

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Atividade anti-*Trichomonas vaginalis* de moléculas produzidas por
basidiomicetos**

MARIANA DUARTE

PORTO ALEGRE, 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Atividade anti-*Trichomonas vaginalis* de moléculas produzidas por
basidiomicetos**

Dissertação apresentada por **Mariana
Duarte** para obtenção do GRAU DE
MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Alexandre José Macedo

Co-orientador: Prof. Dr. Tiana Tasca

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível Mestrado, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 24.03.2011, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa Dr. Ana Cristina Arámburu da Silva
Pontifícia Universidade Católica do Rio grande do Sul

Profa Dr. Gilsane Lino Von Poser
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof Dr. Mauro Steindel
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa Dr. Patrícia Valente da Silva
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

D812a Duarte, Mariana

Atividade anti-trichomonas vaginalis de moléculas produzidas por basidiomicetos / Mariana Duarte. – Porto Alegre: UFRGS, 2011. –xx, 117 p.: il.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Trichomonas vaginalis. 2. Amauroderma camerarium. 3. Gymnopilus pampeanus. 4. Cogumelos bioativos. 4. Atividade antiparasitária. 5. Basidiomycota. I. Macedo, Alexandre José. II. Tasca, Tiana. III. Título.

CDU:582.284:615.28

Bibliotecárias responsáveis:

Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira, CRB 10/480

Heloísa do Canto Canabarro, CRB 10/1036

Agradecimentos ao CNPq, órgão que financiou a bolsa de estudos para o desenvolvimento deste trabalho, ao Laboratório de Pesquisa em Parasitologia da Faculdade de Farmácia, ao Laboratório de Tecnologia Bioquímica da Faculdade de Farmácia e ao Laboratório de Peptídeos e Enzimas Proteolíticas do Centro de Biotecnologia, pertencentes a esta Universidade, que disponibilizaram os equipamentos e materiais necessários para a realização dos experimentos práticos na elaboração da presente dissertação

*Ao Cesar e à Liseli,
que em nenhum momento mediram esforços
para realização dos meus sonhos,
que me guiaram pelos caminhos corretos,
me ensinaram a fazer as melhores escolhas,
me mostraram que a honestidade e o respeito
são essenciais à vida,
e que devemos sempre lutar pelo que queremos.
A eles devo a pessoa que me tornei
e os conhecimentos que adquiri
e tenho muito orgulho por
chamá-los de pai e mãe.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Dr. Alexandre José Macedo, pela oportunidade de realização do mestrado. Muito obrigada pelo convívio e confiança depositada em mim, pelo “chefe” que és, pelos conhecimentos que me foram passados e pela amizade. Será sempre um exemplo de pessoa e de profissional.

À Professora Dr. Tiana Tasca, por ter acreditado em mim e aberto as portas do laboratório e da vida para a realização do mestrado. Muito obrigada pela confiança, entusiasmo e pelos exemplos de motivação, amizade e perseverança. Ao Alexandre e à Tiana, considero ter sorte de ter tido dois orientadores e não um orientador e uma co-orientadora. Agradeço a dedicação, doação, suporte imediato e a liberdade que me deram para realizar essa dissertação.

Ao Professor Dr. Carlos Termignoni, por disponibilizar o Laboratório de Peptidases do Centro de Biotecnologia da UFRGS para a realização de purificação e identificação de proteínas.

Ao Professor Dr. Itabajara Vaz da Silva Junior, por disponibilizar o Laboratório de Imunologia Aplicada à Saúde Animal para desenvolver parte dos experimentos deste trabalho.

Ao Professor Dr. Charley Christian Staats, pelo auxílio nas análises de proteína.

À Adriana Seixas, pelo auxílio nas purificações e espectrometria de massas, sem o qual seria impraticável o desenvolvimento dessas etapas. Muito obrigada pelo carinho, pelos conhecimentos transmitidos e pelo convívio. Eles foram essenciais para o direcionamento da minha vida acadêmica.

Ao pessoal do Laboratório de Pesquisa em Parasitologia da UFRGS, em especial à Raquel Giordani pelo estímulo, persistência e calma transmitida. Obrigada pela parceria pessoal e profissional, pelo exemplo de pesquisadora que és pra mim e pela amizade que conquistamos. À Amanda Piccoli Frasson pelo auxílio nos ensaios de imunomodulação. Muito obrigada pelo grande carinho, pela disponibilidade, pelos momentos de descontração e por dividirmos as angústias que existem no caminho da realização do mestrado. À Patricia Vieira, à Marina Weizenmann, à Clara Lia Brandelli, à Camila Dorneles, à Muriel Barros, à Dejoara Zvoboda e ao Nicolás Silva, pela convivência no laboratório, momentos de descontração, pela ajuda sempre que necessária e por serem meus amigos.

Ao pessoal do laboratório 217 do Centro de Biotecnologia da UFRGS, em especial ao Igor Stelmach Pessi e à Marina Scopel, pelo suporte e carinho incondicionais. Agradeço pela verdadeira amizade, pelos momentos alegres, risos e pelo convívio que tornaram a realização dessa dissertação mais leve e gratificante. Obrigada por estarem comigo nesse momento. Ao Lucas Tirloni, à Danielle Trentin, à Karine Zimmer, à Janine Treter, ao Lucas Dedavid e Silva e à Susana Elias pela ajuda diária no laboratório, pelo suporte, pelas conversas e momentos de diversão.

Aos meus pais, Cesar e Liseli, pelos exemplos de doçura e firmeza, de profissionalismo e calma. Muito obrigada pelo amor, carinho e educação que me foram dados, pela paciência, pela presença e pelo apoio.

À minha irmã Marina pelo carinho e amizade, pelas palavras de incentivo e compreensão, pelos exemplos de perseverança, de amor e de doação profissional.

“Renda-se, como eu me rendi. Mergulhe no que você não conhece como eu mergulhei. Não se preocupe em entender, viver ultrapassa qualquer entendimento.”

Clarice Lispector

RESUMO

O protozoário flagelado, *Trichomonas vaginalis*, causa a tricomonose, a doença sexualmente transmissível (DST) não viral mais comum no mundo. Metronidazol e tinidazol são os dois fármacos de escolha recomendados pelo *Food and Drug Administration* (FDA, USA) para o tratamento da tricomonose humana. Entretanto, isolados de *T. vaginalis* clínicos ou laboratoriais resistentes e reações adversas comuns têm sido reportados. Sabe-se que fungos produzem moléculas bioativas podendo ser uma fonte em potencial de novas moléculas antiparasitárias, sendo assim, a busca por compostos naturais bioativos em basidiomicetos pode ser uma abordagem interessante para descoberta de fármacos alternativos. O objetivo desse estudo foi investigar a presença, purificar e identificar substâncias com atividade anti-*Trichomonas* no meio de cultivo de micélios de basidiomicetos. Para a obtenção dos compostos bioativos, os basidiomicetos *Amauroderma camerarium*, família Ganodermataceae, e *Gymnopilus pampeanus*, família Cortinariceae, foram cultivados em meio caldo extrato de malte (CEM) com variação da fonte de nitrogênio e tempo de cultivo. O extrato bruto com maior atividade anti-*T. vaginalis* para *A. camerarium* (CEM + KNO₃ 28 dias de cultivo) foi escolhido para ensaios de purificação e caracterização, que indicaram que o composto bioativo é de natureza protéica. Uma proteína sem alta identidade com outra proteína foi purificada e foi denominada amaurocina. Amaurocina apresenta atividade contra isolados clínicos de *T. vaginalis* – TV LACH1 e TV LACM2 – (CIM= 62,4 µg/mL), sendo um isolado resistente ao metronidazol (TV LACM2), e contra o isolado ATCC 30236 (CIM= 31,2 µg/mL). A Amaurocina também apresenta atividade pró-inflamatória por induzir aumento da liberação de óxido nítrico de neutrófilos, o qual é um importante mecanismo de defesa do hospedeiro durante a infecção parasitária. Para *G. pampeanus*, os extratos mais ativos foram produzidos em meio CEM + KNO₃ por 28 dias de cultivo e CEM + KNO₃ por 21 dias de cultivo, porém a purificação desses extratos é necessária. Esses resultados estão em concordância com o alto potencial de produção de biocompostos dos basidiomicetos, o qual tem sido reportado na literatura por décadas.

Palavras-chaves: *Trichomonas vaginalis*, *Amauroderma camerarium*, *Gymnopilus pampeanus*, compostos antiparasitários, cogumelos bioativos.

ABSTRACT

The flagellated protozoan, *Trichomonas vaginalis*, causes trichomonosis, the most common non-viral sexual transmitted disease (STD) in the world. Metronidazole and tinidazole are two drugs of choice recommended by Food and Drug Administration (FDA, USA) for treatment of human trichomonosis. However, clinical or laboratory-generated drug-resistant isolates of *T. vaginalis* and common adverse reactions have been reported. It is known that fungi produce bioactive molecules and they can be a potential source of new antiparasitic molecules. Thus, in order to improve the current chemotherapy of *T. vaginalis* infection, the search for natural bioactive compounds in basidiomycetes can be an interesting approach to discover alternative drugs. The aim of this study was to investigate the presence, to purify and to identify substances in cultivation of basidiomycetes' mycelia, which have anti-*Trichomonas* activity. Mycelia of basidiomycete *Amauroderma camerarium*, family Ganodermataceae, and *Gymnopilus pampeanus*, family Cortinariaceae, were transferred to flasks containing malt extract broth (MEB) medium with variation of the nitrogen source and time of growth. The preparation with higher anti-*T. vaginalis* activity (MEB + KNO₃ 28 days of growth) for *A. camerarium* basidiomycete was chosen for purification and characterization assays, that indicated that the bioactive compound is a protein-like molecule. A protein without high homology with any other protein was found and was named amaurocine. Amaurocine presents activity against clinical isolates of *T. vaginalis* – TV LACH1 and TV LACM2 – (MIC=62.4 µg/mL), one of these a metronidazole-resistant isolate, and it presents activity against the *T. vaginalis* ATCC 30236 isolate (MIC=31.2 µg/mL). Amaurocine also presents proinflammatory activity. Since it was able to enhance nitric oxide release from neutrophils, which is an important host defense mechanism during the parasitic infection. For *G. pampeanus*, the most active extracts were produced in MEB + KNO₃ 28 days of growth and MEB + KNO₃ 21 days of growth, but further steps of purification are necessary. These results are in agreement with the high potential of biocompounds production of basidiomycetes that has been reported in the literature for decades.

Keywords: *Trichomonas vaginalis*, *Amauroderma camerarium*, *Gymnopilus pampeanus*, antiparasitic compounds, bioactive mushroom.

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO GERAL

Tabela 1.1: Atividade antiparasitária de substâncias bioativas produzidas por basidiomicetos.....	5
Tabela 1.2: Atividade imunomodulatória de substâncias bioativas produzidas por basidiomicetos.....	8
Tabela 1.3: Atividades diversas de substâncias bioativas produzidas por basidiomicetos.....	12

CAPÍTULO 1

Tabela 3.1.1: Variação do cultivo de <i>A. camerarium</i>	31
Tabela 3.1.2: Variação do cultivo de <i>G. pampeanus</i>	31

CAPÍTULO 2

Table 1: Peptide sequences from amaurocine resulting of MS/MS analysis....	61
Table 2: Minimal inhibitory concentration of amaurocine and metronidazole in <i>T. vaginalis</i> isolates.	62

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1.1: <i>Amauroderma</i> sp.	14
Figura 1.2: <i>Gymnopilus pampeanus</i>	16

CAPÍTULO 1

Figura 3.1.1: Crescimento de micélios de <i>A. camerarium</i>	30
Figura 3.1.2: Rastreamento de atividade anti- <i>T. vaginalis</i> de extratos aquosos de cultivo de <i>A. camerarium</i>	33
Figura 3.1.3: Rastreamento de atividade anti- <i>T. vaginalis</i> de extratos de cultivo de <i>G. pampeanus</i>	34

CAPÍTULO 2

Figure 1: Activity of <i>A. camerarium</i> extracts against <i>T. vaginalis</i> ATCC 30236 trophozoites.....	57
Figure 2: Overlay plot of the analytical chromatogram of ion-exchange and gel filtration chromatography and the percent inhibition of <i>T. vaginalis</i> grow....	58
Figure 3: SDS-PAGE silver stained of the fraction after the gel-filtration chromatography.....	59
Figure 4: NO release of neutrophils, NO release of neutrophils in the presence of <i>T. vaginalis</i> and neutrophils treated with amaurocine.....	60

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1. Produtos naturais como fonte de novos fármacos.....	3
1.2. Atividades biológicas de basidiomicetos.....	4
1.2.1. Atividade antiparasitária.....	5
1.2.2. Atividade Imunomodulatória.....	7
1.2.3. Outras atividades.....	11
1.3. Atividades biológicas do gênero <i>Amauroderma</i>	14
1.4. Atividades biológicas do gênero <i>Gymnopilus</i>	15
1.5. Tricomonose.....	16
1.5.1. Resposta Imunológica na Tricomonose.....	18
2. OBJETIVOS	21
2.1. Objetivo geral.....	23
2.2. Objetivos específicos.....	23
3. CAPÍTULOS	25
3.1 CAPÍTULO 1: Rastreamento de moléculas com atividade anti-<i>T. vaginalis</i> produzidas por basidiomicetos	27
3.1.1. Introdução	29
3.1.2. Materiais e Métodos	29
3.1.2.1. Culturas dos basidiomicetos.....	29
3.1.2.2. Cultivo <i>in vitro</i> de <i>T. vaginalis</i>	30
3.1.2.3. Produção de substâncias bioativas: <i>A. camerarium</i> e <i>G. pampeanus</i>	30
3.1.2.4. Teste da atividade anti- <i>Trichomonas</i> dos extratos em microplaca.....	32
3.1.3. Resultados e Discussão	32

<p>3.2. CAPÍTULO 2: <u>Mariana Duarte</u>, Adriana Seixas, Maira Peres de Carvalho, Geraldo Attilio De Carli, Carlos Termignoni, Tiana Tasca, Alexandre José Macedo. Amaurocine: a proinflammatory and anti-<i>Trichomonas vaginalis</i> protein produced by the basidiomycete <i>Amauroderma camerarium</i> Antimicrobial Agents and Chemotherapy (submetido).....</p>	35
4. DISCUSSÃO GERAL	63
5. CONCLUSÕES	69
6. PERSPECTIVAS	73
7. REFERÊNCIAS	77
8. ANEXOS	91
8.1. Anexo 1	93
8.2. Anexo 2.....	107

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Produtos naturais como fonte de novos fármacos

Desde os primórdios da medicina humana, os médicos têm contado com compostos químicos produzidos por animais, plantas e microrganismos, para tratar diversas doenças (Koehn & Carter, 2009). Produtos naturais são definidos como compostos com atividades biológicas derivados de fontes naturais e historicamente vêm sendo utilizados por indústrias farmacêuticas para produção de novos fármacos. A maioria dos novos fármacos tem sido gerada a partir de produtos naturais e a partir de compostos derivados de produtos naturais (Li & Vederas, 2009).

Os produtos naturais são diretamente ou indiretamente responsáveis por metade dos fármacos em uso. Dos 877 novos fármacos introduzidos no mercado entre 1981 e 2002, 49% são produtos naturais ou análogos de produtos naturais (Newman et al., 2003). Antibióticos (por exemplo, penicilina, tetraciclina, eritromicina), antiparasitários (ivermectina), antimaláricos (quinina, artemisinina), agentes controladores de lipídios (lovastatina e análogos), imunossupressores (ciclosporinas) e fármacos anticâncer (taxol, doxorrubicina) revolucionaram a medicina. A expectativa de vida em muitos lugares do mundo aumentou de 40 anos, no início do século 20, para 77 anos, atualmente (Li & Vederas, 2009).

Embora a expansão da química medicinal sintética nos anos 1990 tenha diminuído a proporção de novos fármacos baseados em produtos naturais para aproximadamente 50%, 13 fármacos derivados de produtos naturais foram aprovados nos Estados Unidos entre 2005 e 2007, com cinco deles sendo os primeiros membros de uma nova classe (Harvey, 2008). Por outro lado, a pesquisa com doenças infecciosas, uma área tradicional e sólida para produtos naturais (Projan, 2003) tem recebido menor interesse (Koehn & Carter, 2009). Entretanto, recentemente as indústrias farmacêuticas têm avaliado a produtividade do setor de Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) e questões têm sido propostas em relação ao impacto positivo da produtividade da estratégia de *High-Throughput Screening*. Estas questões têm despertado o apreço renovado pelos atributos únicos de moléculas que são ou foram derivadas de origem natural e levaram à pesquisa de novas táticas e estratégias para explorá-las (Koehn & Carter, 2009). Felizmente, novas tecnologias em espectrometria de

massas, ressonância magnética nuclear (RMN) e outras técnicas espectroscópicas podem facilitar enormemente os primeiros passos do processo, desenvolvendo bibliotecas de alta qualidade de produtos naturais, tanto de origem microbiana, vegetal, marinha ou outros. Tais bibliotecas são de grande importância para o sucesso de rastreamento e a busca por novos fármacos (Koehn, 2008).

Os microrganismos têm sido fontes da maioria dos fármacos em uso atualmente (Demain & Sanchez, 2009). Entre estes, 45% são produzidos por actinomicetos, 38% por fungos e 17% por bactérias (Berdy, 2005). Um exemplo de substâncias com propriedades bioativas produzidas por microrganismos são as bacteriocinas. Bacteriocinas pertencem a um grupo heterogêneo de peptídeos e proteínas sintetizados por bactérias produtoras de ácido láctico (LAB), que apresentam atividade antimicrobiana contra outras bactérias (Klaenhammer, 1993). Muito se investiu na pesquisa em LAB-bacteriocinas, primeiramente devido ao potencial de aplicação como biopreservantes em alimentos capazes de inibir o crescimento de bactérias patogênicas, especialmente *Listeria monocytogenes*. Como resultado, um grande número de bacteriocinas têm sido identificadas e caracterizadas (Cintas et al., 2001).

Esqueletos químicos completamente novos continuam a ser descobertos entre produtos naturais de origem microbiana (Newman & Cragg, 2007), sendo dessa forma, importantes alternativas para o tratamento de diversas doenças ou na busca de moléculas com atividades biológicas diversas.

1.2. Atividades biológicas de basidiomicetos

Os fungos representam uma fonte rica de metabólitos secundários e macromoléculas bioativos com ampla variedade de aplicação, como agentes antimicrobianos, imunossupressores, antiparasitários e antitumorais (Wasser & Weiss 1999; Zaidman et al., 2005). Os fungos basidiomicetos ocorrem na maior parte dos ecossistemas terrestres e produzem diversas substâncias como terpenos, esteróides, gamapironas e ácidos fenólicos que apresentam atividade biológica, além de proteínas e polissacarídeos de importância medicinal.

Substâncias de basidiomicetos macroscópicos, também conhecidos como cogumelos, com atividade antitumoral, imunomodulatória, cardiovascular, antiviral, antibacteriana e antiparasitária já foram isoladas e identificadas (Wasse & Weiss, 1999).

1.2.1. Atividade antiparasitária

Dentre as diversas atividades biológicas que as substâncias isoladas de basidiomicetos podem apresentar, também são relatados compostos com atividade antiparasitária (Tabela 1.1).

O cogumelo *Pleurotus ostreatus* é bastante conhecido por predação de helmintos nematóides, entretanto pouco se sabe sobre o mecanismo dessa atividade predatória. Sendo assim, Satou e colaboradores (2008) investigaram a relação predatória entre *P. ostreatus* e nematoides de vida livre (Diplogastridae). O mecanismo descrito aponta que no momento em que o nematoide invade o cogumelo, *P. ostreatus* se defende produzindo metabólitos que causam a diminuição do tamanho da cabeça do helminto. O mecanismo anti-nematóide de redução do tamanho da cabeça é associado com a atividade paralítica de peróxidos derivados de ácido linoleico que são liberados pelo basidiomiceto.

Tabela 1.1: Atividade antiparasitária de substâncias bioativas produzidas por basidiomicetos

Basidiomiceto	Classe	Molécula	Atividade	Referência
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Peróxido	derivados de ácido linoleico	anti-nematóide (Diplogastridae)	Satou et al., 2008
<i>Merulius incarnatus</i>		5-heptadeca-8'Z,11'Z,16-trienilresorcinol	anti- <i>Leishmania</i>	Jin & Zjawiony, 2006
<i>Ganoderma lucidum</i>	Lanostano		anti- <i>Plasmodium</i>	Adams et al., 2010
<i>Lentinus edodes</i>	(1-3)-beta-glicano	lentinano	anti- <i>Plasmodium yoelii</i> ; próinflamatória	Zhou et al., 2009
<i>Lentinus strigosus</i>	Sesquiterpenoide triquinano	hipnofilina	anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> , imunomodulatória	Cota et al., 2008

Um composto isolado do cogumelo *Merulius incarnatus*, 5-heptadeca-8'Z,11'Z,16-trienilresorcinol, apresentou atividade anti-*Leishmania*. Este composto apresentou valor de concentração inibitória 50%(IC₅₀)=3,6 µg/mL e

não demonstrou citotoxicidade contra células Vero em concentrações acima de 25 µg/mL (Jin & Zjawiony, 2006). Em um rastreamento recente com 880 extratos de plantas e fungos e foi encontrada atividade contra *Plasmodium* sp., apresentando 79% de inibição na presença de extrato de acetato de etila de *Ganoderma lucidum*, na concentração de 4,9 µg/mL. Após purificação foram identificados sete lanostanos, que apresentaram atividade anti-*Plasmodium*, variando a concentração de 6,0 a 20 µM (Adams et al., 2010). Em outro estudo foram avaliados os efeitos imunomodulatórios do lentinano ((1-3)-beta-glicano derivado do cogumelo *Lentinus edodes*), resultando em atividade antiparasitária, durante o estágio sanguíneo da infecção por *Plasmodium yoelii*. O pré-tratamento de camundongos com lentinano diminuiu significativamente a parasitemia e aumentou a taxa de sobrevivência após a infecção. O aumento da produção de interleucina (IL)-12, interferon (INF)- γ e óxido nítrico (NO) induzido pelo lentinano em células esplênicas de camundongos infectados revelaram que a resposta imunológica de linfócitos T *helper* (Th) 1 foi estimulada contra a infecção por malária. Tanto *in vitro* como *in vivo*, lentinano demonstrou aumentar a expressão do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe II, *cluster of differentiation* (CD)80/CD86 e receptores *Toll-like* (TLR), além de aumentar a produção de IL-12 em células dendríticas de baço co-cultivadas com hemácias parasitadas. O número de células regulatórias CD4(+)CD25(+) e os níveis de IL-10 secretadas por essas células foram reduzidos pelo pré-tratamento com lentinano em camundongos infectados por malária. Dessa forma, lentinano é capaz de induzir resposta Th1 protetora para controlar a proliferação de parasitos da malária durante o estágio sanguíneo da infecção por *P. yoelii* através da capacidade de estimular a maturação de células dendríticas e inibir a regulação negativa de resposta imune Th1 pelas células reguladoras. Associando-se esses resultados é possível sugerir que lentinano possui potencial profilático para o tratamento da malária (Zhou et al., 2009).

O fungo *Lentinus strigosus* foi selecionado em um rastreamento para atividade inibitória da tripanotona redutase de *Trypanosoma cruzi*. O extrato bruto de *L. strigosus* foi capaz de inibir completamente a enzima na concentração de 20 µg/mL. Dois sesquiterpenoides triquinanos e dois derivados de panepoxidol foram isolados através de ensaio bioguiado e hipnofilina e

panepoxidona apresentaram valores de IC₅₀ de 0,8 µM e 38,9 µM no ensaio para a tripanotona redutase, respectivamente, enquanto que os outros dois compostos foram inativos. A atividade de hipnofilina foi confirmada em um ensaio contra a forma de *T. cruzi* de amastigotas intracelulares, que apresentou valor de IC₅₀ de 2,5 µM. Além disso, foi demonstrado que hipnofilina na concentração de 4,0 µM também reduz a proliferação de células mononucleares de sangue periférico humano, sem interferência aparente na viabilidade de linfócitos e monócitos. A resposta imunológica do hospedeiro desempenha um papel importante nos eventos adversos devido à liberação de antígenos durante o tratamento com fármacos tripanocidas. Assim, a habilidade da hipnofilina em matar formas intracelulares de *T. cruzi* enquanto modula a proliferação de células mononucleares de sangue periférico sugere que este terpenoide pode ser um protótipo promissor para o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos contra a doença de Chagas (Cota et al., 2008).

1.2.2. Atividade Imunomodulatória

Está bem estabelecido que muitos compostos extraídos de cogumelos são comumente usados como imunomoduladores ou como modificadores da resposta biológica (Tabela 1.2). A estratégia básica da imunomodulação é identificar aspectos da resposta imunológica que pode ser aumentada ou suprimida de alguma forma, com o objetivo de aumentar ou complementar uma resposta imunológica desejada. O conhecimento de componentes específicos das redes de citocinas e vias de sinalização e seus papéis na regulação da resposta imune são importantes no planejamento de estratégias para aumentar estas respostas (Zaidman et al., 2005).

Nos últimos anos, muitos pesquisadores têm discutido a possibilidade de extratos e metabólitos isolados de cogumelos possuírem atividade estimulante ou supressora de componentes do sistema imunológico. Estes metabólitos que parecem estimular a resposta imunológica humana estão sendo procurados para a utilização no tratamento de câncer, imunodeficiência ou imunodepressão generalizada, juntamente com o tratamento farmacológico, combinados com a

terapia antibiótica ou como adjuvantes para vacinas. Aqueles metabólitos com atividade imunossupressora são fármacos em potencial para o tratamento de doenças autoimunes (Lull et al., 2005).

Tabela 1.2: Atividade imunomodulatória de substâncias bioativas produzidas por basidiomicetos

Basidiomiceto	Classe/fração	Molécula	Atividade	Referência
<i>Lentinus edodes</i>	Polissacarídeo	Lentinano	Inibição da tumorigênese	Ig & Yap, 2002
<i>Sparassis crispa</i>	Polissacarídeo	1,6-ramificado 1,3-βD-glicano	acelera recuperação de leucócitos; imunomodulatória	Ohno et al., 2002
<i>Hypsizygus marmoreus</i> , <i>Flammulina velutipes</i> , <i>Pholiota nameko</i> e <i>Pleurotus eryngii</i>	Extratos etanólicos		Inibição da hipersensibilidade	Sano et al., 2002
<i>Proteus linteus</i>	proteoglicano		reduz severidade de artrite reumatoide diminuição da produção de IFN-γ e IFN-α	Kim et al., 2003a
<i>Agaricus blazei</i>	fração B-5 de extrato aquoso de cultura miceliar		secreção de TNF-α, IL-8 e NO em macrófagos	Sorimachi et al, 2001
<i>Grifola frondosa</i>	β-glicano	grifolano	Antitumoral	Okazaki et al., 1995
<i>Grifola frondosa</i>	Fração MD		Antitumoral	Sanzen et al., 2001
<i>Agrocybe cylindracea</i>	Peptídeo	peptídeo tipo ubiquitina	aumento da produção de NO em macrófagos	Ngai et al., 2003
<i>Tricholoma mongolicum</i>	Lectina	TML-1 TML-2	estimulam a produção de íons nitrito e TNF-α	Wang et al., 1997
<i>Phellinus linteus</i>	polissacarídeo	PL	produção de NO; atividade antitumoral	Kim et al., 2003b
<i>Phellinus linteus</i>	polissacarídeo	PL	Diminui produção de IL-2 e INF-α; aumento da apoptose celular	Kim et al., 2003c
<i>Cordyceps pruinosa</i>	extratos metanólicos		inibição de IL-1β, TNF-α, NO e PGE ₂	Kim et al., 2003

Vários metabólitos, especialmente carboidratos isolados de cogumelos, foram reportados por possuírem atividade imunomodulatória e os

polissacarídeos de alto peso molecular, a maioria deles glicanos com ramificação $\beta(1\rightarrow6)$ e ligação $\beta(1\rightarrow3)$, exibiram importante atividade antitumoral (Borchers et al., 2004). Ng e Yap (2002) encontraram que lentinano, o polissacarídeo purificado de *L. edodes*, inibiu significativamente a tumorigênese em ratos quando administrado antes da inoculação de células de linfoma. Em leucopenia induzida por ciclofosfamida, a administração via oral de uma fração polissacarídica de *Sparassis crispa* chamada de fração CA 1, que também consiste em uma fração de 1,6-ramificado 1,3- β D-glicano, acelerou a taxa de recuperação de uma variedade de tipos de leucócitos. *In vitro*, a adição de CA 1 a esplenócitos de animais tratados com ciclofosfamida resultou em um aumento significativo na produção de IL-6 e IFN- γ e, interessante, um aumento similar não foi observado em células de animais normais (Ohno et al., 2000).

O efeito da administração via oral de extratos etanólicos de quatro cogumelos diferentes também foi avaliado em um modelo de hipersensibilidade tipo IV, em que ratos foram sensibilizados pela aplicação de oxazolona na pele depilada. Extratos etanólicos de *Hypsizygus marmoreus*, *Flammulina velutipes*, *Pholiota nameko* e *Pleurotus eryngii* inibiram significativamente a hipersensibilidade induzida por oxazolona (Sano et al., 2002).

Um proteoglicano isolado de *Proteus linteus* administrado via oral em ratos machos reduziu o pico de severidade de artrite reumatoide induzida por colágeno. A administração do proteoglicano após a injeção de colágeno foi associada com a diminuição da produção de IFN- γ e IFN- α em linfonodos (Kim et al., 2003a).

O efeito dos extratos de cogumelos e metabólitos em macrófagos tem sido extensivamente estudado *in vitro* e *in vivo*. O reconhecimento de microrganismos por macrófagos e granulócitos leva à fagocitose e ativação dos fagócitos para matar os microrganismos ingeridos. O reconhecimento é mediado por receptores TLR que são específicos para diferentes componentes dos microrganismos. O receptor TLR-2 liga em lipoglicanos, TLR-4 liga em lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias, TLR-5 liga em flagelina e TLR-9 liga em nucleotídeos de citosina e guanina desmetilados adjacentes (CpG) presentes em bactérias. Como uma consequência do reconhecimento e fagocitose muitas

enzimas são ativadas, incluindo oxidases e óxido nítrico sintase induzível (iNOS), resultando em produção de intermediários reativos de oxigênio e NO (Lull et al., 2005).

A fração B-5 de extrato aquoso de cultura micelar de *Agaricus blazei* foi capaz de induzir a secreção de TNF- α e IL-8 em macrófagos, além de aumentar a produção de NO, a expressão de citocinas e da NO sintase (Sorimachi et al., 2001). Sendo assim, *A. blazei* contém componentes que ativam macrófagos contribuindo com a resposta imune.

Grifolano, um antitumoral β -glicano isolado de *Grifola frondosa* induziu a liberação de IL-1, IL-6 e TNF- α de macrófagos (Okazaki et al., 1995). O efeito da fração D de Maitake (*G. frondosa*) foi estudado quanto à liberação de NO mediada por iNOS em macrófagos, com especial referência a atividade antitumoral da fração MD contra hepatoma humano derivado de células huH-1. Esses dados sugerem que a fração MD induz iNOS que contribui pelo menos em parte com a atividade antitumoral da fração MD (Sanzen et al., 2001).

Proteínas e peptídeos de cogumelos também são conhecidos por ativarem macrófagos. Um peptídeo tipo ubiquitina isolado do corpo de frutificação do cogumelo *Agrocybe cylindracea* aumentou a produção de NO em macrófagos peritoneais murínicos com um potencial comparado ao de LPS (Ngai et al., 2003). Duas lectinas isoladas de *Tricholoma mongolicum* (TML-1 TML-2) estimularam a produção de íons nitrito e TNF- α por macrófagos em camundongos saudáveis e portadores de tumor (Wang et al., 1997).

Os isolados até agora citados apresentaram atividade próinflamatória em macrófagos, entretanto também foram isolados de basidiomicetos substâncias com atividade anti-inflamatória. PL, um polissacarídeo ácido isolado de *Phellinus linteus*, foi capaz de induzir a produção de NO e aumentar a atividade antitumoral em modelo com ratos. Tais propriedades de PL podem estar relacionadas com a habilidade de induzir produção de molécula efetora de NO com atividade tumoricida, através de proteína tirosina quinase (PTK) e proteína quinase C (PKC) (Kim et al., 2003b). Também foi examinado como PL modula a resposta de citocinas circulantes em ratos tratados com LPS. A administração de

PL *in vivo* diminuiu a produção de IL-2, INF- α em esplenócitos e aumentou a apoptose celular espontânea em macrófagos e linfócitos (Kim et al., 2003c). Em um estudo com extratos metanólicos do corpo de frutificação de *Cordyceps pruinoso* verificou-se a inibição de IL-1 β , TNF- α , NO e prostaglandina E₂ (PGE₂) *in vivo* e *in vitro*. O extrato inibiu estes mediadores inflamatórios em macrófagos murínicos estimulados por LPS por supressão gênica da expressão de IL-1 β , TNF- α , iNOS e cicloxigenase-2 através da inibição da ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B). Estes resultados indicam que extratos metanólicos de *C. pruinoso* suprimem a inflamação através da supressão da expressão gênica inflamatória dependente de NF- κ B, sugerindo que estes extratos podem ser benéficos para o tratamento do choque séptico causado por endotoxinas (Kim et al., 2003).

1.2.3. Outras atividades

A medicina tradicional pode ser utilizada como base para a busca de produtos naturais a serem utilizados no tratamento de diversas doenças (Zheng et al., 2010). O uso de produtos naturais isolados de cogumelos contra doenças infecciosas e câncer é considerado uma das alternativas da medicina moderna.

Os cogumelos medicinais têm uma longa história de uso na medicina tradicional dos chineses, russos, japoneses, coreanos, americanos e canadenses. Muitos estudos direcionados à pesquisa de moléculas bioativas derivadas de cogumelos têm sido realizados nos últimos anos, principalmente na pesquisa de novos agentes antitumorais (Tabela 1.3) (Wasse & Weiss 1999).

Em um vasto estudo utilizando 22 espécies de basidiomicetos originários do Japão, Alemanha e Vietnã, diversas substâncias foram purificadas e caracterizadas. Estes metabólitos derivados de cogumelos demonstraram diversas atividades em muitos sistemas biológicos, como atividade antimicrobiana, nematicida, inibição da produção de óxido nítrico, anti-vírus da imunodeficiência humana (HIV) e atividade antioxidante, indicando o grande potencial de biomoléculas derivadas de basidiomicetos (Quang et al., 2006)

Similarmente, investigações químicas demonstraram que *Inonotus obliquus* produz diversos metabólitos secundários incluindo compostos fenólicos, melaninas e triterpenos. Entre estes, estão compostos com atividade antioxidante, antitumoral e antiviral, além de atividade imunomodulatória. No início do século XVI, este basidiomiceto era usado de forma efetiva na medicina tradicional da Rússia e norte da Europa, com o intuito de tratar diversos tumores malignos humanos e outras doenças sem gerar efeitos tóxicos (Zheng et al., 2010).

Tabela 1.3: Atividades diversas de substâncias bioativas produzidas por basidiomicetos

Basidiomiceto	Classe	Molécula	Atividade	Referência
<i>Inonotus obliquus</i>	compostos fenólicos, melaninas, triterpenos entre outros.		antioxidante, antitumoral, antiviral e imunomodulatória.	Zheng et al., 2010
<i>Boletus edulis</i>	extratos do corpo de frutificação		antitumoral	Lucas et al., 1957
<i>Lentinus edodes</i>	polissacarídeo	Lentinano	antitumoral	Chihara et al., 1969; Chihara et al., 1970
<i>Grifola frondosa</i>	polissacarídeo	fração D (é uma molécula)	antitumoral	Adachi et al., 1987
<i>Schizophyllum commune</i>	polissacarídeo	Sizofilano	antitumoral	Komatsu et al., 1969
<i>Trametes versicolor</i>	glicoproteína	Krestina	antitumoral	Tsukagoshi et al., 1984
<i>Clitocybe clavipes</i>	benzoquinóidemacrolídico	clavilactonas A, B e C	inibição de proteína tirosina quinases	Cassinelliet al., 2000
<i>Omphalotus illudens</i> e <i>Lampteromyces japonicus</i>	sesquiterpeno	iludina S e iludina M	antibacterianas e antitumorais, porém toxicidade desfavorável em animais	Kelneret al., 1987
<i>Omphalotus illudens</i> e <i>Lampteromyces japonicus</i>	derivados de illudinas	desidroiludina M e acifulveno	toxicidade histioespecífica contra células malignas	McMorriset al., 1996
<i>Poria cocos</i>	ácido triterpênico	ácido desidroebriconico	inibição da atividade de DNA topoisomerase II	Mizushinaet al., 2004

Tanto componentes celulares dos basidiomicetos como os metabólitos secundários produzidos por estes têm demonstrado ter atividade no sistema imunológico humano e, então, poderiam ser utilizados para o tratamento de diversas doenças. Exemplo desses cogumelos são *Ganoderma applanatum* e

Agaricus sp., que têm sido aclamados por possuírem propriedades antitumorais entre outras (Wasse & Weis, 1999).

O conhecimento expandido das bases moleculares do desenvolvimento de tumores e de metástases, em conjunto com a inerente vasta diversidade estrutural de compostos encontrada em cogumelos, promove oportunidades únicas para o descobrimento de novos fármacos que têm como alvo sinais moleculares e bioquímicos que levam ao câncer (Zaidman et al., 2005). A atividade anticâncer dos basidiomicetos foi primeiramente demonstrada por Lucas et al. (1957), que utilizou extratos do corpo de frutificação de *Boletus edulis* contra linhagem de sarcoma 180 em camundongos.

Quatro preparações de cogumelos têm demonstrado eficácia clínica significativa contra tumores humanos e são usados como modificadores da resposta biológica: lentinano de *L. edodes* (Chihara et al., 1969; Chihara et al., 1970), fração D de *G. frondosa* (Adachi et al., 1987), sizofilano de *Schizophyllum commune* (Komatsu et al., 1969), krestina (peptídeo polissacarídeo) de *Trametes versicolor* (Tsukagoshi et al., 1984). Lentinano, sizofilano e krestina têm seu uso aprovado no Japão como fármacos prescritos no tratamento do câncer (Mizuno, 1999).

Outra fonte de substâncias de interesse terapêutico no tratamento do câncer é o *pool* de metabólitos secundários produzidos pelos basidiomicetos. Estas substâncias têm como origem derivados de muitos intermediários do metabolismo primário, resultantes de diversas vias metabólicas essenciais do basidiomicetos (Zaidman et al., 2005). Três benzoquinóides macrolídicos (clavilactonas A, B e C) produzidos por *Clitocybe clavipes* apresentaram atividade inibitória da proteína tirosina quinase, sendo que proteínas quinases são enzimas responsáveis pela regulação da proliferação, invasão, angiogênese e metástase da neoplasia (Cassinelli et al., 2000). Os sesquiterpenos iludina S e iludina M, isolados a partir de *Omphalotus illudens* e *Lampteromyces japonicus*, apresentam propriedades antibacterianas e antitumorais, entretanto apresentam toxicidade desfavorável em animais (Kelner et al., 1987). Derivados de iludinas apresentaram toxicidade histioespecífica contra células malignas. Entre estes estão desidroiludina M e acilfulveno (McMorris et al., 1996). Estudos posteriores

demonstraram que iludinas se comportam como agentes alquilantes de proteínas e ácido desoxirribonucleico (DNA) (McMorris et al., 2004). Nove ácidos triterpênicos tipo lanostano foram isolados de *Poria cocos*. Entre esses nove compostos, o ácido desidroebriconoico inibiu potentemente a atividade de DNA topoisomerase II ($IC_{50}=4,6 \mu M$), enquanto que os outros compostos inibiram moderadamente a atividade de DNA polimerases de mamíferos. As DNA topoisomerasas e DNA polimerases vem sendo recentemente importantes alvos celulares de intervenção química para tratamento do câncer, visto que estas são enzimas de estrita necessidade para a duplicação da informação e replicação celular (Mizushima et al., 2004).

1.3. Atividades biológicas do gênero *Amauroderma*

Amauroderma sp. (Figura 1.1) é um fungo saprofítico pertencente à família Ganodermataceae que se desenvolve em raízes ou madeiras enterradas e é encontrado em regiões tropicais e subtropicais (Herrera & Ulloa, 1998). Foi reportado como comestível por uma tribo da Amazônia venezuelana (Zent et al., 2004). Não foram encontradas na literatura propriedades medicinais referentes a este gênero, dessa forma foi realizada uma revisão focada no gênero *Ganoderma*, pertencente à mesma família que o gênero *Amauroderma*.



Figura 1.1: *Amauroderma* sp.

Basidiomicetos do gênero *Ganoderma* têm sido utilizados na medicina chinesa e em outros países asiáticos durante os últimos dois milênios (Sliva, 2004) para o tratamento de diversas doenças, entre elas hipertensão, artrite, diabetes, hipercolesteromia, hepatite, problemas cardiovasculares, nefrite, dismenorrea e lúpus (Eo et al., 1999, Zhou et al., 2007). Polissacarídeos

isolados de *G. lucidum*, um cogumelo comestível, apresentaram atividade anticâncer *in vivo* contra células de sarcoma-180, transplantadas subcutaneamente, em camundongos (Miyazaki & Nishijima, 1981).

O efeito anticâncer de *G. lucidum* foi atribuído à atividade dos β -glicanos (Sone et al., 1985), que também foram isolados de outros cogumelos e apresentam potente atividade antitumoral e imunomodulatória (Wasser, 2002). Além disso, a estimulação de células efetoras imunes (linfócitos, macrófagos e células *natural killers*) leva à subsequente produção de citocinas e contribui com a atividade antitumoral de *G. lucidum*.

O sesquiterpeno ganomicina isolado de *Ganoderma pfeifferi* inibe o crescimento de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA), entre outros. Esteróis isolados de outra espécie, *Ganoderma applanatum*, mostraram fraca atividade contra bactérias Gram-positivas e negativas. Ganodermediol, lucidadiol e ácido aplanoxídico, isolados de algumas espécies do gênero, possuem atividade *in vitro* contra o vírus Influenza do tipo A (Lindequist et al., 2005; Niedermeyer et al., 2005; Fan et al., 2006).

1.4. Atividade biológica do gênero *Gymnopilus*

O basidiomiceto *Gymnopilus pampeanus* (Figura 1.2), família Cortinariaceae, pertence a um gênero que apresenta diversas atividades biológicas reportadas na literatura. Em 2001, um estudo identificando ácido ostopânico (um ácido graxo citotóxico) isolado do corpo de frutificação de *Gymnopilus spectabilis* foi realizado (Nunez-Alarcon et al., 2001). Este ácido graxo demonstrou inibir o crescimento de células de leucemia linfocitária P-388 *in vitro* (Hamburger et al., 1987). Aqueveque e colaboradores (2006) demonstraram atividade antibiótica a partir de compostos isolados de *G. spectabilis*. Também foram isolados e identificados dois poliactilenos (hepta-4,6-diin-3-ol e 7-cloro-hepta-4,6-diin-3-ol) com atividade antimicrobiana contra *Bacillus brevis*, *Streptococcus pyogenes*, *S. aureus*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* e *Penicillium notatum*, entre outros.



Figura 1.2: *Gymnopilus pampeanus* (Disponível em: <http://www.thebegavalley.org.au/2358.html>, acesso em 16 de fevereiro de 2011)

Sendo assim, *A. camerarium* e *G. pampeanus* apresentam um grande potencial como fonte de novas moléculas com atividade biológica, focada nesse estudo como atividade antiparasitária (anti-*Trichomonas vaginalis*). Além disso, os basidiomicetos também são fontes de substâncias com atividade imunomodulatória, sendo de grande interesse durante a infecção parasitária e resposta imunológica do hospedeiro.

1.5. Tricomonose

Trichomonas vaginalis é o protozoário flagelado causador da tricomonose, a doença sexualmente transmissível não viral mais comum no mundo (WHO, 2001). Cerca de 180 milhões de pessoas são mundialmente infectadas por ano, sendo a incidência da infecção por *T. vaginalis* mais frequente que as causadas por *Chlamydia trachomatis* (92 milhões) e *Neisseria gonorrhoeae* (62 milhões). Entretanto, esse número ainda pode estar subestimado devido ao diagnóstico laboratorial de baixa sensibilidade (Fichorova, 2009).

Ao contrário do que se observa em muitos casos nos quais a infecção é facilmente tratada, a tricomonose pode causar sérias consequências de saúde, como complicações na gravidez (Klebanoff et al., 2001), infertilidade (Goldstein et al., 1993), predisposição ao câncer cervical (Viikki et al., 2000), doença inflamatória pélvica (Cherpes et al., 2006), parto prematuro e baixo peso do bebê ao nascer (Cotch et al., 1991; 1997). Além disso, a tricomonose ainda pode

envolver consequências que incluem uretrite, prostatite, epididimite, vaginite, endometrite, piossalpinge e associação com vaginose bacteriana (Petrin et al., 1998; Fichorova, 2009). A tricomonose também atua como um cofator para a transmissão e aquisição do HIV (Sorvillo et al., 2001; Van Der Pol et al., 2008).

Nas mulheres, prurido local com corrimento vaginal espumoso, amarelo ou esverdeado e mucopurulento, dor abdominal baixa e disúria são as manifestações clínicas da infecção por *T. vaginalis* e caracterizam os casos sintomáticos da doença. Nos homens a tricomonose pode ser sintomática com queixas escassas devido a corrimentos mucopurulentos, disúria e pouco prurido ou ardência imediatamente após relação sexual. No entanto, na maioria dos casos a doença é assintomática em homens, sendo que alguns podem apresentar somente uma infecção autolimitada (Petrin et al., 1998).

Os fármacos 2-metil-5-nitroimidazóis, metronidazol e tinidazol, são os únicos fármacos aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA, EUA) para o tratamento da tricomonose. Porém, efeitos carcinogênicos e teratogênicos, assim como o surgimento de isolados de *T. vaginalis* clínicos ou laboratoriais resistentes, além de reações adversas comuns têm sido reportados (Dunne et al., 2003; Upcroft et al., 2006; Goldman et al., 2009). Estes compostos são administrados na forma de pró-fármaco e são ativados para seu estado tóxico dentro do parasito. É suposto que a ativação ocorra nos hidrogenossomos, via redução do grupo nitro mediada pela ferredoxina, o acceptor de elétrons para a piruvato:ferredoxina oxidorreductase (Kulda, 1999) ou, alternativamente, pela via da nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH) desidrogenase (Hrdý et al., 2005). Mais recentemente, foi proposto que o metronidazol é ativado via tiorredoxina redutase citosólica (Leitsch et al., 2009). A resistência ao metronidazol em *T. vaginalis* induzida a níveis altos *in vitro* é associada com a diminuição da expressão de enzimas hidrogenossomais (Brown et al., 1999; Kulda, 1999), assim como a diminuição da atividade de tiorredoxina redutase (Leitsch et al., 2009). Entretanto, foi relatado que em isolados clínicos de *T. vaginalis* resistentes ao metronidazol não há diminuição da expressão de enzimas lisossomais (Land et al., 2001; Wright et al., 2010), e o mecanismo de resistência ao metronidazol nesses parasitos continua desconhecido (Dunne et

al., 2003). Dessa forma se faz necessária a busca por novos fármacos para o tratamento da tricomonose.

1.5.1. Resposta Imunológica na Tricomonose

Ao entrar em contato com as células epiteliais do hospedeiro, o protozoário *T. vaginalis* através do lipofosfoglicano (LPG), glicoconjugado mais abundante da sua superfície celular, liga-se a uma proteína da classe das galectinas presente nas células epiteliais de maneira carboidrato-dependente e assim estabelece a adesão do parasito (Okumura et al., 2008). Ocorre então uma resposta inflamatória específica e liberação de quimiocinas pelas células epiteliais vaginais e cervicais humanas independente de ligação ao receptor *Toll-like* (TLR-4) (Fichorova, 2009). As quimiocinas envolvidas na resposta inflamatória a *T. vaginalis* incluem a proteína inflamatória 3 de macrófagos (Fichorova, 2009), leucotrieno B4 e IL-8 em pacientes sintomáticos (Ryu et al., 2004; Kucknoor et al., 2007). IL-8 é o mais potente quimioatraente para neutrófilos e macrófagos e a sua presença no fluido vaginal é indicativo de condições inflamatórias agudas e crônicas no baixo trato genital feminino (Singh et al., 2009).

Além de ser produzida pelas células do epitélio vaginal, a IL-8 também é produzida pelos neutrófilos humanos estimulados por *T. vaginalis* e tem um efeito biológico prolongado no recrutamento de neutrófilos (Ryu et al., 2004). Muitos neutrófilos são observados em corrimento vaginal de mulheres com infecção por *T. vaginalis*, assim como a presença de IL-8 após a estimulação pelo protozoário parasito (Buchvald et al., 1992; Ryu et al., 2004). É sugerido que os neutrófilos migram para o sítio de inflamação onde há a infecção por *T. vaginalis* e lá desenvolvem um importante papel no mecanismo de proteção contra parasitos (Song et al., 2010).

O NO é considerado um potente imunomodulador, o qual apresenta papéis alternativos durante a inflamação, infecção e rejeição em transplantes. A síntese de NO se dá a partir da desaminação oxidativa da L-arginina pela

enzima óxido nítrico sintase (NOS) e ocorre em diversos tipos celulares, incluindo neutrófilos e macrófagos (Ellis et al., 1998).

NO ou seus metabólitos estáveis têm sido identificados como as principais moléculas efetoras durante a maioria das infecções parasitárias e têm sido associados com a atividade microbicida de macrófagos e células polimorfonucleares. Aparentemente, o NO não é somente necessário como também é suficiente para explicar toda atividade antiparasitária (Liew, 1992). Existem evidências de que macrófagos ativados são capazes de matar *L. major* intracelular, *T. gondii* e *Schistosoma* sp. através da liberação de NO e intermediários reativos de nitrogênio (RNI) (Mellouk et al., 1991; Roitt et al., 1998). A formação de NO tem sido reportada na maioria de infecções parasitárias, como as causadas por *Giardia lamblia* (Fernandes & Assreuy, 1997), *Entamoeba histolytica* (Lin et al., 1995), *L. amazonensis* (Augusto et al., 1996), *T. gondii* (Taylor-Robinson, 1998), *L. mexicana* (Mannick et al., 1996), *Schistosoma mansoni* (Oliveira et al., 1997), *Opisthorchis viverrini* (Haswell-Elkins et al., 1992) e *Clonorchis sinensis* (Motard et al., 1993).

O NO tem importante atividade citotóxica mediada por macrófago contra *T. vaginalis* (Park et al., 1997). A morte de parasitos extracelulares, como *T. vaginalis*, através de macrófagos ativados também é mediada por NO (Gradoni & Ascenzi, 2004) e o protozoário é capaz de degradar NO como um mecanismo de patogenicidade *in vitro* (Sarti et al., 2004). Estes resultados sugerem que radicais RNI podem apresentar um papel em infecções por *T. vaginalis* autolimitantes em pacientes assintomáticas (Yadav et al., 2006).

A tricomonose é a interação entre o parasito que causa a infecção, *T. vaginalis*, e o hospedeiro, da qual a apresentação clínica da doença depende. A geração de radicais livres durante o processo da doença e seu papel na patogênese tem sido reportado em várias infecções microbianas (Nahrevaniean, 2009). Em um estudo utilizando camundongos infectados com isolados clínicos de *T. vaginalis*, provenientes de mulheres sintomáticas e assintomáticas, o número de células polimorfonucleares e a liberação de RNI foram avaliados. Um aumento significativo nos níveis de células polimorfonucleares, células epiteliais vaginais e RNI foi observado em camundongos infectados com isolados de

pacientes sintomáticos e assintomáticos, quando comparado com controle de camundongos não infectados. A média da concentração de RNI em tecido vaginal de camundongos infectados com isolados de *T. vaginalis* de mulheres assintomáticas foi significativamente maior comparado com aqueles infectados com isolados de mulheres sintomáticas. Este estudo indica que a produção de RNI pode desempenhar um importante papel no estabelecimento da infecção (Malla et al., 2004).

Nesse contexto, a procura por compostos bioativos de origem natural em basidiomicetos pode ser uma interessante alternativa na busca de novas moléculas com atividade anti-*T. vaginalis*, sugerindo potenciais novos fármacos para o tratamento da tricomonose. Além disso, substâncias com atividade imunomodulatória podem ser de grande interesse no tratamento da infecção por *T. vaginalis*, tendo em vista que existe uma resposta imunológica do hospedeiro, importante para a patogenia da doença.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Este estudo teve como objetivo obter moléculas oriundas dos basidiomicetos *Amauroderma camerarium* e *Gymnopilus pampeanus* com atividade biológica contra o protozoário *Trichomonas vaginalis*, agente causador da tricomonose.

2.2. Objetivos específicos

- Obter moléculas com atividade biológica anti-*Trichomonas* a partir de *A. camerarium* e *Gymnopilus pampeanus* cultivados em distintas condições.
- Testar os extratos de metabólitos secundários de *A. camerarium* e *G. pampeanus* quanto à avaliação da atividade tricomocida, utilizando isolado de *Trichomonas vaginalis* padrão da *American Type Culture Collection*, ATCC 30236, e isolados clínicos, TV LACH1 e TV LACM2, sendo este último um isolado resistente ao metronidazol;
- Fracionar e purificar os extratos de metabólitos secundários de *A. camerarium*, visando à elucidação química das moléculas bioativas;
- Avaliar parcialmente a atividade imunomodulatória das moléculas bioativas purificadas.

3.1. CAPÍTULO 1

Rastreamento de moléculas com atividade anti-*T. vaginalis* produzidas por basidiomicetos

3.1.1. INTRODUÇÃO

Entre as diferentes estratégias para o descobrimento de novos fármacos, o rastreamento da biodiversidade local em busca de produtos ativos naturais, usando testes bioguiados apropriados, é um método interessante para encontrar alternativas para tratar doenças cujo agente causador é resistente ao tratamento convencional, ou o tratamento convencional causa muitos efeitos colaterais. Produtos naturais produzidos por plantas, fungos e outros organismos são fonte direta ou inspiração para muitos dos medicamentos atualmente disponíveis (Newman & Cragg 2007).

Dentre essas, os fungos representam uma fonte rica de metabólitos secundários bioativos com ampla variedade de aplicação, como agentes antimicrobianos, imunossuppressores, antiparasitários e antitumorais (Wasser & Weis, 1999; Zjawiony, 2004). Os fungos basidiomicetos ocorrem na maior parte dos ecossistemas terrestres e produzem diversas substâncias de baixo peso molecular, como terpenos, esteróides, gamapironas e ácidos fenólicos que apresentam atividade biológica (Wasser & Weiss, 1999).

Neste contexto, este estudo utilizou os basidiomicetos *Amauroderma camerarium* e *Gymnopilus pampeanos* como fontes para a obtenção de substâncias bioativas. Com variações no cultivo dos basidiomicetos, foram realizados estudos de rastreamento da atividade anti-*Trichomonas vaginalis*. Sendo assim, a busca por moléculas originadas de basidiomicetos com atividade tricomonocida baseia-se no fato de apresentarem um alto potencial de produção de compostos com atividade biológica.

3.1.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.2.1. Culturas dos basidiomicetos

Os micélios dos basidiomicetos estudados, *A. camerarium* e *G. pampeanus*, pertencem à coleção do Laboratório de Biofilmes e Diversidade

Microbiana da UFRGS. Os micélios foram cultivados em meio ágar extrato de malte (3% de extrato de malte), a 28 °C, em placa de Petri, como exemplo na figura 3.1.1.



Figura 3.1.1: Crescimento dos micélios de *A. camerarium* em meio ágar extrato de malte (3%), após 21 dias a 28°C.

3.1.2.2. Cultivo *in vitro* de *T. vaginalis*

O isolado de *T. vaginalis* ATCC 30236, pertencente ao Laboratório de Pesquisa em Parasitologia da UFRGS, foi cultivado no meio *trypticase*-extrato de levedo-maltose (TYM) (Diamond, 1957), sem ágar, pH 6,0, suplementado com 10% de soro bovino estéril, inativado, a 37 °C. Somente foram utilizadas nos experimentos culturas que apresentaram 95% de viabilidade, comprovada através da motilidade e da exclusão por trypan blue (0,2%).

3.1.2.3. Obtenção de substâncias bioativas: *A. camerarium* e *G. pampeanus*

O desenvolvimento de *A. camerarium* e *G. pampeanus* visando a obtenção de substâncias bioativas foi realizado em caldo extrato de malte, com variações na fonte de nitrogênio, pH e tempo de incubação. Três discos de ágar extrato de malte contendo o micélio do basidiomicetos foram transferidos para frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL do meio indicado.

Para a obtenção de substâncias bioativas de *A. camerarium* foram transferidos discos de ágar contendo os micélios do basidiomiceto para frascos contendo 50 mL de meio caldo extrato de malte (CEM 3%) variando fonte de

nitrogênio (CEM 3% + KNO₃ 0,3% e CEM 3% + (NH₄)₂SO₄ 0,3%), pH (4, 7, 9) e tempo de incubação (14, 21 e 28 dias), mantidos a 28 °C (Tabela 3.1.1).

Tabela 3.1.1: Variação do cultivo de *A. camerarium* para avaliação da produção de substâncias com atividade anti-*T. vaginalis*.

Meio de Cultivo	CEM (3%) + KNO ₃ (0,3%)			CEM (3%) + (NH ₄) ₂ SO ₄ (0,3%)					
	pH			9					
Tempo de cultivo (dias)	14	21	28	14	21	28	14	21	28

Após o período indicado, os micélios foram separados do meio por filtração a vácuo. Cada filtrado foi extraído com acetato de etila (3 x 25 mL). A fração aquosa foi concentrada em evaporador rotativo, liofilizada e pesada. A partir do extrato seco da fração aquosa foi feita uma solução estoque em água (100 mg/mL) para ensaios de atividade anti-*T. vaginalis*. A fração orgânica foi concentrada em centrífuga a vácuo, pesada e solubilizada em dimetil sulfóxido (DMSO) e adição posterior de água, resultando em uma solução estoque de 100 mg/mL que também foi testada a atividade anti-*T. vaginalis*. As soluções estoques foram esterilizadas por filtração em membrana de 0,22 µm.

Para a produção de substâncias bioativas de *G. pampeanus* foram transferidos discos de ágar contendo os micélios do basidiomiceto para frascos contendo 50 mL de meio caldo extrato de malte (CEM 3%) variando fonte de nitrogênio (CEM 3%; CEM + peptona 0,3%; CEM 3% + KNO₃ 0,3% e CEM 3% + (NH₄)₂SO₄ 0,3%), e tempo de incubação (14, 21 e 28 dias). O pH dos meios foi fixado em 7 e os micélios foram incubados mantidos a 28°C (Tabela 3.1.2).

Tabela 3.1.2: Variação do cultivo de *G. pampeanus* para avaliação da produção de substâncias com atividade anti-*T. vaginalis*.

Meio de Cultivo	CEM (3%)			CEM (3%) + peptona (0,3%)			CEM (3%) + KNO ₃ (0,3%)			CEM (3%) + (NH ₄) ₂ SO ₄ (0,3%)		
	pH			7			7			7		
Tempo de cultivo (dias)	14	21	28	14	21	28	14	21	28	14	21	28

Após o período indicado, os micélios foram separados do meio por filtração a vácuo. O filtrado foi concentrado em evaporador rotativo, liofilizado e pesado. A partir do extrato seco do filtrado foi feita uma solução estoque em

água (100 mg/mL) para ensaios de atividade anti-*T. vaginalis*. A solução estoque foi esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm.

3.1.2.4. Teste da atividade anti-*Trichomonas* dos extratos em microplaca

Em microplaca de 96 poços, foram adicionados em cada poço 50 µL das soluções com os extratos a serem testados e 150 µL de uma suspensão de trofozoítos de *T. vaginalis*, na qual a concentração foi ajustada por contagem em câmara de Thoma, resultando em um volume final de 200 µL contendo $5,0 \times 10^4$ trofozoítos/ mL e 25 mg/mL de extrato a ser testado. O controle negativo do cultivo (meio do cultivo dos basidiomicetos e suas variações, sem adição dos micélios) foi utilizado em todos os experimentos a fim de garantir a ausência de efeito do meio nas atividades biológicas. As placas foram mantidas em estufa a 37 ° C por 24 horas. Após esse período, 20 µL de uma solução de resazurina a 0,1 mg/mL em tampão PBS foi adicionada em cada poço. Após 1 hora de incubação a 37°C a fluorescência de cada poço foi lida em espectrofotômetro de fluorescência (Spectramax Gemini XS - Molecular Devices Cooperation, Sunnyvale, CA, USA) e a quantificação dos trofozoítos viáveis foi realizada (Duarte et al., 2009).

3.1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os extratos foram testados para verificar a presença de substâncias com atividade anti-*T. vaginalis*. Para os extratos aquosos obtidos de *A. camerarium* destacam-se as atividades obtidas através das condições de cultivo em meio CEM + KNO₃ por 21 dias em pH 4 e 7 e por 28 dias em pH 4 e 7; em CEM + (NH₄)₂SO₄ por 21 dias em pH 4, 7 e 9 (figura 3.1.2). Não houve influência dos meios de cultivo dos basidiomicetos (controle negativo) na atividade antiparasitária. Não se obteve sucesso nos testes realizados com as frações orgânicas, isto é, não foi identificada atividade antiparasitária nos extratos orgânicos de *A. camerarium*, além desse tipo de extração não apresentar bom rendimento. Sendo assim, os estudos posteriores com *G. pampeanus* foram

realizados sem extração com acetato de etila, visando, sobretudo, a preservação da integridade de moléculas sensíveis a solventes orgânicos.

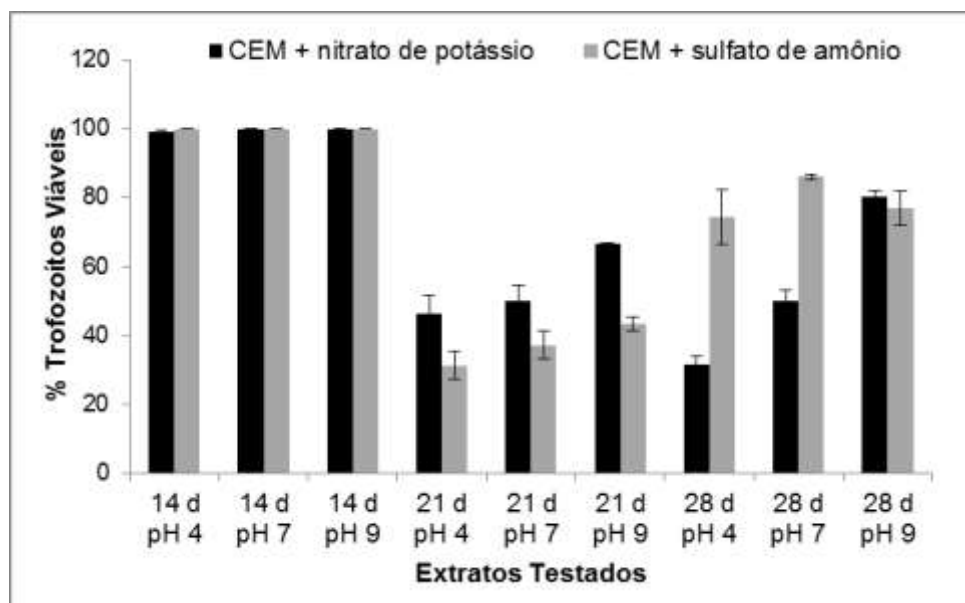


Figura 3.1.2: Rastreamento de atividade anti-*T. vaginalis* ATCC30236 de extratos aquosos de cultivo de *A. camerarium*. Barras pretas: cultivo em CEM + KNO_3 ; barras cinzas: cultivo em $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. 14 d: 14 dias de cultivo; 21 d: 21 dias de cultivo; 28 d: 28 dias de cultivo. Resultados representam média percentual da atividade em relação ao controle (100% de trofozoítos viáveis) (n=3, triplicata).

Para os extratos obtidos a partir do cultivo de *G. pampeanus*, diversas atividades foram destacadas. Ao testar os extratos incubados por 28 dias em meio CEM + peptona, CEM + KNO_3 e CEM + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ obteve-se atividade de 100% (figura 3.1.3), isto é, os extratos na concentração de 20 mg/mL foram capazes de inibir 100% dos trofozoítos, em relação ao controle. Não houve influência dos meios de cultivo dos basidiomicetos (controle negativo) na atividade antiparasitária.

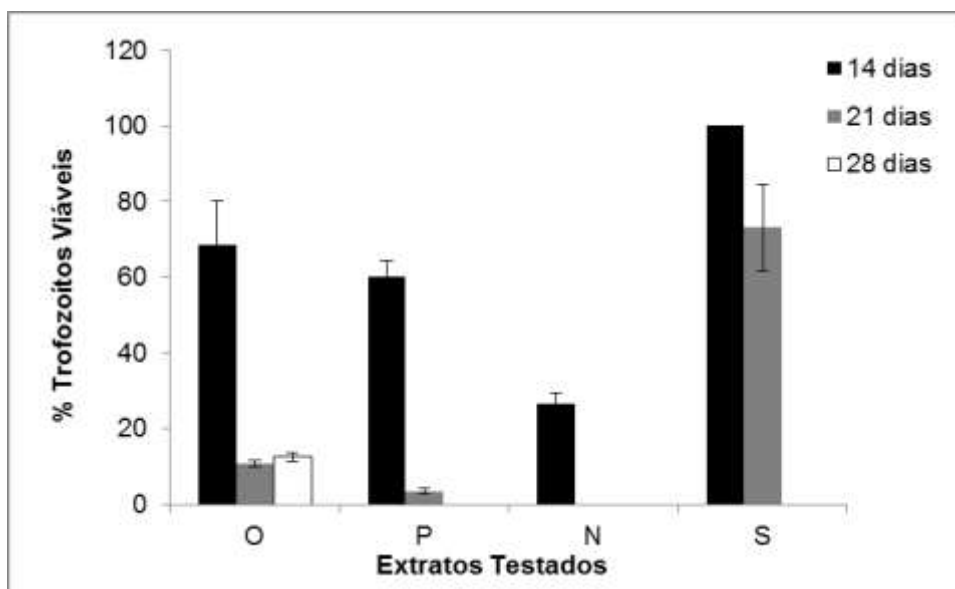


Figura 3.1.3: Rastreamento de atividade anti-*T. vaginalis* ATCC30236 de extratos de cultivo de *G. pampeanus*. Barras pretas: cultivo de 14 dias; barras cinza: cultivo de 21 dias; barras brancas: cultivo de 28 dias. O: CEM; P: CEM + peptona; N: CEM + KNO_3 ; S: CEM + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Resultados representam média percentual da atividade em relação ao controle (100% de trofozoítos viáveis) (n=3, triplicata).

Esses resultados demonstram a diversidade da atividade anti-*T. vaginalis* com a variação da fonte de nitrogênio usada no meio de cultivo, assim como o pH do meio. Utilizando KNO_3 obteve-se uma maior atividade antiparasitária para ambos basidiomicetos. Em outros estudos é sugerido que fontes mais complexas de nitrogênio podem prover um longo período no qual as condições são favoráveis para um crescimento ótimo e produção de compostos ativos (Calam, 1986). Entretanto, Kachlishvili e colaboradores (2005) analisaram a atividade de enzimas lignocelulíticas de quatro basidiomicetos de espécies diferentes, variando a fonte de nitrogênio e concluíram que o efeito da fonte de nitrogênio na atividade enzimática do cogumelo foi variável, dependendo do fungo e do composto testado. Sendo assim, a variação da fonte de nitrogênio é útil para a otimização da produção de determinada molécula ativa, não existindo uma fonte ideal padrão.

3.2 CAPÍTULO 2

Mariana Duarte, Adriana Seixas, Maira Peres de Carvalho, Geraldo Attilio De Carli, Carlos Termignoni, Tiana Tasca, Alexandre José Macedo. Amaurocine: a proinflammatory and anti-*Trichomonas vaginalis* protein produced by the basidiomycete *Amauroderma camerarium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** (submetido)

Amaurocine: a proinflammatory and anti-*Trichomonas vaginalis* protein produced by the basidiomycete *Amauroderma camerarium*

Mariana Duarte¹, Adriana Seixas², Maira Peres de Carvalho¹£, Geraldo Attilio De Carli⁴, Carlos Termignoni^{2,3}, Tiana Tasca¹, Alexandre José Macedo^{1,2*}

1. Faculdade de Farmácia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil. *e-mail: alexandre.macedo@ufrgs.br.

£ Present address: Chemical Microbiology Group. Helmholtz Centre for Infection Research, Inhoffenstrasse 7 38124, Braunschweig, Germany.

2. Centro de Biotecnologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

3. Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

4. Instituto de Geriatria e Gerontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 6690, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

Abstract

The flagellated protozoan, *Trichomonas vaginalis*, causes trichomonosis, the most common non-viral STD in the world. Metronidazole and tinidazole are two drugs of choice recommended by the Food and Drug Administration (FDA, USA) for the treatment of human trichomonosis. However, adverse effects and resistant isolates have been reported. The search for natural bioactive compounds in basidiomycetes can be an interesting approach to discover alternative drugs for the therapy of *T. vaginalis* infection. The basidiomycete *Amauroderma camerarium* was cultivated under different conditions (nitrogen source and time of growth) and the supernatants containing fungal substances were tested against *T. vaginalis*. A purification of the preparation with higher inhibitory was performed. Amaurocine, a 13 kDa-protein was isolated and presented MIC of 31.2; 62.5 and 62.5 µg/mL against *T. vaginalis* isolates ATCC 30236, TV-LACH1 and TV-LACM2 (clinical metronidazole resistant isolate), respectively. Moreover, amaurocine was tested at a concentration of 62.5 µg/mL and revealed 12.6% of cytotoxicity for neutrophils, besides to have elevated the NO release, suggesting that amaurocine presents a proinflammatory character.

Keywords: Basidiomycetes, antiparasitic activity, *Trichomonas vaginalis*, *Amauroderma camerarium*.

Basidiomicetos, ou cogumelos, tem há muito tempo atraído interesse de muitas áreas de produtos alimentícios e farmacêuticos e representam uma fonte rica de substâncias bioativas com diversas atividades como agentes antimicrobianos, imunossupressores, antiparasitários e antitumorais (Wasser & Weis 1999; Zjawiony, 2004).

Muitas moléculas isoladas de fungos basidiomicetos apresentam potencial atividade antiparasitária (Jin & Zjawiony, 2006; Cota et al., 2008; Adams et al., 2010). Nos ensaios preliminares de verificação da atividade anti-*T. vaginalis*, tanto *A. camerarium* quanto *G. pampeanus* demonstraram atividade contra o protozoário, indicando a presença de potenciais moléculas com atividade antiparasitária produzidas em meio de cultura por esses basidiomicetos.

De acordo com a base de dados do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) não existem relatos demonstrando atividade biológica relacionada ao gênero *Amauroderma*. Existe somente uma publicação relacionada à espécie *Amauroderma boleticeum*, relatando uma alta atividade de oxidoredutase extracelular (Saparrat et al., 2000), além de uma outra publicação descrevendo uma nova espécie, *Amauroderma coltricioides* (Aime et al., 2003). Sendo assim, este é o primeiro relato de atividade biológica de substâncias derivadas desse gênero. Dessa forma, optou-se pelo basidiomiceto *A. camerarium* para dar continuidade aos estudos de purificação e identificação da substância bioativa. As moléculas com atividade anti-*T. vaginalis* potenciais derivadas do basidiomiceto *G. pampeanus* serão investigadas posteriormente.

Após o fracionamento e a purificação do extrato bruto derivado do cultivo de *A. camerarium* obteve-se uma fração pura de substância de caráter proteico, capaz de inibir o crescimento do isolado ATCC 30236 de *T. vaginalis* na concentração de 31,2 µg/mL, assim como de inibir os isolados clínicos TV-LACH1 e TV-LACM2 (resistente ao metronidazol) na concentração de 62,5 µg/mL (Tabela 3.2.1).

A análise por espectrometria de massas da amaurocina resultou em 39 peptídeos, os quais foram utilizados na busca na base de dados de proteínas do NCBI. Ao verificar a homologia dos peptídeos resultantes após a espectrometria

de massas com proteínas derivadas de fungos não foi encontrada similaridade entre tais proteínas e os peptídeos da amaurocina (anexo 1), sendo assim, é possível sugerir que a amaurocina trata-se de uma proteína inédita.

Também foram avaliados fungos com o genoma sequenciado, pertencentes ao filo Basidiomycota, e também não foi encontrada similaridade com outra proteína. Entretanto, quatro enzimas de *Puccinia graminis* f. sp. *Tritici* (ATPase, ATPase tipo P, proteína ligada ao ATP de transporte de cobalto CbiO 2, DNA helicase dependente de ATP) apresentaram alguma identidade, porém baixa, com alguns peptídeos resultantes da sequência da amaurocina (anexo 2). Este fato pode indicar que a amaurocina apresenta domínio de ligação de ATP em sua estrutura.

Existem peptídeos com amplo espectro de atividade antimicrobiana contra bactérias, fungos e vírus. Esses peptídeos são moléculas capazes de solubilizar-se em ambientes aquosos e também de penetrar em membranas lipídicas (Izadpanah & Gallo, 2005). Os peptídeos antimicrobianos são antibióticos naturais codificados por genes que têm recebido atenção na pesquisa de novos antibióticos no combate de doenças infecciosas. Em organismos multicelulares, os peptídeos antimicrobianos, como as defensinas e catelicidinas, oferecem uma resposta protetora coordenada contra infecções e são componentes principais da resposta imune inata em vertebrados. Em organismos unicelulares, tais peptídeos, como as bacteriocinas, têm a função de suprimir a competição entre espécies. Devido ao fato de muitos peptídeos antimicrobianos terem ação antimicrobiana através do rompimento da membrana são por isso considerados menos prováveis de induzir resistência, aumentando com isso, o interesse como alternativa para novos fármacos antimicrobianos (Sang & Blecha, 2008).

Entretanto, recentemente tem sido sugerida a possibilidade de o poro transmembrana formado pelos peptídeos não ser o único mecanismo de ação antimicrobiana. De fato, diversas observações sugerem que peptídeos translocados podem alterar a formação da membrana citoplasmática, inibir a síntese de parede celular, a síntese de ácido nucleico, a síntese de proteínas ou ainda a atividade enzimática (Brogden, 2005). Dessa forma, é possível que a amaurocina seja uma proteína antimicrobiana produzida pelo *A. camerarium*

como defesa do basidiomiceto contra infecções, atuando através de um mecanismo de ação ainda desconhecido.

A capacidade da proteína de estimular a liberação de óxido nítrico de neutrófilos, tanto na ausência quanto na presença de *T. vaginalis*, com citotoxicidade de 12,6% contra neutrófilos humanos, pode ser destacada como uma importante propriedade. É importante ressaltar que os neutrófilos têm grande participação na infecção por *T. vaginalis* e desempenham papel de proteção do hospedeiro (Song et al., 2010). ONO ou seus metabólitos estáveis são relatados como as principais moléculas efetoras da maioria das infecções parasitárias, sendo associado com a atividade microbiana desempenhada por macrófagos e células polimorfonucleares (Liew, 1992).

Levando-se em conta a atividade anti-*T. vaginalis* da amaurocina tanto contra isolado sensível como resistente ao metronidazol, é importante salientar a relevância da identificação de uma nova molécula com atividade antiparasitária. Essa nova molécula proteica demonstra potencial como novo fármaco já que por apresentar atividade contra isolado resistente ao metronidazol de *T. vaginalis* sugere atuar por um mecanismo de ação diferente do utilizado pelo metronidazol. Além disso, na concentração ativa contra *T. vaginalis*, a amaurocina apresenta baixa citotoxicidade contra neutrófilos humanos, podendo ser um indício de baixa toxicidade em humanos, o que aumenta seu potencial como protótipo de fármaco.

O basidiomiceto *A. camerarium* é cultivável, assim como seu micélio, tornando fácil o acesso à proteína para produção de um protótipo de fármaco. Além disso, técnicas de biologia molecular podem ser empregadas para otimização do processo. É possível trabalhar com clonagem do gene que expressa essa proteína, transfecção e expressão em uma maior quantidade da proteína em questão, tornando assim mais fáceis os processos de purificação. Kaneko e colaboradores (2008) realizaram a clonagem, análise da sequência e expressão em *Escherichia coli* do gene *uck1* do basidiomiceto *L. edodes* que codifica uma UMP-CMP quinase. A enzima foi expressa, apresentando atividade desejada, demonstrando a viabilidade desse tipo de processo.

Em resumo, nossos resultados demonstraram atividades favoráveis da fração purificada derivada de *A. camerarium*, já que esta apresenta atividade anti-*T. vaginalis* mesmo contra isolado resistente ao metronidazol, além de atividade próinflamatória, que contribui com a resposta imunológica do hospedeiro. Como resultado disso, sugerimos uma ação sinérgica da fração proteica purificada direta com atividade contra *T. vaginalis* e ação indireta melhorando o sistema imunológico hospedeiro, aumentando a proteção contra esse protozoário parasito.

5 CONCLUSÕES

A partir dos estudos e resultados obtidos com o trabalho desenvolvido nessa dissertação foi possível evidenciar:

- O potencial dos basidiomicetos como fontes de moléculas bioativas, nesse trabalho focado na atividade antiparasitária, sendo este o primeiro relato de moléculas com atividade anti-*T. vaginalis*.
- A atividade anti-*T. vaginalis* exercida pela proteína isolada de *A. camerarium* em isolado ATCC e em isolados clínicos, incluindo isolado clínico resistente ao metronidazol, sugerindo um mecanismo de ação diferente do exercido pelo fármaco metronidazol no combate à tricomonose, sendo um fármaco alternativo em potencial em casos de resistência.
- A importante atividade próinflamatória da amaurocina, já que a esta foi capaz de induzir liberação de NO de neutrófilos, sendo este um mecanismo importante de defesa do hospedeiro nesta patologia.
- O potencial terapêutico apresentado pela amaurocina para o tratamento da tricomonose, levando em conta sua atividade, baixa citotoxicidade contra neutrófilos humanos.

As perspectivas desse trabalho são:

- Continuar os ensaios de purificação e identificação de moléculas com atividade anti-*T. vaginalis* produzidas pelo basidiomiceto *G. pampeanus*.
- Amaurocina é originária de basidiomiceto, sendo por isso de fonte cultivável, além de ser possível a otimização da sua produção por técnicas de biologia molecular.
- Identificação do gene que codifica a proteína em questão, visando à expressão da proteína através de outro organismo, utilizando ferramentas de biologia molecular.

7. REFERÊNCIAS

ADACHI, K.; NANBA, H.; KURODA, H. Potentiation of host-mediated antitumor activity in mice by beta-glucan obtained from *Grifola frondosa* (maitake). **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 35, p. 262-70, 1987.

ADAMS, M.; CHRISTEN, M.; PLITZKO, I.; ZIMMERMANN, S.; BRUN, R.; KAISER, M.; HAMBURGER, M. Antiplasmodial lanostanes from *Ganoderma lucidum* mushroom. **Journal of Natural Products**, v. 73, p. 897-900, 2010.

AIME, M.C.; HENKEL, T.W.; RYVARDEN, L. Studies in neotropical polypores 15: new and interesting species from Guyana. **Mycologia**, v. 95, p. 614-619, 2003.

AQUEVEQUE, P.; BACERRA, J.; PALFNER, G.; SILVA, M.; ALARCÓN, J.; ANKE, T.; STERNER, O. Antimicrobial activity of metabolites from mycelial cultures of Chilean basidiomycetes. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 51, p. 1057-1060, 2006.

AUGUSTO, O.; LINARES, E.; GIORGIO, S. Possible roles of nitric oxide and peroxynitrite in murine leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.29, p. 853-862 1996.

BERDY, J. Bioactive microbial metabolites - a personal view. **Journal of Antibiotics**, v. 58, p. 1-26, 2005.

BORCHERS, A.T.; KEEN, C.L.; GERSHWIN, M.E. Mushrooms, tumors, and immunity: an update. **Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)**, v. 229, p. 393-406, 2004.

BOYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. Supplementum**, v. 97, p. 77-89, 1968.

BROGDEN, K.A. Antimicrobial Peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature Reviews. Microbiology**, v. 3, p. 238-250, 2005.

BROWN, D.; UPCROFT, J.; DODD, H.; CHEN, N.; UPCROFT, P. Alternative 2-keto acid oxidoreductase activities in *Trichomonas vaginalis*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 98, p. 203-214, 1999.

BUCHVALD, D.; DEMES, P.; GOMBOSOVA, A.; MRAZ, P.; VALENT, M.; STEFANOVIC, J. Vaginal leukocyte characteristics in urogenital trichomoniasis. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, v. 100, p. 393-400, 1992.

CALAM, C. Shake flask fermentations. In: DEMAIN, A.L.; SOLOMON, A.N. **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**. Washington: American Society of Microbiology, 1986, p. 59-65.

CASSINELLI, G.; LANZI, C.; PENSA, T.; GAMBETTA, R.A.; NASINI, G.; CUCCURU, G.; CASSINIS, M.; PRATIESI, G.; POLIZZI, D.; TORTORETO, M.; ZUNINO, F. Clavilactones, a novel class of tyrosine kinase inhibitors of fungal origin. **Biochemical Pharmacology**, v. 59, p. 1539-1547, 2000.

CHERPES, T.L.; WIESENFELD, H.C.; MELAN, M.A.; KANT, J.A.; COSENTINO, L.A.; MEYN, L.A.; HILLIER, S.L. The associations between pelvic inflammatory disease, *Trichomonas vaginalis* infection, and positive *Herpes simplex virus* type 2 serology. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 33, p. 747-752, 2006.

CHIHARA, G.; MAEDA, Y.; HAMURO, G.; SASAKI, T.; FUKUOKA, F. Inhibition of mouse sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. **Nature**, v. 222, p. 687-688, 1969.

CHIHARA, G.; HAMURO, J.; YUKIKO, Y.; MAEDA, Y.; ARAI, Y.; FUKUOKA, F. Marked antitumor activity, especially Lentinan, from *Lentinusedodes* (Berk.) Sing. (an edible mushroom). **Cancer Research**, v. 30, p. 2776-2781, 1970.

CINTAS, L.M.; CASAUS, M.P.; HERRANZ, C.; NES, I.F.; HERNÁNDEZ, P.E. Review: Bacteriocins of lactic acid bacteria. **Food Science and Technology International**, v. 7, p. 281-305, 2001.

COTA, B.B.; ROSA, L.H.; FAGUNDES, E.M.S.; MARTINS-FILHO, O.A.; CORREA-OLIVEIRA, R.; ROMANHA, A.J.; ROSA, C.A.; ZANI, C.L. A potent trypanocidal component from the fungus *Lentinus strigosus* inhibits trypanothione reductase and modulates PBMC proliferation, **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 263-270, 2008.

COTCH, M.F.; PASTOREK, J.G.; NUGENT, R.P.; YERG, D.E.; MARTIN, D.H.; ESCHENBACH, D.A. Demographic and behavioral predictors of *Trichomonas vaginalis* infection among pregnant women. The vaginal infections and prematurity study group. **Obstetrics and Gynecology**, v. 78, p. 1087-1092, 1991.

COTCH, M.F.; PASTOREK, J.G.; NUGENT, R.P.; HILLIER, S.L.; GIBBS, R.S.; MARTIN, D.H.; ESCHENBACH, D.A.; EDELMAN, R.; CAREY, J.C.; REGAN, J.A.; KROHN, M.A.; , KLEBANOFF, M.A.; RAO, A.V.; RHOADS, G.G. *Trichomonas vaginalis* associated with low birth weight and preterm delivery. The vaginal infections and prematurity study group. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 24, p. 353-60, 1997.

DEMAIN, A.L.; SANCHEZ, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. **Journal of Antibiotics**, v. 62, p. 5-16, 2009.

DEMES, P.; GOMBOSOVA, A.; VALENT, M; FABUSOVA, H.; JANOSKA, A. Fewer *Trichomonas vaginalis* organisms in vaginas of infected women during menstruation. **Genitourinary Medicine**, v. 64, p. 22-24, 1988.

DIAMOND, L.S. The establishment of various *Trichomonas* of animals and man in axenic cultures. **Journal of Parasitology**, v. 43, p. 488-490, 1957.

DUARTE, M.; GIORDANI, R.B.; DE CARLI, G.A.; ZUANAZZI, J.A.; MACEDO, A.J.; TASCA, T. A quantitative resazurin assay to determinate the viability of *Trichomonas vaginalis* and the cytotoxicity of organic solvents and surfactant agents. **Experimental Parasitology**, v. 123, p. 195-198, 2009.

DUNNE, R.; DUNN, L.; UPCROFT, P.; O'DONOGHUE, P.; UPCROFT, J. Drug resistance in the sexually transmitted protozoan *Trichomonas vaginalis*. **Cell research**, v. 13, p. 239–249, 2003.

ELLIS, G.; ADATIA, I.; YAZDANPANA, M.; MAKELA, S.K. Nitrite and nitrate analyses: a clinical biochemistry perspective. **Clinical Biochemistry**, v. 31, p. 195-220, 1998.

EO, S.K.; KIM, Y.S.; LEE, C.K.; HAN, S.S. Antiherpetic activities of various protein bound polysaccharides isolated from *Ganoderma lucidum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 68, p. 175-81, 1999.

FAN, L.; PAN, H.; SOCCOL, A.T.; PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. Advances in mushroom research in the last decade. **Food Technology and Biotechnology**, v.44, p. 303-311, 2006.

FERNANDES, P.D.; ASSREUY, J. Role of nitric oxide and superoxide in *Giardia lamblia* killing. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, p. 93-99, 1997.

FICHOROVA, R.N. Impact of *T. vaginalis* infection on innate immune responses and reproductive outcome. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 83, p. 185-189, 2009.

GOLDMAN, L.M.; UPCROFT, J.A.; WORKOWSKI, K.; RAPKIN, A. Treatment of metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. **Sexual Health**, v. 6, p. 345-347, 2009.

GOLDSTEIN, F.; GOLDMAN, M.B.; CRAMER, D.W. Relation of tubal infertility to a story of sexually transmitted diseases. **American Journal of Epidemiology**, v. 137, p. 577-584, 1993.

GORNALL, A.G.; BARDAWILL, C.J.; DADID, M.M. Determination of serum proteins by means of the biureto reaction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 177, p. 751-766, 1949.

GRADONI, L.; ASCENZI, P. Nitric oxide and anti-protozoan chemotherapy. **Parassitologia**, v. 46, p. 101-103, 2004.

HAMBURGER, M.; HANDA, S.S.; CORDELL, G.A.; KINGHORN, A.D.; FARNSWORTH, N.R. Plant anticancer agents, XLIII. (E,E)-7, 12-dioxo-octadeca-8, 10-dien-1-oic acid (ostopanic acid), a cytotoxic fatty acid from *Ostodes paniculata*. **Journal of Natural Products**, v.50, p. 281-283, 1987.

HARVEY, A.L.; Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v.13, p. 894-901, 2008.

HASWELL-ELKINS, M.; SATARUG, S.; SITHITHAWORN, P.; MAIRIANG, E.; MAIRIANG, P.; ELKINS D. Nitrate excretion and parasite-specific T lymphocyte responses of humans infected with the liver fluke, *Opisthorchis viverrini*. In: MONCADA, S.; MARLETTA, M.A.; HIBBS, J.R.J.B.; HIGGS, E.A. **The biology of nitric oxide: 1** Physiological and clinical aspects. London: ed. Portland Press, 1992. 380 p.

HELMS, D.J.; MOSURE, D.J.; SECOR, W.E.; WORKOWSKI, K.A. Management of *Trichomonas vaginalis* in women with suspected metronidazole hypersensitivity. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 198, p. 370-377, 2008.

HERRERA, T.; ULLOA, M. **El reino de los hongos: Micología básica y aplicada**. México: Universidad nacional autónoma de México, 1998, 552p.

HRDÝ, I.; CAMMACK, R.; STOPKA, P.; KULDA, J.; TACHEZY, J. Alternative pathway of metronidazole activation in *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 5033-5036, 2005.

HSIEH, K.Y.; HSU, C.I.; LIN, J.Y.; TSAI, C.C.; LIN, R.H. Oral administration of an edible-mushroom-derived protein inhibits the development of food-allergic reactions in mice. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 33, p. 1595-1602, 2003.

IZADPANAH, A.; GALLO, R.L. Antimicrobial peptides. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 52, p. 381-390, 2005.

JIN, W.; ZJAWIONY, J.K. 5-alkylresorcinols from *Merulius incarnatus*. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 704-706, 2006.

JOSE, N.; AJITH, T.A.; JANARDHANAN, K.K. Methanol extract of the oyster mushroom, *Pleurotus florida*, inhibits inflammation and platelet aggregation. **Phytotherapy Research**, v. 18, p. 43-46, 2004.

KACHLISHVILI, E.; PENNINGCKX, M.J.; TSIKLAURI, N.; ELIASHVILI, V. Effect of nitrogen source on lignocellulolytic enzyme production by white-rot basidiomycetes under solid-state cultivation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.22, p. 391-397, 2005.

KANEKO, S.; MIYAZAKI, Y.; YASUDA, T.; SHISHIDO, K. Cloning, sequence analysis and expression of the basidiomycete *Lentinus edodes* gene *uck1*, encoding UMP-CMP kinase, the homologue of *Saccharomyces cerevisiae* *URA6* gene. **Gene**, v. 211, p. 259-266, 2008.

KELNER, M.J.; McMORRIS, T.C.; BECK, W.T.; ZAMORA, J.M.; TAETLE, R. Preclinical evaluation of illudins as anticancer agents. **Cancer Research**, v. 47, p. 3186-3189, 1987.

KIM, G.Y.; KIM, S.H.; HWANG, S.Y.; KIM, H.Y.; PARK, Y.M.; PARK, S.K.; LEE, M.K.; LEE, S.H.; LEE, T.H.; LEE, J.D. Oral administration of proteoglycan isolated from *Phellinus linteus* in the prevention and treatment of collagen induced arthritis in mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, p. 823-831, 2003a.

KIM, G.Y.; OH, Y.H.; PARK, Y.M. Acidic polysaccharide isolated from *Phellinus linteus* induces nitric oxide-mediated tumoricidal activity of macrophages through protein tyrosine kinase and protein kinase C. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.309, p. 399–407, 2003b.

KIM, G.Y.; ROH, S.I.; PARK, S.K.; AHN, S.C.; OH, S.C.; OH, Y.H.; LEE, J.D.; PARK, Y.M. Alleviation of experimental septic shock in mice by acidic polysaccharide isolated from the medicinal mushroom *Phellinus linteus*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, p. 1418-1423, 2003c.

KIM, K.M.; KWON, Y.G., CHUNG, H.T.; YUN, Y.G.; PAE, H.O.; HAN, J.A., HA, K.S.; KIM, T.W.; KIM, Y.M. Methanol extract of *Cordyceps pruinosa* inhibits *in vitro* and *in vivo* inflammatory mediators by suppressing NF- κ B activation. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 190, p. 1-8, 2003.

KLAENHAMMER, T.R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 12, p. 39-86, 1993.

KLEBANOFF, M.A.; CAREY, J.C.; HAUTH, J.C.; HILLIER, S.L.; NUGENT, R.P.; THOM, E.A.; ERNEST, J.M.; HEINE, R.P.; WAPNER, R.J.; TROUT, W.; MOAWAD, A.; MODOVNIK, M.; SIBAI, B.M.; DORSTEN, J.P.V.; DOMBROWSKI, M.P.; O'SULLIVAN, M.J.; VARNER, M.; LANGER, O.; MCNELLIS, D.; ROBERTS, J.M.; LEVENO, K.J. The National Institute of Child Health Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine Units. Failure of metronidazole to prevent preterm delivery among pregnant women with asymptomatic *Trichomonas vaginalis* infection. **New England Journal of Medicine**, v. 345, p. 487-493, 2001.

KNIGHT, A.J. Free radicals, antioxidants and the immune system. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, v. 30, p. 145-158, 2000.

KOEHN, F.E. High impact technologies for natural products screening. **Progress in drug research**, v. 65, p. 177-210, 2008.

KOEHN, F.E.; CARTER, G.T. Rediscovering natural products as a source of new drugs. **Discovery Medicine**, n. 26, 2009.

KOMATSU, N.; OKUBO, S.; KIKUMOTO, S.; KIMURA, K.; SAITO, S.; SAKAI, S. Host-mediated anti-tumor action of Schizophyllan, a glucan produced by *Schizophyllum commune*. **Japanese Journal of Cancer Research**, v. 60, p. 137-144, 1969.

KUCKNOOR, A.S.; MUNDODI, V.; ALDERETE, J.F. The proteins secreted by *Trichomonas vaginalis* and vaginal epithelial cell response to secreted and episomally expressed AP65. **Cellular Microbiology**, v. 9, p. 2586-2597, 2007.

KULDA, J. Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 199-212, 1999.

KUO, Y.C.; HUANG, Y.L.; CHEN, C.C.; LIN, Y.S.; CHUANG, K.A.; TSAI, W.J. Cell cycle progression and cytokine gene expression of human peripheral blood mononuclear cells modulated by *Agaricus blazei*. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 140, p. 176-187, 2002.

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

LAND, K.M.; CLEMENS, D.L.; JOHNSON, P.J. Loss of multiple hydrogenosomal proteins associated with organelle metabolism and high-level drug resistance in trichomonads. **Experimental Parasitology**, v. 97, p. 102-110, 2001.

LEISSNER, K.H.F.; JELKEGARD, B.; TISELL, L.E. Concentration and content of zinc in the human prostate. **Investigative Urology**, v. 18, p. 32-35, 1980.

LEITSCH, D.; KOLARICH, D.; BINDER, M.; STADLMANN, J.; ALTMANN, F.; DUCH, D.; DUCHÈNE, M. *Trichomonas vaginalis*: metronidazole and other nitroimidazole drugs are reduced by the flavin enzyme thioredoxin reductase and disrupt the cellular redox system. Implications for nitroimidazole toxicity and resistance. **Molecular Microbiology**, v. 72, p. 518-536, 2009.

LI, J.W.H.; VEDERAS, J.C. Drug discovery and natural products: End of an era or an endless frontier? **Science**, v. 325, p. 161-165, 2009.

LI, X.M.; HUANG, C.K.; ZHANG, T.F.; TEPER, A.A.; SRIVASTAVA K.; SCHOFIELD, B.H.; SAMPSON, H.A. The Chinese herbal medicine formula MSSM-002 suppresses allergic airway hyperreactivity and modulates TH1/TH2 responses in a murine model of allergic asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 106, p. 660-668, 2000.

LI, X.M.; ZHANG, T.F.; HUANG, C.K.; SRIVASTAVA, K.; TEPER, A.A.; ZHANG, L.; SCHOFIELD, B.H.; SAMPSON, H.A. Food allergy herbal formula-1 (FAHF-1) blocks peanut-induced anaphylaxis in a murine model. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 108, p. 639-646, 2001.

LIEW, F.Y. Regulation of nitric oxide synthase in macrophages. In: MONCADA, S.; STAMLER, J.; GROSS, S.; HIGGS, E.A. **The biology of nitric oxide: 2** Enzymology, Biochemistry and Immunology. London: ed Portland Press, 1992. p.223-229.

LIN, J.Y.; SEGUIN, R.; KELLER, K.; CHADEE, K. Transforming growth factor beta 1 primes macrophages for enhanced expression of the nitric oxide synthase gene

for nitric oxide-dependent cytotoxicity against *Entamoeba histolytica*. **Immunology**, v. 85, p. 400-407, 1995.

LINDEQUIST, U.; NIEDERMEYER, T.H.J.; JÜLICH, W.D. The pharmacological potential of mushroom. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, p. 285-99, 2005.

LIU, Y.H.; KAO, M.C.; LAI, Y.L.; TSAI, J.J. Efficacy of local nasal immunotherapy for Dp2-induced airway inflammation in mice: using Dp2 peptide and fungal immunomodulatory peptide. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 112, p. 301-310, 2003.

LUCAS, E.H.; MONTESANO, R.; PEPPER, M.S.; HAFNER, M.; SABLON, E. Tumor inhibitors in *Boletus edulis* and other holobasidiomycetes. **Antibiotics and Chemotherapy**, v. 7, p. 1-4, 1957.

LULL, C.; WICHERS, H.J.; SAVELKOUL, H.F.J. Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites. **Mediators of Inflammation**, v. 2, p. 63-80, 2005.

MALLA, N.; VALADKHANI, Z.; HARJAI, K.; SHARMA, S.; GUPTA, I. Reactive nitrogen intermediates in experimental trichomoniasis induced with isolates from symptomatic and asymptomatic women. **Parasitology Research**, v. 94, p., 101-105, 2004.

MANNICK, E.E.; OLIVER, P.D.; SADOWSKA-KROWICKA, H.; MILLER, M.J.S. Inhibition of inducible nitric oxide synthase reverse endotoxin tolerance in cultured macrophages. In: MONCADA, S.; STAMLER, J.; GROSS, S.; HIGGS, E.A. **The biology of nitric oxide**. London: ed Portland Press, 1996. 144 p.

MASON, P.R.; FIORI, P.L.; CAPPUCCINELLI, P.; RAPPELLI, P.; GREGSON, S. Seroepidemiology of *Trichomonas vaginalis* in rural women in Zimbabwe and patterns of association with HIV infection. **Epidemiology and Infection**, v. 133, p. 315-323, 2005.

McMORRIS, T.C.; KELNER, M.J.; WANG, W.; DIAZ, M.A.; ESTES, L.A.; TAETLE, R. Acylfulvenes, a new class of potent antitumor agents. **Experientia**, v. 52, p. 75-80, 1996.

McMORRIS, T.C.; STAAKE, M.; KELNER, M.J. Synthesis and biological activity of enantiomers of antitumor irifolven. **Journal of Organic Chemistry**, v. 69, p. 619-623, 2004.

MELLOUK, S.; GREEN, S.J.; NACY, C.A.; HOFFMAN, S.L. IFN-gamma inhibits development of *Plasmodium berghei* exoerythrocytic stages in hepatocytes by an L-arginine-dependent effector mechanism. **Journal of Immunology**, v. 146, p. 3971-976, 1991.

MEYDANI, S.N.; WA, D.; SANTAS, M.S.; HAYEK, M.G. Antioxidants and immune response in aged person: overview of present evidence. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, p. 1462S-1476S, 1995.

MIYAZAKI, T.; NISHIJIMA, M. Studies on Fungal Polysaccharides. XXVII. Structural examination of a water-soluble, antitumor polysaccharide of *Ganoderma lucidum*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, p. 3611-3616, 1981.

MIZUNO, T. The extraction and development of antitumoractive polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 1, p. 9-29, 1999.

MIZUSHINA, Y.; AKIHISA, T.; UKIYA, M.; MURAKAMI, C.; KURIYAMA, I.; XU, X.; YOSHIDA, H.; SAKAGUCHI, K. A novel DNA topoisomerase inhibitor: dehydroebriconic acid, one of the lanostane-type triterpene acids from *Poria cocos*. **Cancer Science**, v. 95, p. 354-360, 2004.

MOTARD, A.; LANDAU, I.; NUSSLER, A.; GRAU, G.; BACCAM, D.; MAZIER, D.; TARGETT, G.A. The role of reactive nitrogen intermediates in modulation of gametocyte infectivity of rodent malaria parasites. **Parasite Immunology**, v. 15, p. 21-26, 1993.

MÜLLER, M.; LOSSICK, J.G.; GORELL, T.E. *In vitro* susceptibility of *Trichomonas vaginalis* to metronidazole and treatment outcome in vaginal trichomoniasis. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 15, p. 17-24, 1988.

NAHREVANIEAN, H. Involvement of nitric oxide and its up/down stream molecules in the immunity against parasitic infections. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 13, p. 440-448, 2009.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural products as a source of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1002-1037, 2003.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 461-477, 2007.

NG, M.L.; YAP, A.T. Inhibition of human colon carcinoma development by lentinan from Shiitake mushrooms (*Lentinus edodes*). **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 8, p. 581-589, 2002.

NGAI, P.H.; WANG, H.X.; NG, T.B. Purification and characterization of a ubiquitin-like peptide with macrophage stimulating, antiproliferative and ribonuclease activities from the mushroom *Agrocybe cylindracea*. **Peptides**, v. 24, p. 639-645, 2003.

NIEDERMEYER, T.H.; LINDEQUIST, U.; MENDEL, R.; GÖRDES, D.; SCHMIDT, E.; THUROW, K.; LALK, M. Antiviral terpenoid constituents of *Ganoderma pfeifferi*. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 1728-1731, 2005.

NUNEZ-ALARCON, J.; PAREDES, J.C.C.; CARMONA, M.T.; QUINONES, M. Ostopanic acid, a cytotoxic fatty acid from *Gymnopilus spectabilis*. **Boletín de la Sociedad Chilena de Química**, v. 46, p. 227-229, 2001.

OHNO, N.; MIURA, N.N.; NAKAJIMA, M.; YADOMAE, T. Antitumor 1,3- β -glucan from cultured fruit body of *Sparassis crispa*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 23, p. 866-872, 2000.

OKAZAKI, M.; ADACHI, Y.; OHNO, N.; YADOMAE T. Structure-activity relationship of (1 \rightarrow 3)-beta-D glucans in the induction of cytokine production from macrophages, *in vitro*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 18, p. 1320-1327, 1995.

OKUMURA, Y.M.C.; BAUM, L.G.; JOHNSON, P.J. Galectin-1 on cervical epithelial cells is a receptor for the sexually transmitted human parasite *Trichomonas vaginalis*. **Cellular Microbiology**, v. 10, p. 2078-2090, 2008.

OLIVEIRA, S.H.P.; FONSECA, S.G.; ROMAO, P.R.T.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Nitric oxide mediates the microbicidal activity of eosinophils. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, p. 233-235, 1997.

PARK, G.C.; RYU, J.S.; MIN, D.Y. The role of nitric oxide as an effector of macrophage-mediated cytotoxicity against *Trichomonas vaginalis*. **Korean Journal of Parasitology**, v. 35, p. 189-195, 1997.

PETRIN, D.; DELGATY, K.; BHATT, R.; GARBER, G. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, p. 300-317, 1998.

PROJAN, S.J. Why is big Pharma getting out of antibacterial drug discovery? **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 427-30, 2003.

QUANG, D.N.; HASHIMOTO, T.; ASAKAWA, Y. Inedible Mushrooms: A Good Source of Biologically Active Substances. **The Chemical Record**, v. 6, p. 79-99, 2006.

ROITT, I.M.; BROSTOFF, J.; MALE, D. Immunology. London: Mosby Publication, 1998. p.132-133, 235, 246, 247,314.

RYU, J.S.; KANG, J.H.; JUNG, S.Y.; SHIN, M.H.; KIM, J.M.; PARK, H.; MIN, Y. Production of interleukin-8 by human neutrophils stimulated with *Trichomonas vaginalis*. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 1326-1332, 2004.

SANG, Y.; BLECHA, F. Antimicrobial peptides and bacteriocins: alternatives to traditional antibiotics. **Animal Health Research Reviews**, v. 9, p. 227-235, 2008.

SANO, M.; YOSHINO, K.; MATSUZAWA, T.; IKEKAWA, T. Inhibitory effects of edible higher Basidiomycetes mushroom extracts on mouse type IV allergy. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 4, p. 37–41, 2002.

SANZEN, I.; IMANISHI, N.; TAKAMATSU, N.; KONOSU, S.; MANTANI, N.; TERASAWA, K.; TAZAWA, K.; ODAIRA Y.; MATANABE, M.; TAKEYAMA, M.; OCHIAI, H. Nitric oxide-mediated antitumor activity induced by the extract from *Grifola frondosa* (Maitake mushroom) in a macrophage cell line, RAW264.7. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 20, p. 591-597, 2001.

SAPARRAT, M.C.; MARGARITA-BUCSINSKY, A.M.; ALFIO-TOURNIER, H.; CABELLO, M.N.; ARAMBARRI, A.M. Extracellular ABTS-oxidizing activity of autochthonous fungal strains from Argentina in solid medium. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 17, p. 64-68, 2000.

SARTI, P.; FIORI, P.L.; FORTE, E.; RAPPELLI, P.; TEIXEIRA, M.; MASTRONICOLA, D.; SANCIU, G.; GIUFFRÉ, A.; BRUNORI, M. *Trichomonas vaginalis* degrades nitric oxide and expresses a flavorubredoxin- like protein: a new pathogenic mechanism? **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, p. 618-623, 2004.

SATOU, T.; KANEKO, K.; LI, W; KOIKE, K. The toxin produced by *Pleurotus ostreatus* reduces the head size of nematodes. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, p. 574-576, 2008.

SAVOIA, D.; DONALISIO, M.; CIVRA, A.; SALVADORI, S.; GUERRINI, R. *In vitro* activity of dermaseptin S1 derivatives against genital pathogens. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, v. 118, p. 674-680, 2010.

SCHEVCHENKO, A.; WILM, M.; VORN, O.; MANN, M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. **Analytical Chemistry**, v. 68, p. 850-858, 1996.

SERHAN, C.N.; SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nature Immunology**, v. 6, p. 1191–1197, 2005.

SHAIO, M.F.; LIN, P.R. Influence of humoral immunity on leukotriene B4 production by neutrophils in response to *Trichomonas vaginalis* stimulation. **Parasite Immunology**, v. 17, p. 127-133, 1995.

SHAIO, M.F.; LIN, P.R.; LEE, C.S.; HOU, S.C.; TANG, P.; YANG, K.D. A novel neutrophil-activating factor released by *Trichomonas vaginalis*. **Infection and Immunity**, v. 60, p. 4475-4482, 1992.

SINGH, B.N.; HAYES, G.R.; LUCAS, J.J.; SOMMER, U.; VISEUX, N.; MIRGORODSKAYA, E.; TRIFONOVA, R.T.; SASSI, R.R.S.; COSTELLO, C.E.; FICHOROVA, R.N. Structural details and composition of *Trichomonas vaginalis*

lipophosphoglycan in relevance to the epithelial immune function. **Glycoconjugate Journal**, v. 26, p. 3-17, 2009.

SLIVA, D. Cellular and physiological effects of *Ganoderma lucidum* (Reishi). **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 4, p. 873-879, 2004.

SONE, Y.; OKUDA, R.; WADA, N.; KISHIDA, E.; MISAKI, A. Structures and antitumor activities of the polysaccharides isolated from fruiting body and the growing culture of mycelium of *Ganoderma lucidum*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 49, p. 2641-2653, 1985.

SONG, H.O.; LIM, Y.S.; MOON, S.J.; AHN, M.H.; RYU, J.S. Delayed human neutrophil apoptosis by *Trichomonas vaginalis* lysate. **Korean Journal of Parasitology**, v. 48, p. 1-7, 2010.

SORIMACHI, K.; AKIMOTO, K.; IKEHARA, Y.; INAFUKU, K.; OKUBO, A.; YAMAZAKI, S. Secretion of TNF- α , IL-8 and nitric oxide by macrophages activated with *Agaricus blazei* Murill fractions *in vitro*. **Cell Structure and Function**, v. 26, p. 103-108, 2001.

SORVILLO, F.; SMITH, L.; KERNDT, P.; ASH, L. *Trichomonas vaginalis*, HIV, and Africans. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, p. 927-932, 2001.

TACHEZY, J.; KULDA, J.; TOMKOVÁ, E. Aerobic resistance of *Trichomonas vaginalis* to metronidazole induced *in vitro*. **Parasitology**, v. 106, p. 31-37, 1993.

TAYLOR-ROBINSON, A.W. Nitric oxide can be released as well as scavenged by haemoglobin: relevance to its antimalarial activity. **Parasite Immunology**, v. 20, p. 49-50, 1998.

TSUKAGOSHI, S.; HASHIMOTO, Y.; FUJII, G.; KOBAYASHI, H.; NOMOTO, K.; ORITA, K. Krestin (PSK). **Cancer Treatment Reviews**, v. 11, p. 131-155, 1984.

UPCROFT, J.A.; DUNN, L.A.; WRIGHT, J.M.; BENAKLI, K.; UPCROFT, P.; VANELLE, P. 5-Nitroimidazole drugs effective against metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis* and *Giardia duodenalis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, p. 344-347, 2006.

VAN DER POL, B.; KWOK, C.; PIERRE-LOUIS, B.; RINALDI, A.; SALATA, R.A.; CHEN, P.L.; VAN DE WIJGERT, J.; MMIRO, F.; MUGERWA, R.; CHIPATO, T.; MORRISON, C.S. *Trichomonas vaginalis* infection and human immunodeficiency virus acquisition in African women. **Journal of Infectious Diseases**, v. 197, p. 548-554, 2008.

VIIKKI, M.; PUKKALA, E.; NIEMINEN, P.; HAKAMA, M. Gynaecological infections as risk determinants of subsequent cervical neoplasia. **Acta Oncológica**, v. 39, p. 71-75, 2000.

WANG, H.X.; NG, T.B.; OOI, V.E.; LIU, W.K.; CHANG, S.T. Actions of lectins from the mushroom *Tricholoma mongolicum* on macrophages, splenocytes and lifespan in sarcoma-bearing mice. **Anticancer Research**, v. 17, p. 419-424, 1997.

WASSER, S.P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, p. 258, 2002.

WASSER, S.P.; WEISS, A.L. Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. **Critical Reviews in Immunology**, v. 19, p. 65-96, 1999.

World Health Organization. Global Prevalence and Incidence of Selected Curable Sexually Transmitted Infections. Overview and Estimates, WHO/HIV_AIDS/2001.02 and WHO/CDS/CSR/EDC/2001.10. World Health Organization, Geneva, 2001.

WRIGHT, J.M.; WEBB, R.I.; O'DONOGHUE, P.; UPCROFT, P.; UPCROFT, J.A. Hydrogenosomes of laboratory-induced metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis* lines are down-sized while those from clinically metronidazole-resistant isolates are not. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 57, p. 171-176, 2010.

YADAV, M.; DUBEY, M.L.; GUPTA, I.; MALLA, N. Nitric oxide radicals in leucocytes and vaginal washes of *Trichomonas vaginalis* - infected symptomatic and asymptomatic women. **Parasitology**, v. 132, p. 339-343, 2006.

ZAIDMAN, B.Z.; YASSIN, M.; MAHAJNA, J.; WASSER, S.P. Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, p. 453-468, 2005.

ZENT, E.L.; ZENT, S.; ITURRIAGA, T. Knowledge and use of fungi by a mycophilic society of the Venezuelan Amazon. **Economic Botany**, v. 58, p.214-226, 2004.

ZHENG, W.; MIAO, K.; LIU, Y.; ZHAO, Y.; ZHANG, M.; PAN, S.; DAI, Y. Chemical diversity of biologically active metabolites in the sclerotia of *Inonotus obliquus* and submerged culture strategies for up-regulating their production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, p. 1237-1254, 2010.

ZHOU, L.D.; ZHANG, Q.H.; ZHANG, Y.; LIU, J.; CAO, Y.M. The shiitake mushroom-derived immuno-stimulant lentinan protects against murine malaria blood-stage infection by evoking adaptive immune-responses. **International Immunopharmacology**, v. 9, p. 455-462, 2009.

ZHOU, X.; LIN, J.; YIN, Y.; ZHAO, J.; SUN, X.; TANG, K. Ganodermataceae: natural products and their related pharmacological functions. **American Journal of Chinese Medicine**, v. 35, p. 559-574, 2007.

ZJAWIONY, J.K. Biologically active compounds from Aphylllophorales (polypore) fungi. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 300-310, 2004.

8.1 Anexo 1

Análise da homologia da amaurocina com proteínas de fungos

A análise da homologia entre proteínas com alguma identidade quando pareadas com os 39 peptídeos, resultantes da análise MS/MS da amaurocina, foi realizada utilizando a ferramenta BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov). Para comparar as 13 proteínas com maior similaridade com os peptídeos foi utilizando o *software* BioEdit, resultando nos dados abaixo.

AF426026.1 - heat shock protein 60 de *Piromyces* sp. E2

	10	20	30	40	50	
HSP 60 <i>Piromyces</i> sp.	MLSLRQETSK	IVCQNILKNG	ISSRIGSASR	SVLSRRNYAA	KDIMFSEDGR	50
Amaurocina 1	-----	-----	-----	-----	-----	1
	60	70	80	90	100	
HSP 60 <i>Piromyces</i> sp.	AKLAKGVNTL	AKAVSVTLGP	KGRNVLIDNQ	YGLPKITKDG	VTVAKSVALK	100
Amaurocina 1	-----	-----	-----	-----	-----	1
	110	120	130	140	150	
HSP 60 <i>Piromyces</i> sp.	DRFENLGARI	VQDVAIKTND	YAGDGTTTAT	VLARAIFAEG	LKNVQAGINP	150
Amaurocina 1	-----	-----	-----	-----	VTAGMNP	7
	160	170	180	190	200	
HSP 60 <i>Piromyces</i> sp.	MDLRKGVQMA	VDEVVKFLKE	NKREIKTKKE	IAQVGTISAN	NDKHIGNMLA	200
Amaurocina 1	MDL-----	-----	-----	-----	-----MIA	13
	210	220	230	240	250	
HSP 60 <i>Piromyces</i> sp.	EAMEKVGKDG	VITIQEGRTM	KDELVVTKGM	SFKRQGFISS	YFITDIKKQK	250
Amaurocina 1	DAMDKVCK--	-----	-----	-----	-----	21
	260	270	280	290	300	
HSP 60 <i>Piromyces</i> sp.	CEFKNPLILI	CDQRISAIQD	VIPALEIAAE	NRRPILIVAE	DIEGEALAAC	300
Amaurocina 1	-----	-----	-----	-----	-----	21
	310	320	330	340	350	
HSP 60 <i>Piromyces</i> sp.	ILNKIRGQVQ	VCCVRSPSFG	DNRRETIKDL	GILVKGNVFN	NEVENSLDKV	350
Amaurocina 1	-----	-----	-----	-----	-----	21
	360	370	380	390	400	
HSP 60 <i>Piromyces</i> sp.	EIGMLGTCDT	VTVTKDDTVF	INGAGSKEEI	EKRCNAIREA	IATTDSEFEK	400
Amaurocina 1	-----	-----	-----	-----	-----	21
	410	420	430	440	450	
HSP 60 <i>Piromyces</i> sp.	KNLRERLAKL	TGGVALAKVG	GVSEVDVNEK	IDRFVDALCA	TQAAVEEGIV	450
Amaurocina 1	-----	-----	-----	-----	-----	21
	460	470	480	490	500	
HSP 60 <i>Piromyces</i> sp.	PGGGTALLKA	SKVLEKLHAD	SFDVQLGIDI	VKKAIKVPIQ	TIVNNAGGEG	500
Amaurocina 1	-----	-----	-----	-----	-----	21

ACR78140.1 - predicted cytochrome P450 de *Beauveria bassiana*

	10	20	30	40	50	
Cyt. P450 <i>Beauveria bassiana</i>	MPPAIPITTI	SSSLGAAVVV	FTAGEPTKVL	GLEVFVVLWA	AQFVTWGFY	50
Amaurocina 2	-----	-----	-----	-----	-----	1
	60	70	80	90	100	
Cyt. P450 <i>Beauveria bassiana</i>	MFIYPPFISP	LRLKLPTRGW	RNSHKLEAE	PRVFSKLMPS	NRIAETANEG	100
Amaurocina 2	-----	-----	-----	-----	-----	1
	110	120	130	140	150	
Cyt. P450 <i>Beauveria bassiana</i>	FIRIYGAFHR	EYLIVTSPQA	LGEVLVSKAY	EFEKPPITIRG	FFGPVLGHGL	150
Amaurocina 2	-----	-----	-----	-----	-----	1
	160	170	180	190	200	
Cyt. P450 <i>Beauveria bassiana</i>	VLAEGHDHKV	QRRNLMPAFA	FRHIKDLYPL	FWRKTCDDVQ	VMAKECDADG	200
Amaurocina 2	-----	-----	-----	-----	-----	1
	210	220	230	240	250	
Cyt. P450 <i>Beauveria bassiana</i>	YAEFEVGHWA	GRVSLDIIGV	ADLGRDFNAT	HNEDEIVKT	YMLITPTMQ	250
Amaurocina 2	-----	-----	-----	-----	-----	1
	260	270	280	290	300	
Cyt. P450 <i>Beauveria bassiana</i>	DRLLLVMADF	LTAFPMSIL	LHSPIPRAIE	AKGAACKIRD	VCKDVIRLKR	300
Amaurocina 2	-----	-----	-----	-----	-----	1
	310	320	330	340	350	
Cyt. P450 <i>Beauveria bassiana</i>	QKLADSKLED	VDILSIALRS	GMFSEELIN	HMMTFLGAGH	ETTASALSFA	350
Amaurocina 2	-----	--ALSIALR--	-----	-----	-----	7
	360	370	380	390	400	
Cyt. P450 <i>Beauveria bassiana</i>	IYAMCRHPEV	QTRLRQEVRA	NLPPPVGDDG	REITSMEIDR	LPYLAAVCSE	400
Amaurocina 2	-----	-----	-----	-----	-----	7
	410	420	430	440	450	
Cyt. P450 <i>Beauveria bassiana</i>	VLRMYSVPVQ	TIRETVRDTT	IQQPLPRGT	RLLLVPAWATN	LDTRFWGSDG	450
Amaurocina 2	-----	-----	-QGRPLPR-	-----	-----	14
	460	470	480	490	500	
Cyt. P450 <i>Beauveria bassiana</i>	GEFKPERWLV	ARGGDEDED	GLGGRAASVK	AASVGCASSN	YVFLSFLHGP	500
Amaurocina 2	-----	-----	-----	-----	-----	14
	510	520	530	540	550	
Cyt. P450 <i>Beauveria bassiana</i>	RSCIGQSEFAK	AEFACLLAAW	VGRFEFALRD	EAMMDEANVM	FEQMVTAKVA	550
Amaurocina 2	-----	-----	-----	-----	-----	14
	560					
Cyt. P450 <i>Beauveria bassiana</i>	GGIHDRARAV	PGW				563

EFQ29347.1 - hypothetical protein GLRG 04491 de *Glomerella graminicola*

```

      10      20      30      40      50
GLRG_04491 Glomerella graminicola MAHRLVAKTG VDLEALSPRD ANALRMPKAI EMKTSKPVVQ LKAAKDKEPP 50
Amaurocina 3 ----- V-VEALSPR- ----- I SYQSS----- 14

      60      70      80      90     100
GLRG_04491 Glomerella graminicola PQQPASVVEEP PASDRPNGAV YQVGKMLGKG GFAVCYTGYP LPDRKKYALK 100
Amaurocina 3 -----STEE----- 18

      110     120     130     140     150
GLRG_04491 Glomerella graminicola IVRSQMPSKM QQKFQTEIQI HSKMNHKNIV QFFRAFSFHD CMYLVLELCT 150
Amaurocina 3 ----- 18

      160     170     180     190     200
GLRG_04491 Glomerella graminicola NGLSLDMVKK RKGLTEPEVR FYSVQVAGAI KYMHGKGIH RDLKMGNIPL 200
Amaurocina 3 ----- 18

      210     220     230     240     250
GLRG_04491 Glomerella graminicola DHRMNAKVDG FGLAALLVTG RDMQTIRRTT LCGTPNYIAP EILQKGGKGH 250
Amaurocina 3 ----- 18

      260     270     280     290     300
GLRG_04491 Glomerella graminicola DHAVDIWSLG IIMFAMLTSK PPFQSTSTEE IYRRARERDY EWPNPETSQK 300
Amaurocina 3 ----- 18

      310     320     330     340     350
GLRG_04491 Glomerella graminicola YISEEAKDCV ATMLEADAMR PEPDVIVQHP FFTCGYMPVE ADMTTRLLTL 350
Amaurocina 3 ----- 18

      360     370     380     390     400
GLRG_04491 Glomerella graminicola PPDRSEFYAD RMSSQLQAVS KKNMEDMCRE CGVGPLAPVQ VIHTQTWKEM 400
Amaurocina 3 ----- 18

      410     420     430     440     450
GLRG_04491 Glomerella graminicola AAEEKSGLTP MIPLGEDVVY RPFDDWLREK RHARALAASS STRSDATSES 450
Amaurocina 3 ----- 18

      460     470     480     490     500
GLRG_04491 Glomerella graminicola HLSGSQTAPT GLFRQPPQSF AAQQRQNRP PAVASTVRSR PQEVAVQPA 500
Amaurocina 3 ----- 18

      510     520     530     540     550
GLRG_04491 Glomerella graminicola EVARPRSVRQ FSAPESRNQL SEPPLRKSTA VRRTPLEPTQ STGSLPSHAM 550
Amaurocina 3 ----- 18

      560     570     580     590     600
GLRG_04491 Glomerella graminicola APQSSNQPTV TMTGLENLTK ISSDQTEKAS LFSPTCEPET VAGSKPDVVL 600

```

EFW98693.1 - heat shock protein mitochondrial precursor de *Grosmannia clavigera*

		10	20	30	40	50	
HSP mit. prec. <i>Grosmannia clav</i>		MASSKPTSAK	KPNRRPKTP	SPSKATRVSK	TPKGKMSKA	AAAVLRAASA	50
Amaurocina 4		-----	-----	-----	-----	-----	1
		60	70	80	90	100	
HSP mit. prec. <i>Grosmannia clav</i>		EFEDSSSEDS	IETPQKSTPS	KRRKGKNRSS	DAGKEISSPK	TPQKSKASRK	100
Amaurocina 4		-----	-----	-----	-----	-----	1
		110	120	130	140	150	
HSP mit. prec. <i>Grosmannia clav</i>		KQKKVWPFTH	VPARMDERSK	NGRHEGRNLI	VWTRPRMAEK	FLHLQYEIA	150
Amaurocina 4		-----	-----	-----	-----	-----	1
		160	170	180	190	200	
HSP mit. prec. <i>Grosmannia clav</i>		RHKIDVPWDS	IAHRMHPGSS	GSALLQFLNR	LRAVLIAGEH	LIPPPLPKPG	200
Amaurocina 4		-----	-----	-----	-----	-----	1
		210	220	230	240	250	
HSP mit. prec. <i>Grosmannia clav</i>		SRQVVDPTIR	GYVRDDMGGP	DAVTTRPVPF	SEPMEDRRYN	LPDAFEANQT	250
Amaurocina 4		-----	-----	-----	-----	-----	1
		260	270	280	290	300	
HSP mit. prec. <i>Grosmannia clav</i>		RAFLGSARKR	VTVKQSDPDP	ADLDGDADYT	PEMSDPFLST	PVHMSASSGS	300
Amaurocina 4		-----	-----	-----	-----	-----	1
		310	320	330	340	350	
HSP mit. prec. <i>Grosmannia clav</i>		VAGAMLHSM	ASPVSYMSAD	ALPSSALYYG	MATEAAGYIP	PFDHGMVSSP	350
Amaurocina 4		-----	-----	-----	-----	-----	1
		360	370	380	390	400	
HSP mit. prec. <i>Grosmannia clav</i>		AVVDHSFAAQ	GGMTGFEQAY	ANDGMDGEYD	QLFTRPADSS	RSVFTMGEQA	400
Amaurocina 4		-----	-----	-----	-----	-----	1
		410	420	430	440	450	
HSP mit. prec. <i>Grosmannia clav</i>		GATYWRQAIV	FPGLETEAPA	DQPGKSGGGA	DEGLCALERD	GLQLQLESQD	450
Amaurocina 4		-----	-----	-----	-----	-----	1
		460	470	480	490	500	
HSP mit. prec. <i>Grosmannia clav</i>		GGVQAAANLGV	GVHVIEAELG	AETEAGEAGIQ	GDEGGVGGGG	NRVHLLPQGS	500
Amaurocina 4		-----	-----	-----	-----	-----	1
		510	520	530	540	550	
HSP mit. prec. <i>Grosmannia clav</i>		RKDLQQTIVQL	QGLVMEGVVV	DTGVDVRRMR	SREKRRRSF	LRRILEPASG	550

EFY84374.1 - Heat shock protein 60 precursor (Antigen HIS-62) de *Metharizium acridum* CQMa 102

```

          10          20          30          40          50
HSP 60 Metharizium acridum  MQRALSSRAR ATALSSAASR YRAGAGLGQQ LRFFAHKELKLF GVEGRAALLA 50
Amaurocina 5                -----
          60          70          80          90         100
HSP 60 Metharizium acridum  GVDTLAKAVA TTLGPKGRNV LIESSFGSPK ITKDGVTVAK AVSLKDKFEN 100
Amaurocina 5                -----
          110         120         130         140         150
HSP 60 Metharizium acridum  LGARLLQDVA SKTNDVAGDG TTTATVLARA IFSETVKNVA AGCNPMDLRR 150
Amaurocina 5                -----VT AGMNPMDL-- 10
          160         170         180         190         200
HSP 60 Metharizium acridum  GIQAAVDSVV EYLHKHKRDI TTSAEIAQVA TISANGDQHV GQMIANAMEK 200
Amaurocina 5                -----MIADAMDK 18
          210         220         230         240         250
HSP 60 Metharizium acridum  VGKEGVITVK EGKTMQDELE VTEGMRFDRG FVSPYFITDT KAQKVEFENP 250
Amaurocina 5                VGK----- 21
          260         270         280         290         300
HSP 60 Metharizium acridum  LILLSEKKIS AVQDIIPALE ISTQTRRPLV IIAEDIDGEA LAVCILNKLR 300
Amaurocina 5                ----- 21
          310         320         330         340         350
HSP 60 Metharizium acridum  GQLQVAAVKA PGFGDNRKSI LGDIGVLTKG TVFTDELDIK LEKATIDMLG 350
Amaurocina 5                ----- 21
          360         370         380         390         400
HSP 60 Metharizium acridum  STGSITITKE DTIILNGEGS KDAISQRCEQ IRGVAADPTT SEYEKEKLQE 400
Amaurocina 5                ----- 21
          410         420         430         440         450
HSP 60 Metharizium acridum  RLAKLSGGVA VIKVGSSEV EVGEKKDRFV DALNATRAAV EEGILPGGGT 450
Amaurocina 5                ----- 21
          460         470         480         490         500
HSP 60 Metharizium acridum  ALIKASAQAL GDVKAANFDQ QLGVNIVKNA ITREPARTIIE NAGMEGSVVI 500
Amaurocina 5                ----- 21
          510         520         530         540         550
HSP 60 Metharizium acridum  GKLTDEHAAD FNRGFDSAKG EYVDMIEAGI LDPLKVVRTG LIDASGVASL 550

```


EFY96872.1 - Heat shock protein 60 (Antigen HIS-62) de *Metarhizium anisopliae*
ARSEF 23

```

      10      20      30      40      50
HSP 60 Metarhizium anisopliae MQRALSSRRARATALSSAASRYRAGAGLGQQLRFAHKELKFGVEGRAALLA 50
Amaurocina 7 ----- 1

      60      70      80      90     100
HSP 60 Metarhizium anisopliae GVELLAKAVATTLGPKGRNVLISSFGSPKIKDGVTVAKAVSLKDKFEN 100
Amaurocina 7 ----- 1

     110     120     130     140     150
HSP 60 Metarhizium anisopliae LGARLLQDVASKTNDVAGDGGTTTATVLRARIFSETVKNVAAGCNPMDLRR 150
Amaurocina 7 -----VTAGMNPMDL-- 10

     160     170     180     190     200
HSP 60 Metarhizium anisopliae GIQAAVDSVVEYLLHKHKRDITTSAEIAQVATISANGDHHVGMIANAMEK 200
Amaurocina 7 -----MIADAMDK 18

     210     220     230     240     250
HSP 60 Metarhizium anisopliae VGKEGVITVKEGKTMQDELEVTEGMRDRGFVSPYFITDTKAQKVEFENP 250
Amaurocina 7 VGK----- 21

     260     270     280     290     300
HSP 60 Metarhizium anisopliae LILLSEKKISAVQDIIPALEISTQTRRPLVITAEIDIDGEALAVCILNKLK 300
Amaurocina 7 ----- 21

     310     320     330     340     350
HSP 60 Metarhizium anisopliae GQLQVAAVKAPGFGDNRKSIILGDIQVLTGKTVFTDELDIKLEKATIDMLG 350
Amaurocina 7 ----- 21

     360     370     380     390     400
HSP 60 Metarhizium anisopliae STGSITITKEDTIVLNGEGSKDAISQRCQIRGVAADPTTSEYEKEKLQE 400
Amaurocina 7 ----- 21

     410     420     430     440     450
HSP 60 Metarhizium anisopliae RLAKLGGGVAVIKVGGSSSEVEVGEKKDRFVDALNATRAAVEEGILPGGGT 450
Amaurocina 7 ----- 21

     460     470     480     490     500
HSP 60 Metarhizium anisopliae ALIKASAQALGDVKAANFDQRLGVNIVKNAITRPARTIENAGLEGSVVI 500
Amaurocina 7 ----- 21

     510     520     530     540     550
HSP 60 Metarhizium anisopliae GKLTDEHAADFNRFDSAKGEYVDMIESGILDPLKVVRTGLIDASGVASL 550
Amaurocina 7 ----- 21

     560     570     580
HSP 60 Metarhizium anisopliae LGTTEVAIVESEFDEKGPAGPPMGGMGGMGGMM 584
Amaurocina 7 ----- 21

```


XP 001816864.2 - hypothetical protein AOR_1_648184 de *Aspergillus oryzae*
RIB40

```

      10      20      30      40      50
AOR Aspergillus oryzae MPPANSPSQNTPHSPSASSLQQLSVISTPLPSLPASVSDDAHDDNVSFRLR 50
Amaurocina ----- 1

      60      70      80      90     100
AOR Aspergillus oryzae SRVRSPPDSSSSLSRQRRRRQQTLPLELDPMDVDDPAALRMSVEINRRIP 100
Amaurocina ----- 1

     110     120     130     140     150
AOR Aspergillus oryzae VRREHDSNSNSNNNSNSMPNYEGRISNPRSLYGWAPASDDDEEDHDMTYG 150
Amaurocina ----- 1

     160     170     180     190     200
AOR Aspergillus oryzae FLQDGNITSSWFGRLSDRNAFRPMPRRDPVAQDPHTFLEAPPESNTQRLS 200
Amaurocina ----- 1

     210     220     230     240     250
AOR Aspergillus oryzae DHSPLSTTEALLQSVRRQPRFSRTRTLHNYLLDRERASQDLEESRERSGT 250
Amaurocina ----- 1

     260     270     280     290     300
AOR Aspergillus oryzae AATSRAYRFLPSNRGEPHRLLTTHNELRARINAHRQLHLDNPPSPRLKETI 300
Amaurocina ----- 1

     310     320     330     340     350
AOR Aspergillus oryzae KYLDRLRYSSSFEEISLTSAAAGGFVRLDFLPWDEDDFILD TASIAPPPTC 350
Amaurocina ----- 1

     360     370     380     390     400
AOR Aspergillus oryzae SWLQPGMVFSGSQRAASSANSFSAPRVSSPPSSHDPLIVNGSEQSGSRIP 400
Amaurocina ----- 1

     410     420     430     440     450
AOR Aspergillus oryzae VQTTSGRRYMANNIYNLGTGRDENWPVKVTIHNINPEEMTSLSGTMEAYNI 450
Amaurocina ----- 1

     460     470     480     490     500
AOR Aspergillus oryzae PDKTSPSHDAHIVTFLEGEIIDFNHTLETKNFKADAEIDCTYWRELQPF 500
Amaurocina ----- 1

     510     520     530     540     550
AOR Aspergillus oryzae KNLSDDAMTRSLVSRKWIIEELSKGWILMRWKEKRCFITPTDSRQGLTISG 550
Amaurocina ----- 1

     560     570     580     590
AOR Aspergillus oryzae FYYISLHRESGHIIEGLYYDPGSSPYQQLSLKPEKRMVRPSYSFR 595
Amaurocina ----- 17
-F..N...-VS-----D.E--D.S-----

```

XP 002549932.1 - conserved hypothetical protein de *Candida tropicalis* MYA-3404

```

      10      20      30      40      50
CHP Candida tropicalis  MSQYIGKTIISLISNKGLRYVGLLENINADDATVALKSVRLFTEGRMAAM 50
Amaurocina             ----- 1

      60      70      80      90     100
CHP Candida tropicalis  GQPHLEVSPGVVDVYVVFVFRGSDVKDLSVLDTPIDEVKPNIYRPPQQQQQ 100
Amaurocina             ----- 1

     110     120     130     140     150
CHP Candida tropicalis  QPTPTTGQYYSGPPSTTTANGAPQTQAPVTTTTTATSAQSPVQSSVSQTTN 150
Amaurocina             ----- 1

     160     170     180     190     200
CHP Candida tropicalis  VPAASPGOVAQAPVETGPIPEAQVQNPAPTRTIDEEPLTKTVSENKPADA 200
Amaurocina             ----- 1

     210     220     230     240     250
CHP Candida tropicalis  QPGSVPQPAATQKPRRESKLDIPPEEFDFEQANAKFSKELEQERELEHTG 250
Amaurocina             -----FDFEQA-----KKIS----- 10

     260     270     280     290     300
CHP Candida tropicalis  YNKSSSFFDNISSTEERTNMRWSEERNLNMDTFGEASLQRGGRGGRGGR 300
Amaurocina             YQ-----SSSTEE----- 18

     310     320     330     340
CHP Candida tropicalis  GRGGRGNWRGRGGNYRGRGNWGGNNNRGRNSDYNTKPEWA 343
Amaurocina             ----- 18

```

XP 002552768.1 - KLTH0D01012p de Lachanea thermotolerans

```

          10          20          30          40
KLTH Lachanea thermotolerans  M I R T C A Q S T L R A S S R L S A I S P R L F L R A Q S S N A L T K T Q P P F 40
Amaurocina 11                ----- 1

          50          60          70          80
KLTH Lachanea thermotolerans  T F S K S G P S S V K Y T S Q H E W I A A H Q D G T A F V G I T K Y A A D A L G 80
Amaurocina 11                ----- 1

          90          100         110         120
KLTH Lachanea thermotolerans  D A T Y I E L P E A D S E L E A G D S L G S V E S V K S A S E V Y Q P L A G T V 120
Amaurocina 11                -----F Q N D L A D -----M G K I D -----V 13

          130         140         150         160
KLTH Lachanea thermotolerans  L E G N E S --- L N D T P Q L I N E D P M G E G W I A K V R L N D L A D M N G 157
Amaurocina 11                L E G -----N E --Q F I N ----- 22

          170
KLTH Lachanea thermotolerans  E E L M S L E Q Y E E S L K E D H 174
Amaurocina 11                ----- 22

```

XP_002844749.1 - transcription-associated protein 1 de *Arthroderma otae* CBS 113480

```

Amaurocina 12 ----- 1
      1860      1870      1880      1890      1900
TAP Arthroderma otae SYIRLEDTVNKYGAYVLISYFIAHYETPSKIVVQIYVALLRAHQNEGKSL 1900
Amaurocina 12 ----- 1

      1910      1920      1930      1940      1950
TAP Arthroderma otae VTQALELILAPSLPKRILSGPDRFPVWARWPRRILTEETANLQQVMSILQ 1950
Amaurocina 12 ----- 1

      1960      1970      1980      1990      2000
TAP Arthroderma otae FLVRQPDFLYEARENFIPLIIPSLVKIAGPNNLSFDSRKLVLHLVTLIWT 2000
Amaurocina 12 ----- 1

      2010      2020      2030      2040      2050
TAP Arthroderma otae WEEKRVTGRRDPASPNSMKRKLADMEMQASPSMSTPLPPKERPEYTIPL 2050
Amaurocina 12 ----- -QKPAPP----- 6

      2060      2070      2080      2090      2100
TAP Arthroderma otae DLRTPLVKYLVTFVCSLVDRFVSPAAARFRELPPKPHHAALGNYGEICKK 2100
Amaurocina 12 ----- -VKFLG-----KLTIPVQR----- 19

      2110      2120      2130      2140      2150
TAP Arthroderma otae SVVLLRRFLSPEYWPDVDDIDLYQVLEPILCGEKADKPKDEKHTAMINTL 2150
Amaurocina 12 ----- 19

      2160      2170      2180      2190      2200
TAP Arthroderma otae QVLRLLLATKPNWILDRMSTIQHLVEKALRSDNPEIQDCLHGGEENMDI 2200
Amaurocina 12 ----- 19

      2210      2220      2230      2240      2250
TAP Arthroderma otae SPKLPPPDKRVLDALPQEEPSEEEGMDVDKPSSEFVTFLLSTVATESISS 2250
Amaurocina 12 ----- 19

      2260      2270      2280      2290      2300
TAP Arthroderma otae GNYMAGINILWTLKQCPAEMDQHIPHVMKIFSQKLAKDHVAAYINTQSA 2300
Amaurocina 12 ----- 19

      2310      2320      2330      2340      2350
TAP Arthroderma otae ASRAMEQQIQVPPPHDLEVGIDLISKTIIDLIVRMSNLGDQRRPFLSVLA 2350
Amaurocina 12 ----- 19

      2360      2370      2380      2390      2400
TAP Arthroderma otae QLVERSQNIPLCTKILGMVENWIFQPTESWPTLKEKTAVLHKMLLFESRA 2400
Amaurocina 12 ----- 19

      2410      2420      2430      2440      2450
TAP Arthroderma otae DSTMLGKFELELVIRVYEDPKITRTELTVRLEHAFLLIGTRAQDVMRTRFM 2450
Amaurocina 12 ----- 19

```

XP 003073992.1 - polar tube protein 3 de *Encephalitozoon intestinalis* ATCC 50506

```

      10      20      30      40      50
PTP Encephalitozoon intestinal  MLLFLLCLYNMEVRSETKVSPDAIHRSKEANTCKGMDYGNRSTRNARIKM 50
Amaurocina 13 ----- 1

      60      70      80      90     100
PTP Encephalitozoon intestinal  KVHSRHDDDSNRRVHRTHKGGHRKYGGSIKPHNKNHEKILRNMMINSHGN 100
Amaurocina 13 ----- 1

     110     120     130     140     150
PTP Encephalitozoon intestinal  NPENLSHEEKDLANMAAHGNLDALDMLYNDGSITPDVAEDVESSILGSPS 150
Amaurocina 13 ----- 1

     160     170     180     190     200
PTP Encephalitozoon intestinal  ARPATVAPLESELVSVETPPDYSNPEETYFSGGVATGRTNKEQAEINALT 200
Amaurocina 13 ----- 1

     210     220     230     240     250
PTP Encephalitozoon intestinal  YNESPIDDEIPENAYSSLVLMGHSVPVAQGVADEIKDANAKKALRKKRAN 250
Amaurocina 13 ----- 1

     260     270     280     290     300
PTP Encephalitozoon intestinal  TISQPLVNPSYIPQALKIVNSKDVSEADRDMLVKSVYEKYIEKGSPE 300
Amaurocina 13 ----- 1

     310     320     330     340     350
PTP Encephalitozoon intestinal  EKAGFEAYQAGFLIDKYNEALASGLSEVAYAKAMSLADLNYQHATRSAA 350
Amaurocina 13 ----- 1

     360     370     380     390     400
PTP Encephalitozoon intestinal  IAGGGQTAAQSAEDRSLIEEKNAREIVRTPSGLRPKALKKKEEEINEKRL 400
Amaurocina 13 ----- 14
                    MEDGELIQ-----AREIVR-----

     410     420     430     440     450
PTP Encephalitozoon intestinal  ERARDISDYLSKVHITEPINRALQKLSQAAALKEAASVEGLSNPVQEKI 450
Amaurocina 13 ----- 14

     460     470     480     490     500
PTP Encephalitozoon intestinal  LTDVAISSAEDLAKAHENLENAKAQLKPRGRKTNALNFLSKVSTEKAIEE 500
Amaurocina 13 ----- 14

     510     520     530     540     550
PTP Encephalitozoon intestinal  MNRRNEEMQNEAIRVQKEANENNAVKEAEEHLAKAAEQEIINNEKSAFT 550
Amaurocina 13 ----- 14

     560     570     580     590     600
PTP Encephalitozoon intestinal  KVFESTGDIMQAEKAREEAEKITEETLNHEREVRKEEVMKMLGPMGMNDS 600
Amaurocina 13 ----- 14

     610     620     630     640     650

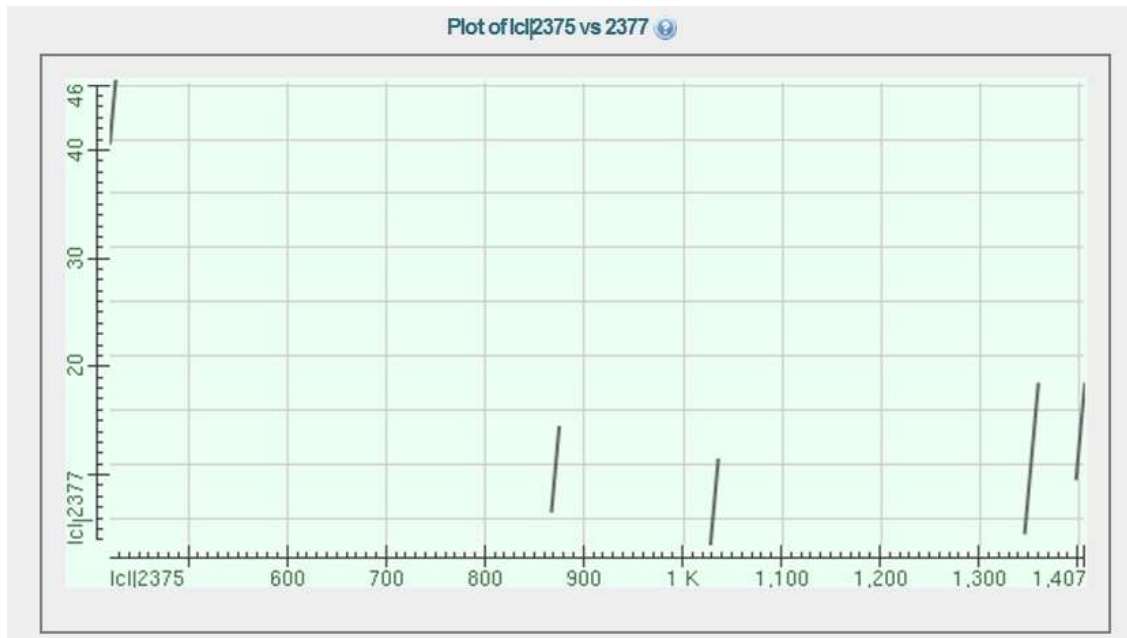
```


8.2 Anexo 2

Análise da homologia da amaurocina com proteínas de fungos do filo Basidiomycota que possuem genoma sequenciado

A análise da homologia entre proteínas com alguma identidade quando pareadas com os 39 peptídeos resultantes da análise MS/MS da amaurocina foi realizada utilizando a ferramenta BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov). As 10 proteínas com maior similaridade foram pareadas com os respectivos peptídeos agrupados de forma quimérica utilizando a ferramenta BLAST *2sequence*, resultando nos dados abaixo. Os gráficos indicam as regiões de similaridade baseadas nos resultados do BLAST. A sequência da proteína (*query sequence*) é representada no eixo X e os números representam os resíduos de aminoácidos da proteína. Os peptídeos resultantes agrupados de forma quimérica (*subject*) estão representados no eixo Y e os números representam seus respectivos resíduos de aminoácidos. As linhas no gráfico representam os alinhamentos. Os alinhamentos encontrados pelo BLAST descritos abaixo do gráfico estão representados no mesmo. *Query*: sequência da proteína; *Sbjct*: (*subject*) sequência dos peptídeos agrupados de amaurocina. +: Aminoácidos com propriedades físico-químicas semelhantes. Cabe salientar que o *software* apresenta as figuras com escalas distintas.

EFP78715.1 - ATPase de *Puccinia graminis*



Query 421 RQMNP 426
 RQM PM
 Sbjct 41 RQMP 46

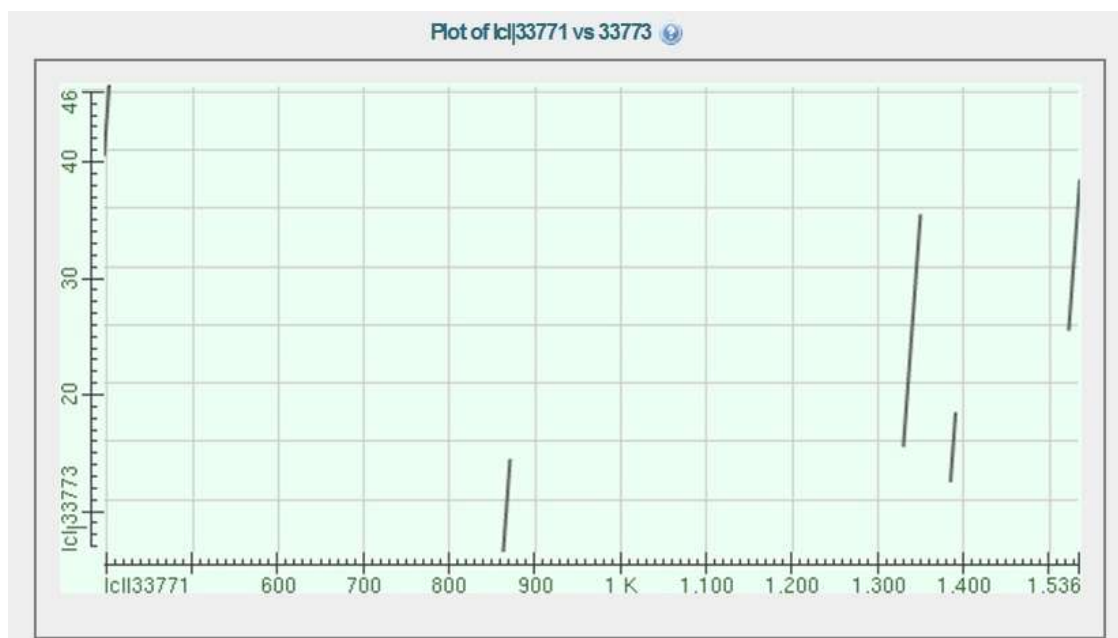
Query 868 VATGDKLE 875
 +ATGDK +
 Sbjct 7 IATGDKFD 14

Query 1399 GRGFNFDQA 1407
 G F+F+QA
 Sbjct 10 GDKFDFEQA 18

Query 1029 AQTLAIGD 1036
 A T+A GD
 Sbjct 4 ADTIATGD 11

Query 1347 DEPSTGNKKQDEPA 1360
 D +TG+K E A
 Sbjct 5 DTIATGDKFDFEQA 18

EFP78722.1 - P-type ATPase de *Puccinia graminis*



```

Query  398  RQMNPM  403
          RQM PM
Sbjct  41   RQMTPM  46
    
```

```

Query  864  VATGDKLE  871
          +ATGDK +
Sbjct  7    IATGDKFD  14
    
```

```

Query  1386  FNFDQA  1391
          F+F+QA
Sbjct  13   FDFEQA  18
    
```

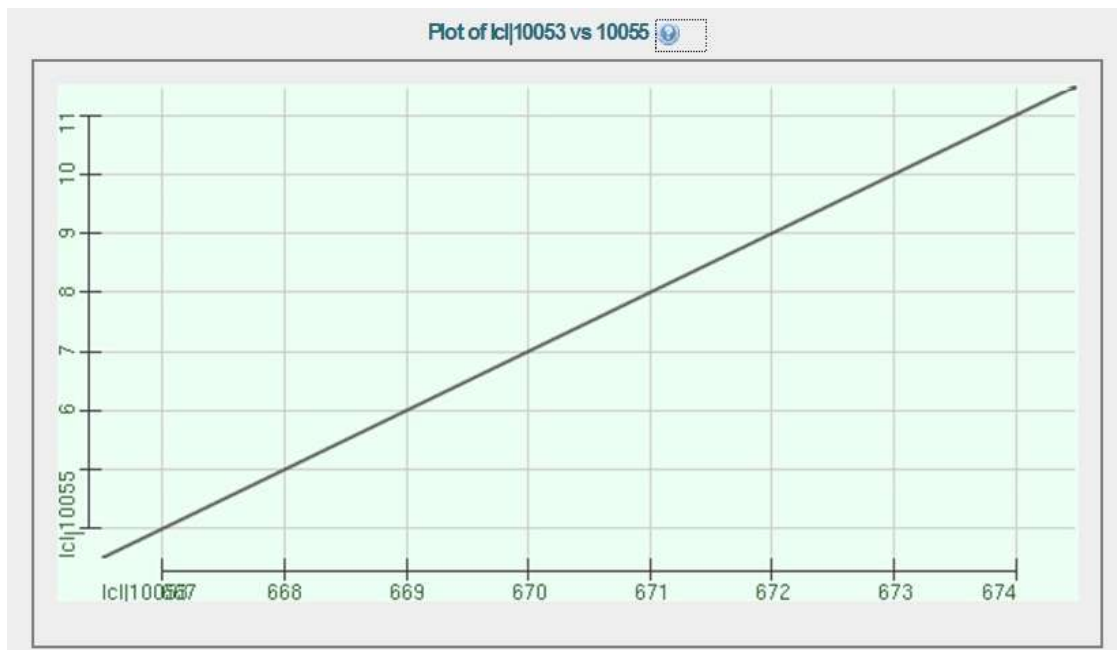
```

Query  1524  MDPLRRRTVSDLP  1536
          M+P+ + D+P
Sbjct  26   MNPMDLKMGIDVP  38
    
```

```

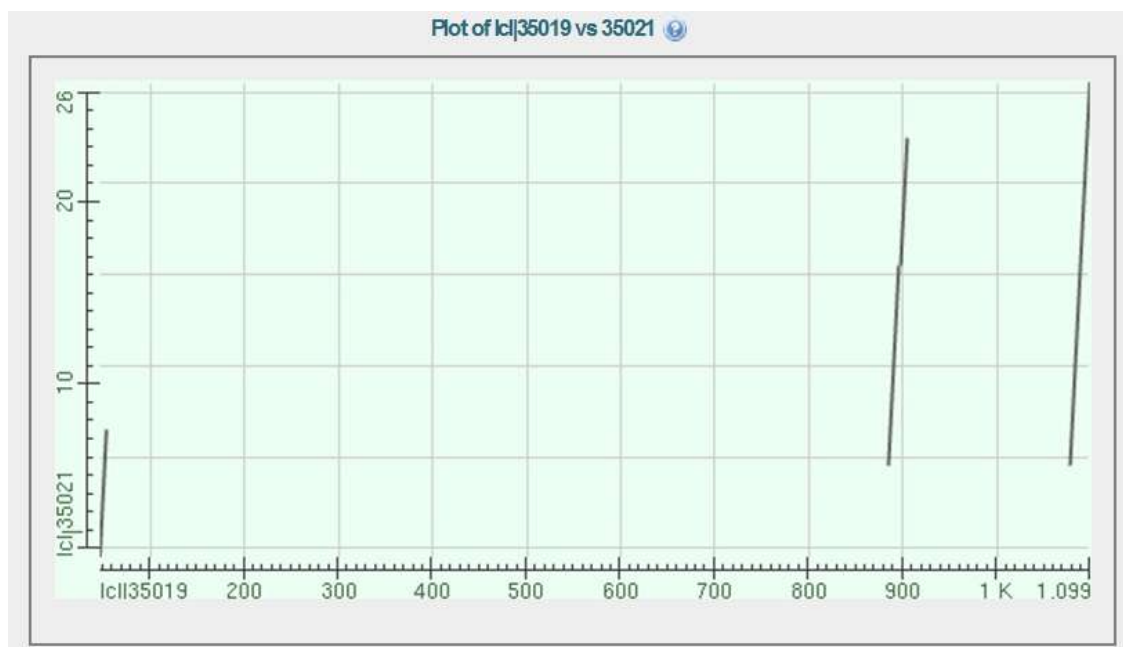
Query  1331  EKEVQKTTDGANDEKQPLGI  1350
          E+ + T G N +GI
Sbjct  16   EQAKKGVTAGMNPMDLKMG  35
    
```

EFP84186.1 - cobalt import ATP-binding protein cbiO 2 de *Puccinia graminis*



Query667 APILILDE 674
AP+DE
Sbjct4 APDKTMDE 11

EFP84527.1 - ATP-dependent DNA helicase de *Puccinia graminis*



```

Query  886  NRFPSALLPNNKTASQDLEE  905
          +R  AL P +   SQDLE+
Sbjct  6    SRVVEALSPRH--VSQDLED  23
    
```

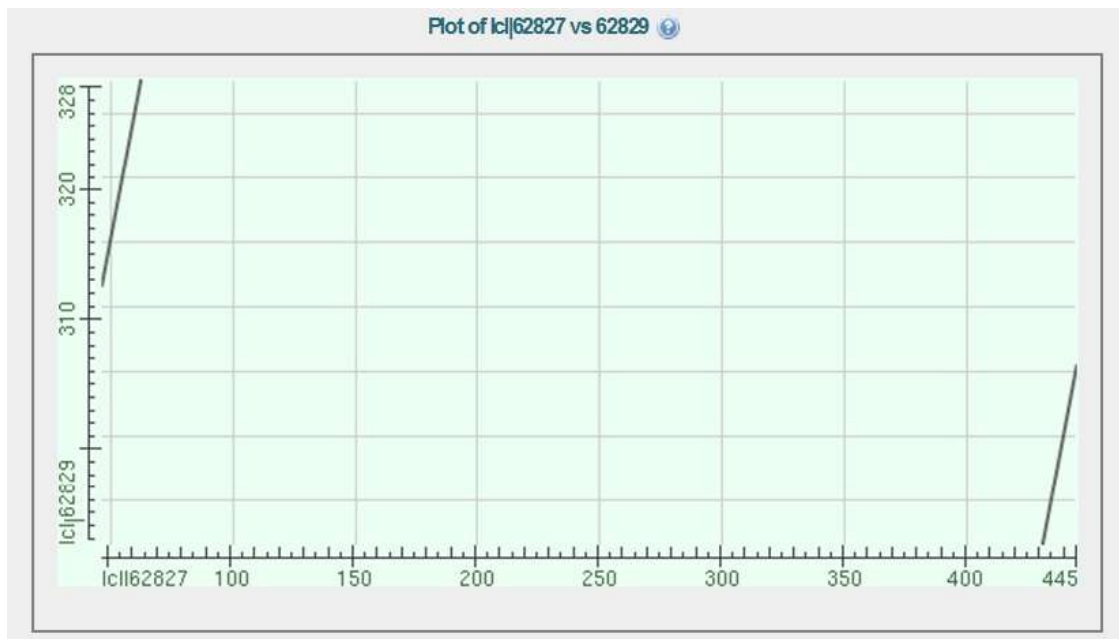
```

Query 48  DSVVLSR  54
          D+VV+SR
Sbjct1  DAVVISR  7
    
```

```

Query 1079 AQIIVALSDHASKFDNFENQLR 1099
          ++++ ALS      D E  +R
Sbjct6   SRVVEALSPRHVSQDLEDSSR  26
    
```

AAQ88128.1 - cytochrome P450 lanosterol 14a-demethylase de *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*



```
Query 48 VFQQLCLPRRKDLPPV 63
      V  + + R+K  PPV
Sbjct 313 VRDAVVISRQKPAPPV 328
```

```
Query 432 TYVVRNFTLKLAVP 445
      T ++ ++ ++A+P
Sbjct 293 TKIIESYGKEIAMP 306
```

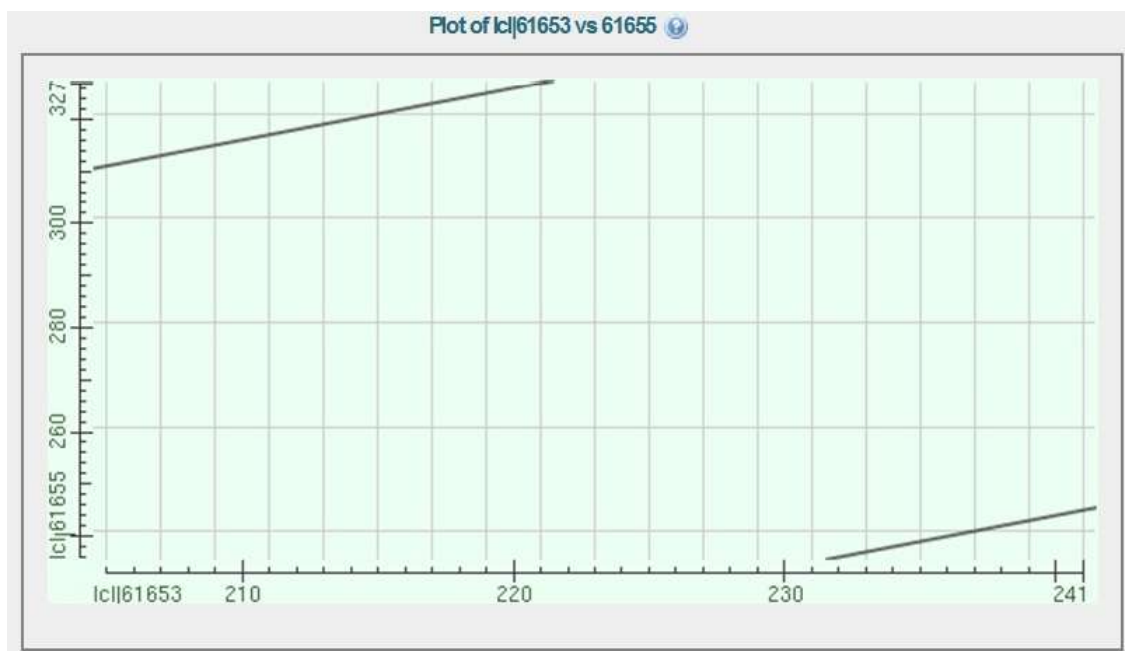
AAQ88129.1 - C-3 sterol dehydrogenase de *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*



```

Query  142  AVALDAYNETKVAA-----EKMVLEANGQEKGEGGAKLLTCAIRP  182
          +VA DA  K+A      +  ++E+ G+E  GGA  +  RP
Sbjct  143  SVAPDAVKMGKIAEASAAKFQTKIIESYGKEIAMPGGAGNVVRQGRP  189
    
```

AAQ88130.1 - sterol C-24 reductase de *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*



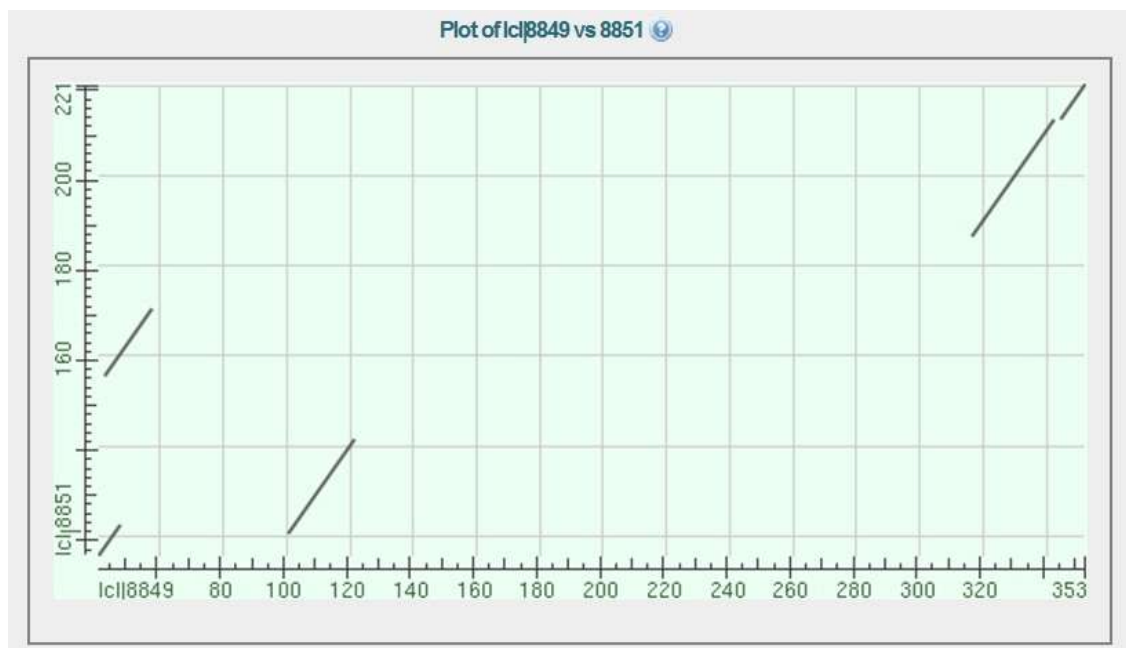
```

Query  205  DLFARVFKYGGGPLRMS  221
          DL      + GGG +RM+
Sbjct  311  DLVMNGVEIGGGSIRMA  327
    
```

```

Query  232  VSLNPRLGVI  241
          +LN R GV+
Sbjct  236  ATLNSRFGVL  245
    
```


AAR20479.1 - mitochondrial cytochrome c peroxidase de *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*



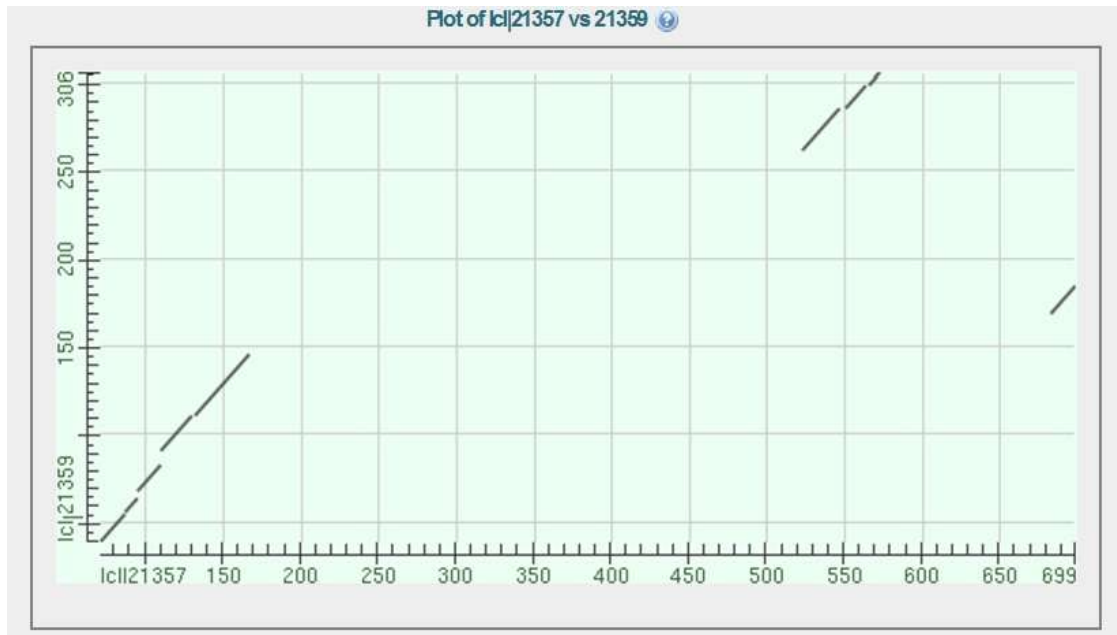
```
Query 102  RGKDEYQKVYNRIAETLDKEG 122
          R  DEY+++  IA+ +DK G
Sbjct 122  RTMDEYEQLNKMIADAMDKVG 142
```

```
Query 318  MLPTDMALVKDKSFKKYVDIYADNEEKFFSDFAKAF 353
          M+  D      DK  + +D+  NE+  F  + AK
Sbjct 188  MVMADTIATGDKLGEHNIDVLEGNEQ--FINAAKVI 221
```

```
Query 42  KPSAPRS 48
          +PS PR+
Sbjct 117 RPSIPRT 123
```

```
Query 44  SAPRSSNTGYIFAGL 58
          S+P + N+  + AG+
Sbjct 157 SSPATLNSRGVTAGM 171
```

DAA05785.1 - TPA: TPA_exp: trehalose-6-phosphate phosphate de
Cryptococcus neoformans var. grubii



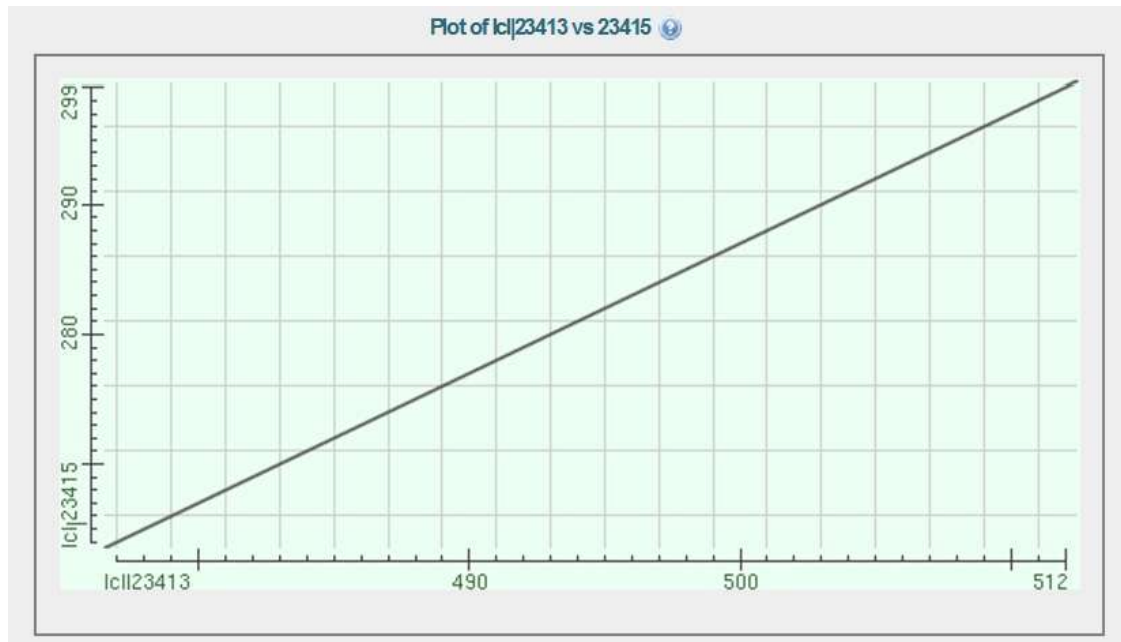
```
Query 524 ESPKLERMTAELVSHINGTYGSLDFTPVHHYHQALEKDEYFGLLSCADLA 573
      ++ ++ R T LVS I GT L H LE +E F ++ A +A
Sbjct 263 QAREIVRFTKSLVSSI TGTSPKLG----EHNIDVLEGNEQF-- INAAKMA 306
```

```
Query 72 PMTPEFKPEDAETTVE-SADAKWRI----HARTAHPALVSGIKS-----LSETHDQL 118
      PMF E A+ + + K+R+ +TA A V+G + +++ D++
Sbjct40 PMGHRFD FEQAKKAEDIGQNPKYRMANEEELQTAESAFVTGARRFYINLHRMIADAMDKV 99
```

```
Query119 LVAWTGEVLIQPDNTQSPQQPSQATFSSIASNLLAPFSAGDATPQPQPP 167
      GE++ +Q+ S+ S + A + D +P PP
Sbjct100 GKMEDGELIKHV--SQDLEDSRIALSIALRGVTAGMNPMDLKQKPAPP 146
```

```
Query684 ALDTAQFTDAYKKANK 699
      A D + D Y++ NK
Sbjct170 APDAVKTMDEYEQLNK 185
```

DAA05786.1 - TPA: TPA_exp: neutral trehalase de *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*



```

Query477  EASHFTHILQPYAQKIGISVNEYIDGYNDGTIKEPE  512
          E      ++      K+G S NE ++N  T+  E  E
Sbjct264  EDGELIKMIADAMDKVGKSTNEAMEWMNSKTMDEYE  299
  
```