 2008).

Estudo prévio demonstrou a produção de tirosinase extracelular por *Trichoderma reesei* com atividade parcialmente diferente da tirosinase intracelular encontrada em outro microrganismo, o *Agaricus bisporus* (SELINHEIMO et al., 2009; GASPARETTI et al., 2012). Também encontrou-se diferenças quanto aos substratos de ação, especificidade ligada à estrutura molecular, inibição e reação com a caseína entre as tirosinases expressas por diferentes fungos e plantas (SELINHEIMO et al., 2007).

Algumas famílias de peptidases foram identificadas pela espectrometria de massas no secretoma resultante da amostra cultivada com parede de *S. sclerotiorum*. A família S8 é composta pela enzima serina endopeptidase subtilisina e seus homólogos, sendo representada em maior parte por endopeptidases, mas existem também exopeptidases neste grupo. Essas proteínas possuem ação catalítica sobre os aminoácidos serina, asparagina e histidina. A família M14, também identificada, é um grupo de metalocarboxypeptidases. Grande parte das peptidases presentes neste grupo hidrolisa o carbono C terminal dos aminoácidos de cadeias polipeptídicas (MEROPS, 2015).

Muitos estudos já demonstraram a presença de proteases e peptidases em secretoma e sua importância em *T. harzianum* (FAN et al., 2014; RAMADA et al., 2015; LOPES et al., 2012).

Diante das proteínas identificadas no presente estudo, vale ressaltar que o número majoritário de hidrolases secretadas são glicoproteínas, de acordo com Zembec e colaboradores (2011), e pode-se inferir que a produção e secreção destas enzimas depende intimamente do processo pós-traducional de glicosilação destas proteínas. O diferencial deste estudo inclui a demonstração dos sítios de glicosilação das proteínas identificadas buscando

vincular o processo de secreção de proteínas ao processo pós-traducional de glicosilação e a análise da expressão gênica por RT-PCR.

A análise por PCR em tempo real buscou avaliar a expressão gênica dos genes codificadores das proteínas identificadas nas bandas provenientes do gel. Foram avaliadas as duas condições de pesquisa, *T. harzianum* induzido por parede celular de *S. sclerotiorum* e *T. harzianum* induzido por parede celular de *F. oxysporum*, e também nas condições de controle, glicose e glicerol, para posterior correlação. O RNA foi obtido através do micélio proveniente das diferentes condições, em 72 horas de crescimento.

Os resultados mostraram que importantes enzimas ou famílias de enzimas identificadas neste estudo tiveram também maior expressão dos seus genes codificadores nas condições propostas, tanto em relação à glicose quanto em relação ao glicerol (Figuras 5 e 6).

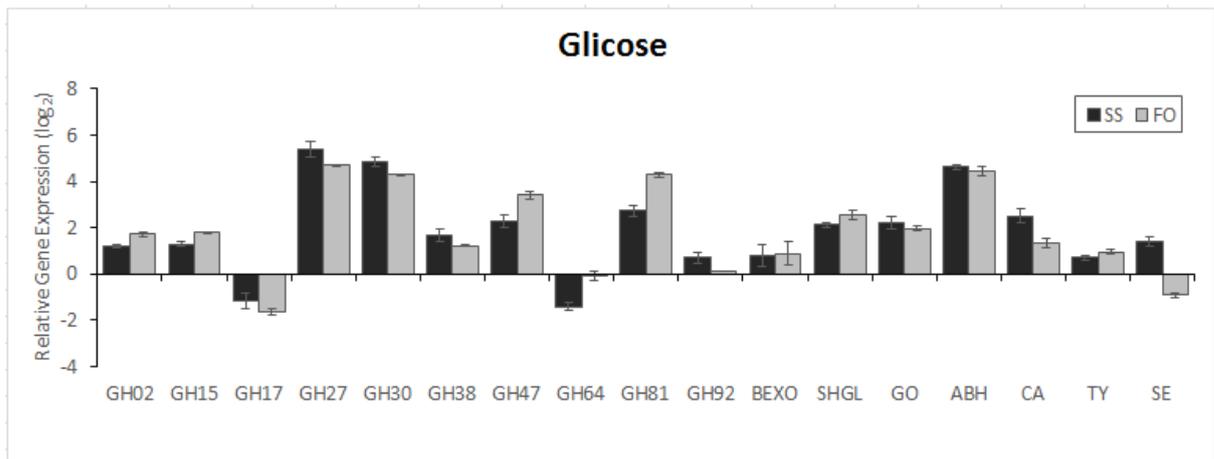


Figura 5. Análise da expressão gênica relativa à glicose nas diferentes condições de crescimento. 1) GH - Glicosilhidrolases; 2) BEXO - Beta-1,3-glucanase; 3) SHGL - Six hairpin; 4) GO - Galactose Oxidase; 5) ABH - Alfa/beta Hidrolases; 6) CA - Carboxipeptidase; 7) TY - Tirosinase; 8) SE - Serinopeptidase.

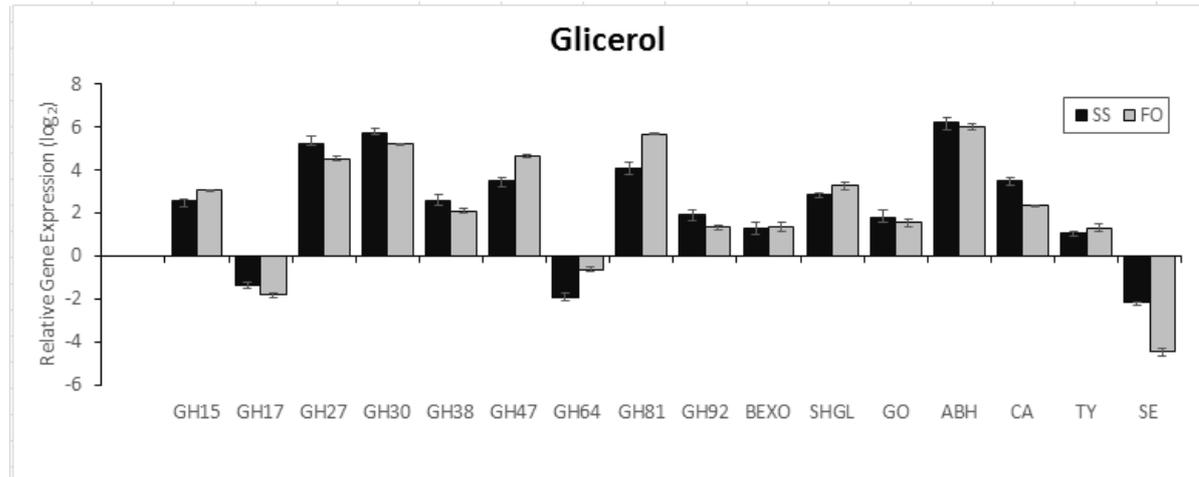


Figura 6. Análise da expressão gênica relativa ao glicerol nas diferentes condições de crescimento. 1) GH - Glicosilhidrolases; 2) BEXO - Beta-1,3-glucanase; 3) SHGL - Six hairpin; 4) GO - Galactose Oxidase; 5) ABH - Alfa/beta Hidrolases; 6) CA - Carboxipeptidase; 7) TY - Tirosinase; 8) SE - Serinopeptidase.

Em comparação com os dois controles algumas famílias de glicosídeo hidrolases (GH) demonstraram maior expressão e merecem destaque neste estudo. São elas: GH 27, GH 30, GH 47, GH 81. Destaca-se também maior expressão em relação a ambos os controles para as enzimas: six-hairpin (SHGL), alfa/beta hidrolases (ABH), galactose oxidase (GO), carboxipeptidases (CA). Interessante destacar que para os diferentes fitopatógenos as expressões gênicas foram concordantes em relação a glicose e ao glicerol, os dois controles utilizados.

Importante ressaltar que uma maior expressão gênica relativa não está relacionada diretamente com a secreção das proteínas correlacionadas, ou seja, uma maior expressão gênica relativa de um gene correlacionado a determinada proteína não implica necessariamente na secreção desta proteína. Os mecanismos de secreção e formação do secretoma envolvem ainda outros parâmetros do aparato celular, como por exemplo, as modificações pós-traducionais.

Ao relacionarmos as proteínas identificadas neste estudo com a análise da expressão gênica relativa observamos que famílias identificadas foram encontradas com resultado expressivo para expressão gênica, assim como, as enzimas identificadas. Isso reforça a qualidade do estudo desenvolvido e comprova os resultados da espectrometria de massas aumentando a confiabilidade desta pesquisa.

Após a análise da expressão gênica foram realizados ensaios enzimáticos para avaliação da atividade enzimática nos secretomas de *S. sclerotiorum* e *F. oxysporum*.

Demonstrou-se atividade (Tabela 3) para enzimas identificadas por espectrometria de massas e que também demonstraram maior expressão gênica.

Tabela 3. Atividade enzimática nos glicosecretomas.

Enzimas	GSS	GFO
	UE/mL	
N-acetylglucosaminidase	6.95 ± 0.30	6.08 ± 0.7
α-mannosidase	6.65 ± 0.12	7.04 ± 0.18
β-glucosidase	5.60 ± 0.37	5.56 ± 0.18
α-arabinofuronosidase	11.31 ± 0.30	10.53 ± 0.18
Protease	0.88 ± 0.11	0.56 ± 0.02
β-1,3-exo glucanase	37.5 ± 2.12	32.5 ± 2.12
β-1,3-endo glucanase	25.5 ± 6.36	42.5 ± 6.36

GSS: Glicosecretoma de *S. sclerotiorum*; GFO: Glicosecretoma de *F. oxysporum*

Proteínas identificadas neste estudo foram submetidas à análise de suas estruturas com enfoque nos sítios de glicosilação. Através do software NetNGlyc e NetOGlyc foram preditos a posição da glicosilação dentro da sequência de aminoácidos, sendo que, valores de potencial (linha azul e linha verde) superiores a 0,5 indicam uma predição confiável. Desta forma foram preditos os sítios presentes na sequência de aminoácidos das principais proteínas identificadas por espectrometria de massas (Figuras 7 a 18).

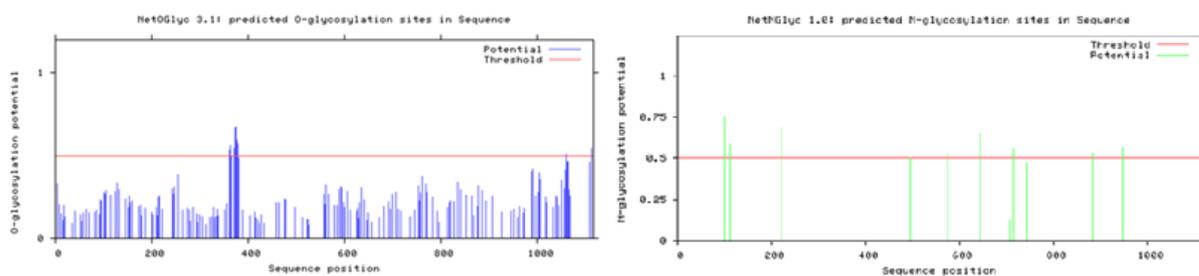


Figura 7. Predição dos sítios de O-glicosilação e N-glicosilação em Galactose Oxidase.

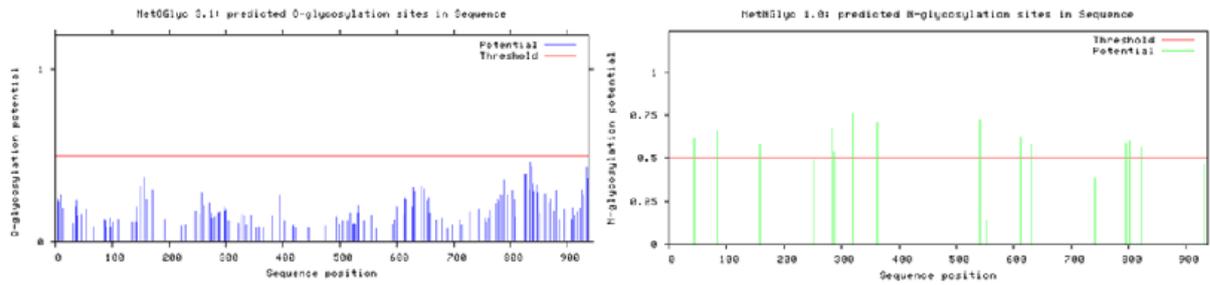


Figura 8. Predição dos sítios de O-glicosilação e N-glicosilação em Beta-manosidase.

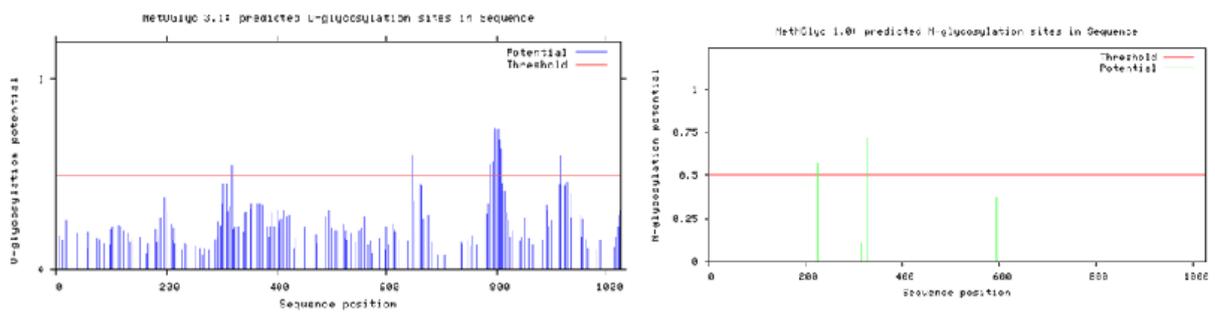


Figura 9. Predição dos sítios de O-glicosilação e N-glicosilação em Beta-1,3-exoglucanase.

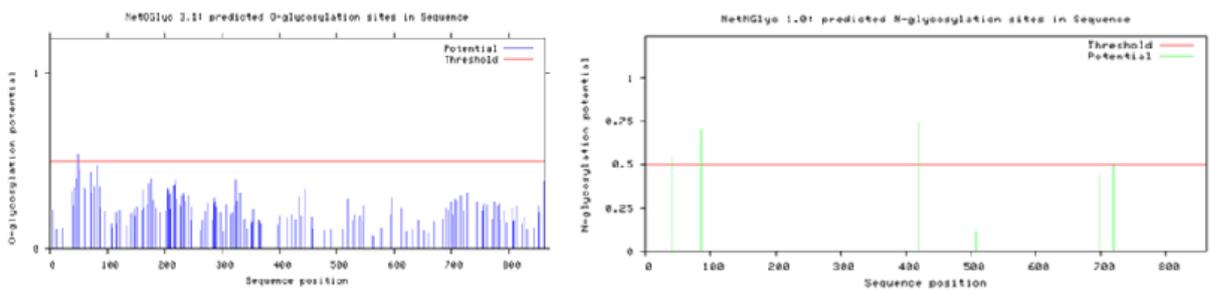


Figura 10. Predição dos sítios de O-glicosilação e N-glicosilação para Beta-1,3-endoglucanase.

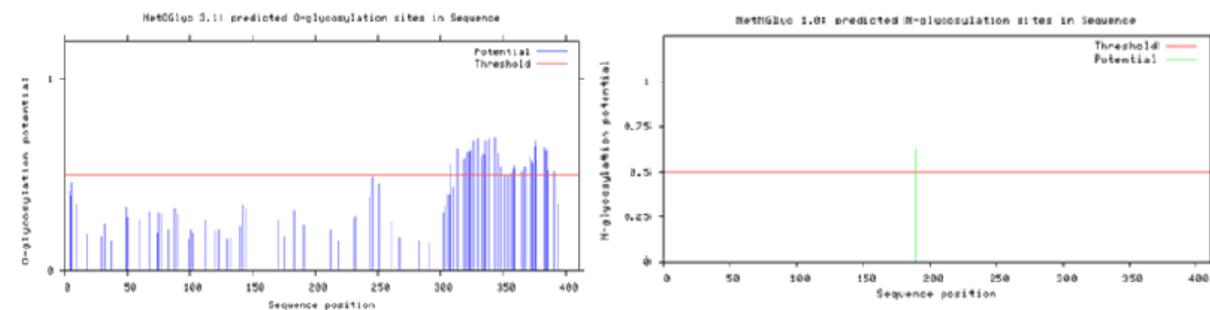


Figura 11. Predição dos sítios de O-glicosilação e N-glicosilação em enzimas da família GH 17.

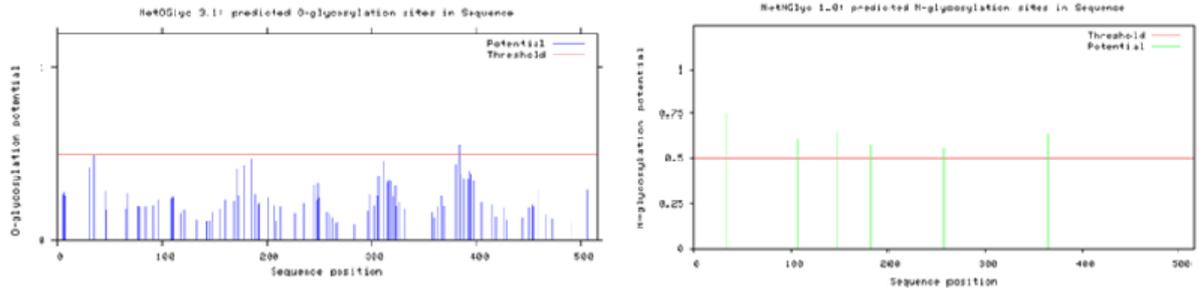


Figura 12. Predição dos sítios de O-glicosilação e N-glicosilação em alfa-manosidase.

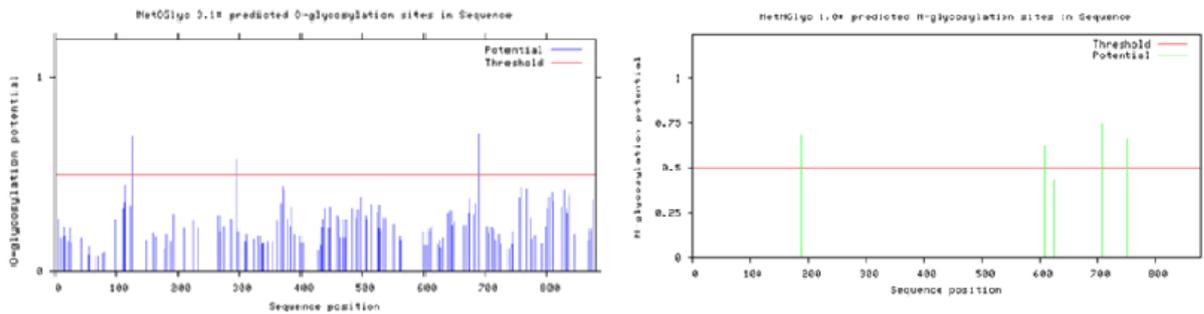


Figura 13. Predição de sítios de O-glicosilação e N-glicosilação em Serinopeptidases.

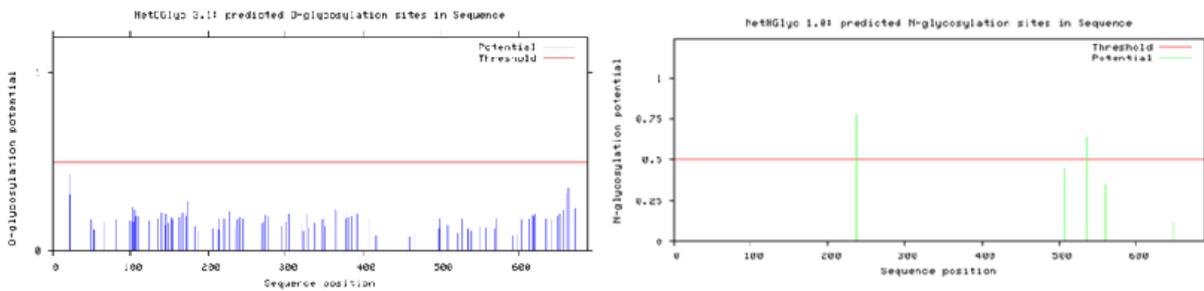


Figura 14. Predição de sítios de O-glicosilação e N-glicosilação em Sixhair-pin.

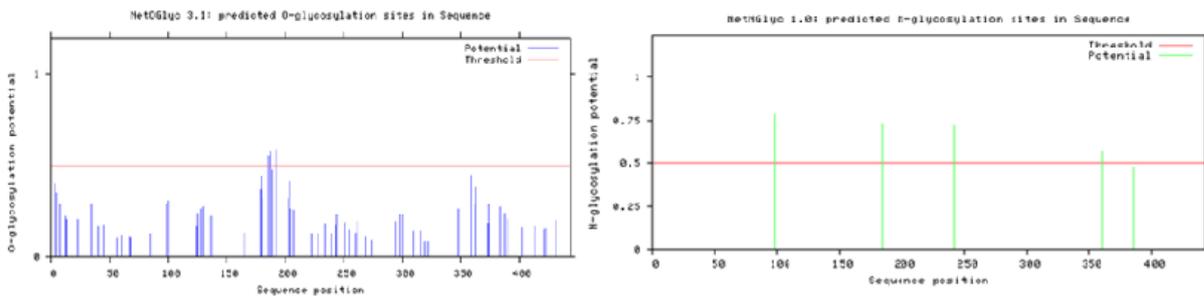


Figura 15. Predição dos sítios de O-glicosilação e N-glicosilação para enzimas da família GH

27.

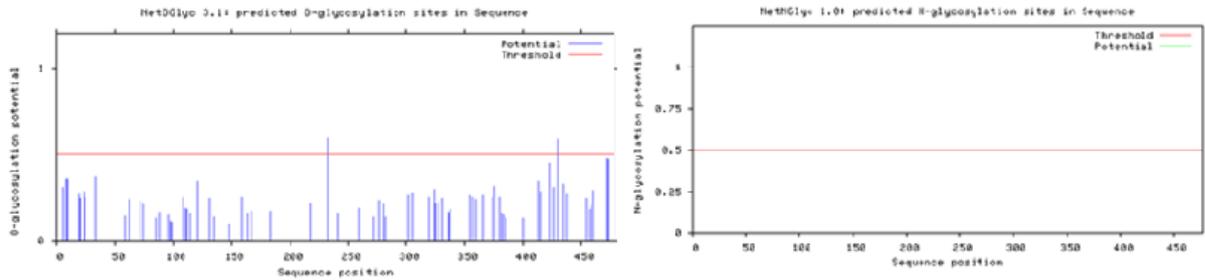


Figura 16. Predição dos sítios de O-glicosilação e N-glicosilação para enzimas da família GH 30.

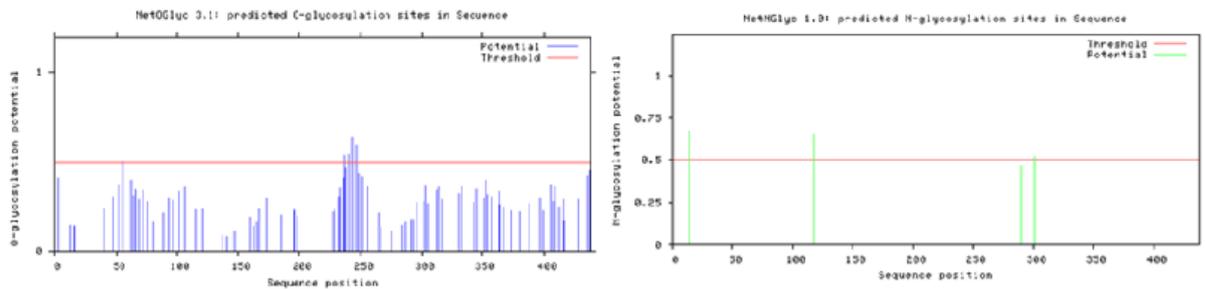


Figura 17. Predição dos sítios de O-glicosilação e N-glicosilação em Carboxipeptidases.

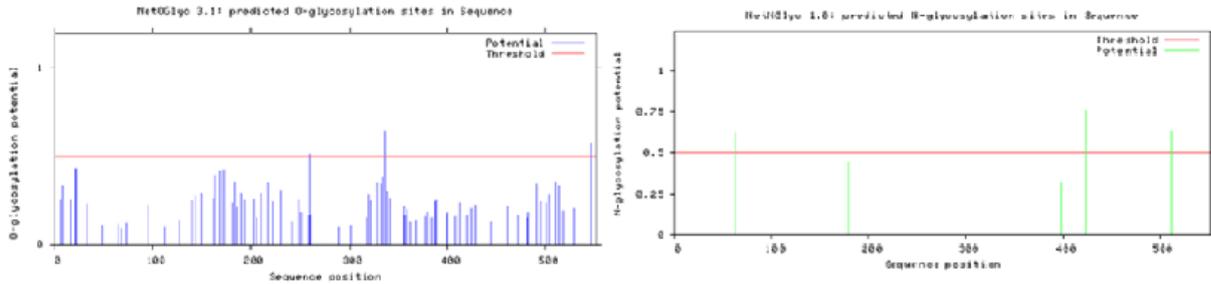


Figura 18. Predição dos sítios de O-glicosilação e N-glicosilação para Tirosinase.

Segundo as predições, pode-se inferir que quase a totalidade das enzimas identificadas e pesquisadas em relação aos sítios de glicosilação possuem os dois tipos de glicosilação ao longo da cadeia de aminoácidos. Pode ser observado que a enzima Galactose Oxidase (Figura 7) possui possíveis sítios de N-glicosilação e de O-glicosilação, assim como, as enzimas, Beta-1,3-exoglucanase (Figura 9), Beta-1,3-endoglucanase (Figura 10), alfa-manosidase (Figura 12), serinopeptidases (Figura 13), entre outras. A presença das glicosilações pode estar relacionada à secreção desta enzima assim como a sua funcionalidade no meio externo, levando em consideração a relação estrutura-atividade.

A Beta-1,3-exoglucanase foi identificada em secretoma de *T. harzianum* e juntamente com as outras glucanases formam um conjunto de enzimas líticas importantes no processo de

degradação de paredes celulares de fungos patogênicos e possibilidade do aproveitamento do conteúdo destas paredes e do conteúdo celular como nutrientes (COHEN-KUPIEC et al., 1999). Importante ressaltar a importância do processo de glicosilação de proteínas para a secreção e exercício da função dessas enzimas líticas. Beta-1,3-endoglucanase, assim como a Beta-1,3-exoglucanase, é uma enzima lítica importante na degradação de paredes celulares de fungos patogênicos.

A alfa-manosidase é uma enzima importante no processo de degradação da parede celular de fungos específica para a ação lítica sobre a manose. Interessante ressaltar que a alfa-manosidase já demonstrou atividade sobre a estrutura de glicoproteínas secretadas alterando as estruturas de O e N glicanos, após a secreção. Segundo Eneyskaya e colaboradores (1998) as estruturas de glicanos estudadas em secretomas acrescidos ou não de inibidores de alfa-manosidase mostraram-se diferentes umas das outras. Estudos que envolvam as estruturas glicosiladas são importantes neste sentido uma vez que a alfa-manosidase pode influenciar na funcionalidade de outras enzimas.

Neste estudo houveram peptidases identificadas no secretoma por espectrometria de massas, mais especificamente as serinopeptidases. Para este grupo a predição de sítios de glicosilação supôs a presença de três sítios de O-glicosilação e quatro sítios de N-glicosilação na sequência de aminoácidos da proteína.

A Tirosinase foi identificada em secretoma induzido por parede de *S. sclerotiorum*, embora a expressão gênica relativa do gene correlacionado à ela não tenha apresentado significância. Sua identificação já foi relatada em secretoma de outra espécie de *Trichoderma* e os sítios de glicosilação (Figura 18), possivelmente três de N-glicosilação e dois de O-glicosilação, podem auxiliar na elucidação da secreção desta proteína tipicamente intracelular.

Pode-se ainda observar a presença de enzimas no glicosecretoma contendo apenas sítios de N-glicosilação como demonstrado em Beta-manosidase (Figura 8) e em Six-hairpin (Figura 14), segundo as predições dos sítios de glicosilação. Esperava-se a identificação de proteínas contendo esse tipo de glicosilação apenas, pois a coluna de Concanavalin A utilizada é específica para este tipo de glicosilação e possui afinidade por N-glicanos.

A predição para a família GH2 foi realizada levando em consideração a enzima beta-manosidase, membro importante do grupo, secretada por *T. harzianum* (ALL-42) segundo outras pesquisas realizadas pelo grupo. Segundo a predição em NetOGlyc para Beta-manosidase, pode-se inferir que não há a presença de O-glicosilação na molécula. Foram preditos sítios de N-glicosilação em quantidades significantes e que da mesma forma dos

sítios preditos em outras enzimas estes podem estar relacionados à secreção e funcionalidade desta proteína.

Em relação à enzima Six-hairpin glicosidase-like sabe-se que ainda não há explicação evidente sobre a presença desta enzima em secretoma. A presença de sítios de glicosilação e estudos futuros mais específicos podem elucidar a função desta enzima no meio extracelular, ou seja, a causa de sua secreção. Através da predição infere-se a ausência de O-glicosilação e a presença de dois sítios de N-glicosilação.

Como este estudo utilizou a coluna de Concanavalin A para purificação do glicosecretoma esperava-se então a identificação de proteínas com sítios de N-glicosilação. Porém, em relação à família GH 30, a pesquisa pelos sítios de glicosilação demonstrou ausência de sítios de N-glicosilação e suposta presença de dois sítios de O-glicosilação (Figura 16).

A coluna de Concanavalin A é utilizada para a seleção de sítios de N-glicosilação. Uma vez identificada a família GH 30 em secretoma, e, segundo a predição, não possuindo N-glicosilação, podemos inferir que esta lectina possui afinidade por sítios de N-glicosilação porém, não exclui definitivamente a passagem de proteínas que possuam somente sítios de O-glicosilação, como ocorrido neste exemplo.

Lee e colaboradores (2010) estudando três tipos diferentes de lectinas (Concanavalin A, Jacalina e *Wheat Germ Agglutinin*) concluíram que cada uma possui maior afinidade por tipos de carboidratos diferentes. Porém, alguns oligossacarídeos similares foram identificados tanto em estruturas que ficaram ligadas às lectinas quanto em estruturas que não foram retidas pela resina. Conclui-se que a afinidade não é o único aspecto influente sobre seleção por lectinas, mas também a concentração e abundância de cada constituinte, assim como a competição entre proteínas.

Importante ressaltar que, como dito por autores já citados neste trabalho, o processo de secreção de proteínas está intimamente relacionado com a glicosilação de proteínas. As modificações estruturais sofridas são importantes na passagem da glicoproteína para o ambiente externo à célula. Como verificado segundo a predição, as proteínas identificadas no secretoma parecem possuir sítios de glicosilação ao longo da cadeia de aminoácidos.

Como perspectiva futura, continuação deste estudo objetiva ainda pesquisar no software I-TASSER as estruturas tridimensionais das proteínas identificadas por espectrometria de massas e observar a posição dos sítios de glicosilação em relação à estrutura tridimensional da proteína. Se os sítios de glicosilação estiverem inseridos nos sítios ativos das enzimas será possível inferir a

importância destes sítios de glicosilação no papel biológico das enzimas e relacionar a glicosilação com a função e secreção das mesmas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a finalização destas etapas de trabalho pode-se considerar:

- Foi possível obter o secretoma de *T. harzianum* (ALL-42) induzido por parede de *S. sclerotiorum* e *F. oxysporum*;
- Purificou-se os secretomas em coluna de cromatografia por afinidade Concanavalin A e obteve-se os glicosecretomas;
- Através do recorte das bandas do gel e análise por espectrometria de massas foram identificadas proteínas e famílias de proteínas importantes no processo de degradação de parede, aproveitamento de nutrientes e micoparasitismo;
- A expressão gênica relativa dos genes relacionados às proteínas identificadas demonstrou, para grande maioria delas, maior expressão gênica, indicando maior atividade desses genes quando *T. harzianum* (ALL-42) foi induzido pela presença das paredes de fitopatógenos;
- A atividade enzimática provou que os glicosecretomas possuem enzimas em atividade e demonstrou resultado concordante com a espectrometria de massas e a análise da expressão gênica relativa;
- A presença destas enzimas provavelmente está relacionada à composição das paredes celulares de fitopatógenos;
- As enzimas identificadas em ambas às amostras demonstram uma similaridade das propriedades e composição dos secretomas para os diferentes fitopatógenos mesmo que identificadas proteínas apenas em um ou em outro;
- Pode-se inferir que as proteínas identificadas após Concanavalin A possuem glicosilação e seus sítios foram preditos por software demonstrando as possíveis localizações destes sítios nas cadeias de aminoácidos;
- Acredita-se que glicosilação está intimamente ligada ao processo de secreção de proteínas.

REFERÊNCIAS

- ADRIO, J.; DEMAIN, A. Fungal Biotechnology. **International Microbiology**, v.6, p. 191-199, 2003.
- AKKOUH, Ouafae et al. Lectins with anti-HIV activity: A review. **Molecules**, v.20, p.648-668, 2015.
- ALEXOPOULOS, C.J. et al. **Introductory Micology**. 4.ed. Nova York: Jonh Wiley & Sons, 1996.
- ANASONTZIS, George E. et al. Effects of temperature and glycerol and methanol-feeding profiles on the production of recombinant galactose oxidase in *Pichia pastoris*. **Biotechnology Progress**, v.30, n.3, p.728-735, 2014.
- ASAD, Saeed Ahmad et al. Biocontrol efficacy of different isolates of *Trichoderma* against soil borne pathogen *Rhizoctonia solani*. **Polish Journal of Microbiology**, v.63, n.1, p.95-103, 2014.
- AVIGAD, Gad et al. The α -galactose oxidase of *Polyporus circinatus*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.237, n.9, p.2736-2743, 1962.
- BARTNICKI-GARCIA, S. Cell Wall Chemistry, Morphogenesis, and Taxonomy of Fungi. **Annu. Rev. Microbiol.**, v.22, p.87-108, 1968.
- BENÍTEZ, Tahía et al. Biocontrol mecanismos of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, v.7, p.249-260, 2004.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem**, v.72, p.248-254, 1976.
- BROTMAN; Yariv et al. *Trichoderma*. **Current biology**, v.20, n.9, R390, 2010.
- BUNN-MORENO, M.M.; CAMPOS-NETO, A. Lectin(s) extracted from seeds of *Artocarpus integrifolia* (jackfruit): potent and selective stimulator(s) of distinct human T and B cell functions. **Journal Immunology**, v.127, n.2, p.427-429, 1981.
- BURGESS, L.W.; SUMMERELL, B.A.; BULLOCK, S. GOTT, K.P. & BACKHOUSE, D. *Laboratory manual for Fusarium research*. **University of Sydney**, Sydney, 1994.
- CALVANO, Cosima D. et al. Assessment of lectin and HILIC based enrichment protocols for characterization of serum glycoproteins by mass spectrometry. **Journal of Proteomics**, v.71, p.304-317, 2008.

CAMPOS, Rykelly Faria. **Estudo do potencial de remoção de substâncias húmicas na água com aplicação de enzimas fúngicas**. Goiânia, GO. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Universidade Federal de Goiás, 2011.

CARDOSO, J.E. **Doenças do feijoeiro causadas por patógenos do solo**. Goiânia: EMBRAPA-CNPAP, 1990. 30p. (EMBRAPA-CNPAP. Documentos, 30).

CAZy. **Carbohydrate-active enzymes**. Disponível em: <<http://www.cazy.org/>>. Acesso em: Dez/2015.

CHEN, Chen Chun et al. Interaction modes and approaches to glycopeptide and glycoprotein enrichment. **Royal Society of Chemistry**, v.139, p.688-701, 2014.

CHEN, Weixuan et al. A universal chemical enrichment Method for mapping the yeast N-glycoproteome by mass spectrometry (MS). **Technological Innovation and Resources**, v.13, p.1563-1572, 2014.

COHEN-KUPIEC, R. et al. Molecular characterization of a novel beta-1,3-exoglucanase related to mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. **Gene**, v.226, n.2, p.147-154, 1999.

COOPER, J.A.D. et al. Galactose oxidase from *Pyloporus circinatus*, Fr. **The Journal of Biological Chemistry**, v.234, n.3, p.445-448, 1959.

DALZIEL, Martin et al. Emerging principles for the therapeutic exploitation of glycosylation. **Science**, v.343, p.37-45, 2014.

DARULA, Zsuzsanna; MEDZIHRADSKY, Katalin F. Affinity enrichment and characterization of mucin core-1 type glycopeptides from bovine serum. **Molecular & Cellular Proteomics**, v.8, n.11, p.2515-2527, 2009.

DESHPANDE, N. et al. Protein glycosylation pathways in filamentous fungi. **Glycobiology**, v.18, n.8, p. 626-637, 2008.

EASTON, Richard. Glycosylation of proteins: structure, function and analysis. **Life Science**, v.48, p.1-5, 2011.

ENEYSKAYA, E.V. et al. Alpha-mannosidase from *Trichoderma reesei* participates in the postsecretory deglycosylation of glycoproteins. **Biochem Biophys Res Commun**, v.245, n.1, p.43-49, 1998.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. 2 ed. Caxias do Sul: Educs, 2010.

ETHUR, Luciana Zago et al. Seleção de *Trichoderma* spp. visando ao controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, *in vitro*. **Cultura Rural**, v.31, n.5, p.885-887, 2001.

FAN, H. et al. Functional analysis of a subtilisin-like serine protease gene from biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. **J Microbiol**, v.52, n.2, p.129-138, 2014.

FAZIO, Maria Luiza Silva. **Caráter “killer” e antagonismo de leveduras aplicadas no biocontrole de fitopatógenos micotoxigênicos em frutas**. São José do Rio Preto, SP. Originalmente apresentada como tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2009.

FERNANDES, K.F. et al. Chitin hydrolysis assisted by cell wall degrading enzymes immobilized of *Trichoderma asperellum* on totally cinnamoylated D-sorbitol beads. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.**, v.33, n.5, p.3077-3081, 2013.

FONTAINE, T. et al. Molecular organization of the alkali insoluble fraction of *Aspergillus fumigatus* cell wall. **J. Biol. Chem.**, v.275, p.27594–27607, 2000.

FURBINO, L. E. *Diversidade e bioprospecção de fungos associados às macroalgas antárticas *Monostroma hariotti* Gain e *Porphyra endiviifolia* (A. Gepp & E.S Gepp) Y.M. Chamberlain*. Dissertação (Mestrado). Universidade. Programa. Cidade, 2012.

GASPARETTI, Chiara et al. Extracellular tyrosinase from the fungus *Trichoderma reesei* shows product inhibition and different inhibition mechanism from the intracellular tyrosinase from *Agaricus bisporus*. **BBA – Proteins and Proteomics**, v.1824, n.4, p.598-607, 2012.

GÖRGEN, Cláudia Adriana et al. Controle do mofo-branco com palhada e *Trichoderma harzianum* 1306 em soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.12, p.1593-1590, 2009.

GRINYER, Jasmine et al. Fungal proteomics: initial mapping of biological control strain *Trichoderma harzianum*. **Current Genetics**, v.45, p.163-169, 2004.

GRONDONA, I. et al. Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, biological control agent against Soilborne Fungal Plant Pathogens. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.8, p.3189-3198, 1997.

GROSSO, Daniela de Mattos. **GP70 de *Paracoccidioides brasiliensis*: caracterização molecular e produção de anticorpos monoclonais bloqueadores do desenvolvimento da doença**. São Paulo, SP. Originalmente apresentada como tese de doutorado, Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, 2003.

HARMAN, G.E. et al., *Trichoderma* species- Opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v.02, p.43-56, 2004.

HART, Courtenay et al. Detection of glycoproteins in polyacrylamide gels and on electroblots using Pro-Q Emerald 488 dye, a fluorescent periodate Schiff-base stain. **Electrophoresis**, v.24, p. 588-598, 2003.

HEGEDUS, Dwayne D.; RIMMER, Roger S. *Sclerotinia sclerotiorum*: When “to be or not to be” a pathogen? **FEMS Microbiology Letters**, v.251, p.177-184, 2005.

HONGSACHART, Piyorot et al. Preliminary screening of glycoprotein profiles in human normal and lung cancer sera by different staining methods. **Chiang Mai J. Sci.**, v.35, n.2, p.331-344, 2008.

HORTIN, G.L.; TRIMPE, B.L. Lectin Affinity chromatography of proteins bearing O-linked oligosaccharides: application of jacalin-agarose. **Anal Biochem**, v.188, n.2, p.271-277, 1990.

INTERPRO. **European Bioinformatics Institute**. Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>>. Acesso em: Dez/2015.

JOO AN, Hyun et al. Determination of glycosylation sites and site-specific heterogeneity in glycoproteins. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.13, p.421-426, 2009.

KABIR, S. Jacalin: a jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed-derived lectin of versatile applications in immunobiological research. **Journal Immunology Methods**, v.212, n.2, p.193-211, 1998.

KELLER, A. et al. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. **Anal. Chem.**, v.74, p.5383-5392, 2002.

KELLY-FALCOZ, F. et al. Galactose oxidase: studies on the structure and role of disulfide linkages. **The Journal of Biological Chemistry**, v.240, n.7, p.2966-1970, 1965.

KHALILI, Elham et al. Biological control of rice brown spot with natives isolates of three *Trichoderma* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.1, p.297-305, 2012.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

LARRIBA, G. et al. Yeast exoglucanases: Where redundancy implies necessity. **Arch Med Res**, v.24, p.293-299, 1993.

LEE, A. et al. The lectina riddle: glycoproteins fractionated from complex mixtures have similar glycomyc profiles. **Journal of integrative biology**, v.14, n.4, 2010.

LISBOA, Bruno Brito et al. Eficiência de *Trichoderma harzianum* e *Gliocadium viride* na região da incidência de *Botrytis cinerea* em tomateiro cultivado sob ambiente protegido. **Ciência Rural**, v.37, n.5, p.1255-1260, 2007.

LOBATO, Rubens Caurio et al. Sazonalidade e prevalência de fungos anemófilos em ambiente hospitalar no sul do Rio Grande do Sul. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, v.11, n.2, p.21-28, 2009.

LOPES, Fabyano Alvares Cardoso et al. Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fungal Biology**, v.116, n.7, p.815-824, 2012.

MACLEAN, B. et al. General framework for developing and evaluating database scoring algorithms using the TANDEM search engine. **Bioinformatics**, v.22, p.2830–2832, 2006.

MARINÕ, Karina et al. A systematic approach to protein glycosylation analysis: a path through the maze. **Nature Chemical Biology**, v.6, p.713-722, 2010.

MARTINAC, B. et al. Yeast K1 killer toxin forms ion channels in sensitive yeast spheroplasts and in artificial liposomes. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.87, n.16, p.6228-6232, 1990.

MATROUDI, S. et al. Antagonistic effects of *Trichoderma* sp. On *Sclerotinia sclerotiorum*, the causal agent of canola stem rot. **Egyptian Journal of Biology**, v.11, p.37-44, 2009.

MATTINEN, Maija-Liisa et al. Oxidation of peptides and proteins by *Trichoderma reesei* and *Agaricus bisporus* Tyrosinases. **Journal of Biotechnology**, v.133, n.3, p.395-402, 2008.

MELO S. I ; AZEVEDO L.J. Controle Biológico. **EMBRAPA**, v.1, 1998.

MERGULHÃO, Adália Cavalcanti do Espírito Santo. **Aspectos ecológicos e moleculares de fungos micorrízicos arbusculares**. Recife, PE. Originalmente apresentada como tese de doutorado, Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, 2006.

MEROPS. **The peptide database**. Disponível em: <<https://merops.sanger.ac.uk/>>. Acesso em: Dez/2015.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p.426-428, 1959.

MOLECULAR PROBES. **Pro-Q® Emerald 488 glycoprotein gel stain kit with SYPRO® Ruby protein gel stain (P21855)**. Product Information, 2007.

MONTEIRO, Valdirene Neves; ULHOA, Cirano José. Biochemical characterization of a beta-1,3-glucanase from *Trichoderma koningii* induced by cell wall of *Rhizoctonia solani*. **Current Microbiology**, v.52, n.5, p.92-96, 2006.

MONTEIRO, Valdirene Neves et al. New insights in *Trichoderma harzianum* antagonism of fungal plant pathogens by secreted protein analysis. **Current Microbiology**, v.61, n.4, p.298-305, 2010.

MUTHUKUMAR, A. et al. Exploitation of *Trichoderma* species on the growth of *Pythium aphanidermatum* in Chili. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.42, p.1598-1607, 2011.

NASCIMENTO, Katarina Botelho de Melo et al. Utilização de resíduos agroindustriais para produção de tanase por *Aspergillus* sp. isolado do soloda caatinga de Pernambuco, Brasil. **Exacta**, v.7, n.1, p.95-103, 2014.

NASCIMENTO, Marília da Silva. **Avaliação das propriedades inflamatórias de polissacarídeos do fungo *Scleroderma nitidum***. Natal, RN. Apresentada originalmente como dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Departamento de Bioquímica, 2010.

NESVIZHSKII, A. I. et al. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. **Anal.Chem.**,v.75, p.4646-4658, 2003.

NOMBELA, C. et al. Yeast β -glucanases: a complex system of secreted enzymes. **Microbiology Science**,v.5, p.328-332, 1988.

OHTSUBO, Kazuaki; MARTH, Jamey D. Glycosylation in cellular mechanisms of health and diseases. **Cell**, v.126, n.5, p.855-867, 2006.

OHYAMA, Yuji et al. Frontal affinity chromatography of ovalbumin glycoasparagines on a concavalin A-sepharose column. **The Journal of Biological Chemistry**, v.260, n.11, p.6882-6887, 1985.

ONGAY, Sara et al. Glycopeptide enrichment and separation for protein glycosylation analysis. **J. Sep. Sci.**, v.35, p.2341-2372, 2012.

PEREIRA, Aline Lira et al. Sorologia da Paracoccidioidomicose. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.9, n.3, p.29-44, 2012.

PEREIRA, Cícero Donizete et al. Teor de glomalina e número de esporos de fungos micorrízicos arbusculares em áreas de matas ripárias degradadas do Distrito Federal. In: **Fetbio 2012**, 2012, Maceió, Alagoas.

PEREIRA, Jaqueline L. et al. Analysis of *Phaseolus vulgaris* response to its association with *Trichoderma harzianum* (ALL-42) in the presence or absence of the phytopathogenic fungi *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani*. **Plos One**, v.9, n.5, 1-23, 2014.

PERES, E.; MELO, I.S. Variabilidade de isolados de *Trichoderma harzianum* – Aspectos citológicos. **Science Agroculture**, v.52, n.1, p.56-59, 1995.

PINTO, M.R. et al. Glycoconjugates and polysaccharides of fungal cell wall and activation of immune sistem. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p.195-208, 2008.

POLIZELI, M. et al. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.67, p.577-591, 2005.

POURCQ, Karen De et al. Engineering of glycosylation in yeast and other fungi: current states and perspectives. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.87, p.1617-1631, 2010.

QUALHATO, T.F. et al. Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathogenic fungi: evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. **Biotechnology Letters**, v.35, n.9, p.1461-1468, 2013.

QUEIROZ, Jean César Farias de. **Análise genotípica da linhagem RT2 de *Aspergillus nidulans* e caracterização de sua glicoproteína antiinflamatória**. São Paulo, SP. Originalmente apresentada como tese de doutorado, Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, IPT, 2007.

RAMADA, M.H. et al. Secretome analysis of the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum* ALL-42 cultivated in different media supplemented with *Fusarium solani* cell wall or glucose. **Proteomics**, v.3, 2015.

RIFAI, M. A. A revision of the genus *Trichoderma*. **Mycol Pap**, v.116, p.1-56, 1969.

RILLIG, Mathias C. Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. **Canadian Journal of Soil Science**, v.84, p.355-363, 2004.

RODRIGUES, G. B.; MALTONI, K. L.; CASSIOLATO, A. M. R. Dinâmica da regeneração do subsolo de áreas degradadas dentro do bioma Cerrado. *Agriambi*, Campina Grande, v. 11, p. 73-80, 2007.

RUIZ-HERRERA, J. Fungal Cell Wall: Structure, Synthesis, and Assembly. 1. Ed. **CRC Press**, p.248, 1992.

SABA, H. et al. *Trichoderma* – a promising plant growth stimulator and biocontrol agent. **Mycosphere**, v.3, n.4, p.524-531, 2014.

SAMUELS, G. J. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. **Mycol. Res**, v.100, n.8, p.923-935, 1996.

SAMUELS, G. J. *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology. **Phytopathology**, v.96, n.2, p.195-206, 2006.

SANTOS FILHO, Teodoro Gomes dos. **Isolamento de glicoproteínas através de cromatografia por afinidade em colunas contendo lectinas imobilizadas**. Recife, PE. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, 2001.

SANTOS, Diego Wagner dos; WAGNER, Ricardo. Caracterização química parcial de polissacarídeos da parede celular de *Fusarium subglutinans*. **Cadernos da Escola de Saúde**, v.3, p.1-13, 2010.

SANTOS, Rodrigo da Silva et al. Caracterização imunológica da proteína recombinante gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase do patógeno humano *Paracoccidioides brasiliensis*. **Revista Saúde e Biologia**, v.7, n.2, p.35-45, 2012.

SARAH, G.; ZEECE, M. G.; PENHEITER, A. R. Protease assay methods. In: BEYNON, R.; BOND, J. S. *Proteolytic Enzymes: A Practical Approach*. 2^a ed. Ed. Oxford University Press. 340 p. 2001.

SCHIRMBÖCK, M. et al. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. **Appl Environ Microbiol**, v.60, n.12, p.4364-4370, 1994.

SCHUSTER, André; SCHMOOL, Monika. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.87, p.787-799, 2010.

SELINHEIRO, Emília et al. Comparison of the characteristics of fungal and plant tyrosinases. **Journal of Biotechnology**, v.130, n.4, p.471-480, 2007.

SELINHEIMO, Emília et al. Comparison of substrate specificity of tyrosinases from *Trichoderma reesei* and *Agaricus bisporus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.44, n.1, p.1-10, 2009.

SHARMA, Vivek et al. Chitinase expression due to reduction in fusaric acid level in an antagonistic *Trichoderma harzianum* S17TH. **Indian Journal of Microbiology**, v.53, p.214-220, 2013.

SILVA, B.D. et al. Potencial fungal inhibition by immobilized hydrolytic enzymes from *Trichoderma asperellum*. **J Agric Food Chem**, v.59, n.15, p.8148-8154, 2011.

SIPPERT, Emília Ângela et al. Extração de glicoproteínas da parede celular de *Candida albicans* com líquido de coca. In: **XIX Encontro Anual de Iniciação Científica – EAIC**, 2010, Guarapuava, Paraná.

SMITH, P.K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Anal. Biochem.**, v.150, n.1, p.76-85, 1985.

SOARES, M.B. et al. *Artocarpus integrifolia* lectin(s): use and applications in chromosome studies of lymphocyte cultures. **Citobios**, v.34, n.135-136, p.165-174, 1982.

SOUZA, Aline Francisca; ROSADO, Fábio Rogério. Utilização de fungos basidiomicetes em biodegradação de efluentes têxteis. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v.2, n.1, p.121-139, 2009.

SPIRO, Robert G. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implication of glycopeptide bonds. **Glycobiology**, v.12, n.4, p.43R-56R, 2002.

STAVENHAGEN, Kathrin et al. Clinical glycomics employing graphitized carbon liquid chromatography – Mass spectrometry. **Chromatographia**, v.78, p.307-320, 2015.

STEINDORFF, Andrei Stecca et al. Identification of mycoparasitism-related genes against the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum* through transcriptome and expression profile analysis in *Trichoderma harzianum*. **BMC Genomic**, v.15, p.1-14, 2014.

STUBBS, Hilary J. et al. Hydrolase and transferase activities of the β -1,3-exoglucanase of *Candida albicans*. **Eur J Biochem.**, v.263, p.889-895, 2015.

TROIAN, Rogério Fraga et al. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* against *Sclerotinia sclerotiorum*: evaluation of antagonismo and expression of cell wall-degrading enzymes genes. **Biotechnology Letter**, v.36, n.10, p.2095-2101, 2014.

VALKONEN, M. Functional studies of secretory pathways in filamentous fungi: the effect of unfolded protein response on protein production. **Espoo 2003. VTT publications 505**: 114p, 2003.

VIEIRA, Pabline Marinho et al. Identification of differentially expressed genes from *Trichoderma harzianum* during growth on cell wall of *Fusarium solani* as a tool for biotechnological application. **BMC Genomics**, v.14, p.177-188, 2013.

VINALE, F. et al. Application of *Trichoderma harzianum* (T22) and *Trichoderma atroviride* (P1) as plant growth promoters, and their compatibility with copper oxychloride. **Journal of Zhejiang University Science**, v. 30, p.2-8. 2004.

VINALE, Francesco et al. A novel fungal metabolite with beneficial properties for agricultural applications. **Molecules**, v.19, p.9760-9772, 2014.

VITERBO, A. et al., Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. **Antonie von Leewenhoek**, v.81, p.549-556, 2002.

VOET, D.; VOET, J.G. **Bioquímica**.4.ed. Artmed: São Paulo, 2013.

WATANABE, Renata Alberto de Moraes et al. Tratamento do efluente da indústria farmacêutica com os fungos selecionados: *Pycnoporus sanguineus* e *Trametes versicolor*. In: CONGRESSO DE PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO DA UFG - CONPEEX, 3., 2006, Goiânia. **Anais eletrônicos do XIV Seminário de Iniciação Científica**, Goiânia: UFG, 2006.

WEINDLING, R. Studies on lethal principles effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. **Phytopathology**, v.24, p.1153-1179, 1934.

WITKOWSKA, D.; MAJ, A. Production of lytic enzymes by *Trichoderma* spp. and their effect on the growth of phytopathogenic fungi. **Folia Microbiol (Praha)**,v.47, n.3, p.279-282, 2002.

WOHLGEMUTH, Jessica et al. Quantitative site-specific analysis of protein glycosylation by LC-MS using different glycopeptide-enrichment strategies. **Analytical Biochemistry**, v.395, p.178-188, 2009.

YAO, Jian et al. Production, characterization and applications of tannase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.101, p.137-147, 2014.

ZEMBEC, P. et al. Elevated activity of dolichyl phosphate mannosyl transferase enhances biocontrol abilities of *Trichoderma atroviride*. **Mol Plant Microbe Interact.**,v.24, n.12, p.1522-1529, 2011.

ZHANG, Fengge et al. *Fusarium oxysporum* induces the production of proteins and volatile organic compounds by *Trichoderma harzianum* T-E5. **FEMS Microbiology Letters**, v.359, p.116-123, 2014.