

Expressão diferencial de proteínas do fungo *Conidiobolus lamprauges* cultivado em diferentes temperaturas

Differential expression of protein of the fungus *Conidiobolus lamprauges* cultivated at different temperatures

Isabela de Godoy¹ Daphine Ariadne Jesus de Paula¹ Marcelo Marques da Silveira¹
Laila Natasha dos Santos Brandão¹ Valéria Dutra¹ Luciano Nakazato^{*}

RESUMO

Para sobreviverem na temperatura corpórea de seu hospedeiro, os fungos patogênicos têm desenvolvido mecanismos moleculares importantes, como a expressão de proteínas relacionadas ao crescimento em altas temperaturas. Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar o crescimento *in vitro* de *Conidiobolus lamprauges* em diferentes temperaturas e comparar o perfil de proteínas expressas através de eletroforese bidimensional (2D), em duas temperaturas distintas, sendo uma considerada baixa (28°C) e alta (37°C). Para análise do crescimento em diferentes temperaturas, cinco isolados de *C. lamprauges*, oriundos de ovinos doentes, foram incubados a 20, 25, 30, 35 e 40°C e o crescimento radial foi medido a cada 24 horas. Para análise da expressão diferencial, realizou-se a extração de proteínas do fungo cultivado a 28°C e a 37°C por 48 horas. A média de crescimento radial dos isolados foi diferente nas temperaturas analisadas, sendo 35°C a melhor temperatura para crescimento em todas as amostras. A temperatura ótima ajustada variou entre 33,3°C a 34,8°C. Os limites inferior e superior de inibição de crescimento foram 18°C e 42°C, respectivamente. Na análise da expressão diferencial, foram encontrados 16 spots diferencialmente expressos, sete (7/16) estavam com expressão diminuída e nove (9/16) com expressão aumentada a 37°C, quando comparado a 28°C. Além disso, oito spots estavam presentes apenas a 28°C e seis a 37°C. Sugere-se que *C. lamprauges* produza um perfil de proteínas relacionadas à termorregulação desencadeado pela alta temperatura do hospedeiro.

Palavras-chaves: temperatura de crescimento, ovinos, proteína, Zigomiceto.

ABSTRACT

To survive at the body temperature of their hosts, pathogenic fungi have developed important molecular mechanisms, such as protein expression associated with growth at high temperatures. Thus, the aim of this study was to analyze the *in vitro* growth of *Conidiobolus lamprauges* at different temperatures and

compare proteins expressed by two-dimensional electrophoresis (2D), for the pathogen cultivated at low (28°C) and high (37°C) temperatures. For the analysis of growth temperatures, five isolates of *C. lamprauges* from sick sheep were incubated at 20, 25, 30, 35 and 40°C and radial growth was measured every 24 hours. For the analysis of differential expression, protein extraction and two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis were performed with *C. lamprauges* cultivated at 28°C and 37°C for 48 hours. The average radial growth was different at the temperatures tested, and 35°C was found to be the best growth temperature for all isolates. The optimum adjusted temperature ranged between 33.3°C and 34.8°C. The upper and lower limits of growth inhibition were 18°C and 42°C, respectively. Upon expression analysis, a total of 16 spots were differentially expressed, seven (7/16) proteins were downregulated and nine (9/16) were over-expressed at 37°C compared to 28°C. In addition, eight spots were present only at 28°C and six were present only at 37°C. It is suggested that *C. lamprauges* produces a profile of proteins that is related to thermoregulation triggered by the high temperature of the host.

Key-words: growth temperature, sheep, protein, Zygomycete.

INTRODUÇÃO

Conidiobolus coronatus, *C. incongrus* e *C. lamprauges*, pertencentes à ordem *Entomophthorales* (RIBES et al., 2000), são as principais espécies envolvidas na Conidiobolomicose. Esses fungos são capazes de causar micoses cutâneas e subcutâneas em humanos e animais (RIBES et al., 2000; BOABAID et al., 2008; KIMURA et al., 2011). A patogenia dessa enfermidade não está bem esclarecida. Os estudos estão voltados principalmente à virulência de *Conidiobolus* spp. como controle biológico de insetos

¹Laboratório de Microbiologia Veterinária e Biologia Molecular, Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), 78060-900, Cuiabá, MT, Brasil. E-mail: lucnak@ufmt.br. *Autor para correspondência.

(SHAH & PELL, 2003), sendo a espécie *C. coronatus* a mais citada.

Microrganismos patogênicos são capazes de sobreviver na temperatura fisiológica do seu hospedeiro a fim de proliferar e causar a doença (KRAUS et al., 2004). *Conidiobolus* spp. tem ótimo crescimento a 37°C (RIBES et al., 2000). Cepas isoladas de humanos infectados crescem mais rapidamente a 37°C que aquelas isoladas do ambiente, sugerindo que a temperatura possa estar associada à produção de algum fator de virulência (RIBES et al., 2000).

A faixa ótima de temperatura varia entre as espécies e as mudanças térmicas podem causar alterações nas propriedades estruturais e fisiológicas dos organismos (RIBEIRO, 2010). Para se adaptar à temperatura corpórea do hospedeiro, microrganismos desenvolvem mecanismos moleculares importantes, como superexpressão ou repressão de genes, resultando na produção de proteínas e fatores transcricionais que possivelmente estão associados à patogenicidade da enfermidade e à virulência do fungo (ROSA E SILVA et al., 2008).

Uma forma de entender melhor o funcionamento dos genes é através da proteômica, a qual analisa o produto final do genoma. A identificação de proteínas pode auxiliar no entendimento de características relacionadas à patogênese da doença, em novos diagnósticos e tratamentos e vacinas (GALDOS-RIVEROS et al., 2010). Não há estudos na literatura que mostrem perfis proteicos e/ou identifiquem proteínas produzidas pelo *Conidiobolus* spp. na conidiobolomiose ovina e nem que relacionam o efeito da temperatura no comportamento de tal fungo a nível molecular. Assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar o crescimento do *C. lamprauges* em diferentes temperaturas e comparar, através da expressão diferencial de proteínas, o patógeno cultivado em duas temperaturas distintas, uma considerada baixa e outra alta, selecionadas após os resultados obtidos no experimento de caracterização do crescimento de *C. lamprauges*.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a análise do crescimento em diferentes temperaturas, foram utilizados cinco isolados de *C. lamprauges* M290/07 (INCQS 40316), M303/07 (INCQS 40317), M260/09 (INCQS 40315), M614/09 (INCQS 40319) e M446/10 (INCQS 40318), oriundos de ovinos doentes, caracterizados e confirmados pela técnica de PCR (PAULA et al., 2010) e mantidos no laboratório de Microbiologia Veterinária.

Os cinco isolados foram semeados em Agar Sabouraud Dextrose (SDA) 2% e incubados a 37°C por sete dias. Após o cultivo, foi realizada a suspensão de esporos com auxílio de alça do tipo Drigalski em 3,0ml de solução estéril de Tween 80 a 0,01% (v/v). A suspensão obtida foi lavada com água ultrapura estéril, centrifugada a 3354 x g por 17 minutos e o *pellet* ressuspendido em 1ml de água ultrapura estéril. Os esporos foram contados em câmara de Neubauer e diluídos até uma concentração de 10⁶ esporos/mL⁻¹.

No centro de cada placa de Petri (14,0x1,5cm) com SDA 2%, foram inoculados 10µl (10⁴ esporos) da suspensão de esporos, sendo feitas triplicatas para cada isolado. As placas foram incubadas em cinco diferentes temperaturas (20, 25, 30, 35 e 40°C) e o crescimento radial dos fungos foi medido a cada 24 horas, sendo realizado por meio de uma régua graduada. As medidas foram realizadas sempre no mesmo local de mensuração, até que os isolados atingissem a proximidade das bordas da placa de Petri, o que levou aproximadamente cinco dias. Os isolados foram também cultivados com ±2°C (18 e 42°C) das temperaturas acima para detectar o limite inferior e superior de crescimento.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em que os tratamentos corresponderam às combinações dos cinco isolados de *C. lamprauges* com as cinco condições de temperatura testadas, obtendo um total de 25 tratamentos. Cada tratamento foi composto por três repetições, sendo cada repetição correspondente a uma placa de Petri, totalizando 75 placas. Os dados foram submetidos à Análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, com nível de significância de 5%.

Para a análise de expressão diferencial, o isolado INCQS 40316, anteriormente utilizado para análise de transcritos diferencialmente expressos (SILVA et al., 2012), foi cultivado em SDA 2% e mantido em incubadora tipo B.O.D. (Química Nova) a 28 e 37°C, por 48 horas. Após o cultivo, as amostras foram submetidas à extração de proteínas, segundo protocolo adaptado de WINTERS et al. (2008) e, posteriormente, homogeneizadas em tampão de extração gelado, suplementado com inibidores de proteases. A quantificação foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

Os géis bidimensionais (2-D) foram realizados segundo protocolo modificado de O'FARREL (1975) e RABILLOUD (1998), em triplicata. Amostras contendo aproximadamente 250µg de proteínas foram precipitadas com solução

de TCA:Acetona (1:9), solubilizadas em tampão de reidratação e aplicadas em fitas Zoom® Strip pH 3-10L (7cm, Bio-rad) para a realização da primeira dimensão. Após a focalização isoeletrica, realizada em sistema IPGRunner (Invitrogen), as fitas foram reduzidas com 1% de DTT e alquiladas em 2,5% de iodoacetamida em tampão de equilíbrio (BJELLQVIST et al., 1993).

A segunda dimensão foi feita em gel de poliacrilamida, segundo LAEMMLI (1970), e corada por Nitrato de prata (WESTERMEIER & NAVEN, 2002). As imagens dos géis foram capturadas e processadas em sistema de fotodocumentação (ChemIDoc XRS+, Bio-Rad). A análise quantitativa dos géis foi realizada por meio do *software* PDQuest 8.0.1 (Bio-Rad), adotando-se o método estatístico de regressão local para normalização dos *spots*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os isolados apresentaram diferenças significativas no seu crescimento radial quando comparados entre si em uma mesma temperatura e em diferentes temperaturas (Tabela 1). Dessa maneira, ocorreu um efeito significativo para a interação entre temperatura e crescimento dos isolados ($P < 0,0001$), com nível de significância de 5%. O teste de médias (Tabela 1) mostrou que o isolado INCQS 40319 apresentou a maior média em todas as temperaturas testadas. O isolado INCQS 40316, no entanto, apresentou um menor crescimento radial entre os isolados, independente da temperatura testada.

A análise do crescimento dos isolados em diferentes temperaturas demonstrou, por meio do teste de regressão, que os isolados apresentaram média de crescimento crescente nas temperaturas de 20 até 35°C. A temperatura ótima de crescimento de cada isolado variou entre 33,3 a 34,8°C (Tabela 1), baseado na

equação descrita para cada isolado. O crescimento foi inibido completamente quando incubado a 18 e 42°C.

A maioria dos fungos de importância clínica apresenta temperatura ótima de isolamento e crescimento de 25 a 30°C, mas, em alguns fungos subcutâneos e sistêmicos dimórficos, como *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* e *Sporothrix schenckii*, é de 37°C (DISMUKES et al., 2003). Em alguns casos, a capacidade de crescimento de fungos acima de 40°C denomina-se termotolerância (WALKER & WHITE, 2005).

Os resultados observados neste estudo estão de acordo com análises realizadas com *Aspergillus flavus* (GADGILE & CHAVAN, 2010), as quais mostraram uma temperatura ótima de crescimento *in vitro* de 35°C. WAINGANKAR et al. (2008) descreveram uma nova espécie, *Conidiobolus thermophilus*, o qual teve um ótimo desenvolvimento a 40°C, sem importância clínica, mas com possíveis aplicações biotecnológicas.

Em relato de infecção causada por *C. lamprauges* em um homem de 61 anos, tal fungo foi cultivado em cinco temperaturas distintas, sendo observado o maior diâmetro de crescimento a 36,5°C e cultura negativa a 45 e 50°C (KIMURA et al., 2011). Esses dados são diferentes dos obtidos neste estudo com isolados de ovinos doentes, cuja temperatura ótima ficou entre 33 e 35°C, com a inibição do crescimento obtida a partir de 42°C. As diferenças desses resultados podem estar associadas ao fato de as temperaturas utilizadas por KIMURA et al. (2011) terem um intervalo grande, não sendo testadas temperaturas como, por exemplo, 35°C e não ser realizada uma análise de regressão.

Em relação a organismos capazes de causar lesões no trato respiratório superior de ovinos,

Tabela 1 - Temperatura ótima estimada e valor médio para tamanho do halo de crescimento dos isolados de *C. lamprauges*, em diferentes temperaturas.

Isolados	-----Halo de crescimento médio (mm)-----					Est* (°C)
	20°C	25°C	30°C	35°C	40°C	
INCQS 40316	13,33d	54,67c	90,00c	109,67c	69,33c	33,35
INCQS 40317	22,67c	66,67a	89,33c	116,00b	86,67a	34,15
INCQS 40315	31,33b	63,67b	95,33b	120,00a	78,00b	33,72
INCQS 40319	36,00a	66,00a	100,67a	122,67a	83,67a	33,56
INCQS 40318	22,33c	61,33b	88,66c	117,00b	84,67a	34,86

*Temperatura ótima estimada por regressão. Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-knott a um nível nominal de significância de 5%.

houve discordância quando comparado a um estudo que analisou o efeito da temperatura no crescimento de *Pythium insidiosum* (KRAJAEJUN et al., 2010), sendo observada uma temperatura ótima entre 28 e 32°C e inibição do crescimento a 8 e 42°C.

Embora *C. lamprauges* ocorra no mundo todo, a doença é comum em regiões de clima tropical e subtropical (CARRIGAN et al., 1992), onde a média de temperatura é consideravelmente alta, o que pode explicar a elevada faixa ótima de temperatura de crescimento encontrada neste estudo. Além disso, o fungo em questão parasita hospedeiros cujas temperaturas corporais são altas: 37°C (humano) e 39°C (ovinos), entre outros. Dessa forma, o microrganismo deve ser capaz de expressar genes relacionados à infecção, o que

altera a regulação gênica e permite a adaptação ao hospedeiro a fim de causar a doença, como ocorre em *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Paracoccidioides brasiliensis*.

Na análise de expressão diferencial, 51 *spots* foram encontrados na condição de 28°C e 49 *spots* a 37°C, sendo 16 *spots* diferencialmente expressos, dos quais sete (7/16) estavam com expressão diminuída e nove (9/16) com expressão aumentada a 37°C, quando comparado a 28°C (Tabela 2). Além disso, oito *spots* estavam presentes apenas a 28°C e seis presentes apenas a 37°C (Figura 1).

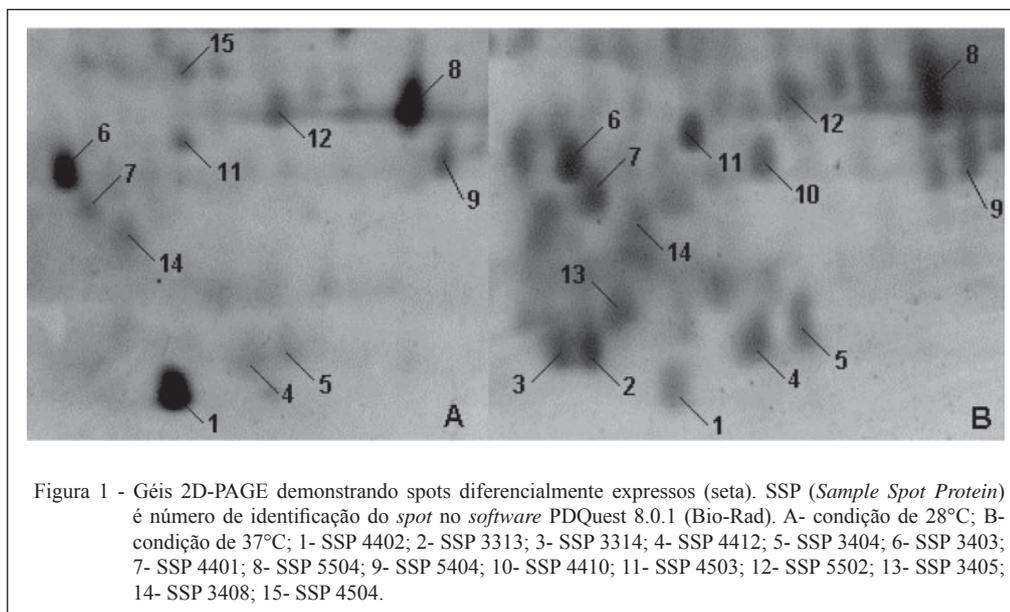
Em estudo de proteômica comparativa entre *A. fumigatus* e *A. lentulus*, observaram-se diferenças significativas de acordo com a temperatura de cultivo, sendo encontradas 20 proteínas superexpressas a

Tabela 2 - Relação dos *spots* obtidos pela análise proteômica diferencial de *C. lamprauges*, cultivado a 25 e 37°C através do software PDQuest 8.0.1 (Bio-Rad).

SSP*	Mr (kDa)	pI	28°C (intensidade)	37°C (intensidade)	Razão (37 vs 28°C)
5515	59,33	8,59	13978303,0		
5404	43,73	7,55	2220747,8		
3702	114,14	5,66	1151396,1		
4609	70,33	6,63	1422099,6		
4612	80,25	6,67	974470,1		
5413	50,14	7,71	628530,1		
4703	107,73	6,30	385820,9		
4706	116,14	6,51	289574,4		
3509	59,94	6,24		500449,5	
4306	31,68	6,57		610985,6	
4713	139,75	6,70		985924,6	
3313	28,11	6,22		1359899,4	
3314	27,60	6,10		1718615,1	
4410	43,95	6,89		2027211,0	
4604	72,42	6,39	8464382,0	608745,4	0,07
5504	51,81	7,39	13412492,0	1268738,5	0,09
4607	71,55	6,52	5845420,0	886310,8	0,15
4402	25,57	6,41	7761921,5	2455749,3	0,32
4616	79,65	6,90	960945,4	350285,8	0,36
3505	68,82	6,07	1196522,4	596468,0	0,50
5503	50,20	7,14	928051,9	676122,4	0,73
4503	48,73	6,45	636971,5	1232274,8	1,93
2507	68,51	5,46	558369,5	1170234,0	2,10
2307	17,20	5,00	1452911,5	3250842,0	2,24
4401	44,72	6,20	429351,8	1398543,9	3,26
3404	41,26	6,08	425473,2	1585518,4	3,73
4412	28,45	6,81	567354,7	2822688,8	4,98
3407	45,36	5,86	370131,6	1975343,1	5,34
4403	29,15	6,52	249968,2	1357345,4	5,43
3405	29,00	6,12	89651,5	1245062,1	13,89

Mr (Relative mass): massa relativa.

pI: Ponto isoelétrico.



37°C, quando comparado a 25°C (PINEL et al., 2011). A ocorrência de 50 proteínas superexpressas foi detectada em *A. fumigatus*, utilizando uma técnica mais sensível a 2D-DIGE (ALBRECHT et al., 2010). Tem sido demonstrado que a superexpressão de algumas proteínas em *A. fumigatus*, através de mutantes nulos, é necessária para a termotolerância, virulência e manutenção na natureza (BHABHRA et al., 2004).

Alguns genes essenciais para o crescimento a 37°C têm sido identificados em *C. neoformans* (ROSA E SILVA et al., 2008; KRAUS et al., 2004), os quais estão relacionados com a virulência do patógeno. No fungo dimórfico *P. brasiliensis*, foram encontrados genes superexpressos durante a transição de micélio para levedura (MONTEIRO et al., 2009; GARCIA et al., 2010), fato que está diretamente relacionado com a mudança de temperatura.

Proteínas como Ras1, a p21, Ste20 kinase, Cts1, Vph1, Tsa1, Mpk1, e a Ca²⁺/calmodulin-dependent phosphatase calcineurin foram identificadas em *C. neoformans* como sendo essenciais ou importantes ao crescimento em altas temperaturas (KRAUS et al., 2004). Recentemente, foi descrito, por meio da técnica de RDA, a expressão diferencial por *C. lamprauges* do gene que codifica a enolase, sendo que a exposição à temperatura elevada (37°C) possivelmente esteja associada à superexpressão dessa proteína (SILVA et al., 2012).

A identificação dessas proteínas poderá auxiliar na descoberta de características relacionadas à patogênese da doença, na regulação térmica, na descoberta de novos diagnósticos e tratamentos e vacinas.

CONCLUSÃO

Sugere-se que *C. lamprauges* produza um perfil de proteínas relacionadas à termorregulação para se adaptar ao ambiente do hospedeiro, sendo necessários outros estudos utilizando ferramentas moleculares para identificá-las e que possam contribuir para melhor entendimento da patogenia e virulência do fungo.

AGRADECIMENTOS

À fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso (FAPEMAT) e ao Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- ALBRECHT, et al. Integrative analysis of the heat shock response in *Aspergillus fumigatus*. **BMC genomics**, v.11, n.1, p.1-17, 2010. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/11/32>>. Acesso em: jul. 2013. doi: 10.1186/1471-2164-11-32.
- BHABHRA, R. et al. Disruption of the *Aspergillus fumigatus* gene encoding nucleolar protein CgrA impairs thermotolerant growth and reduces virulence. **Infection and Immunity**, v.72, n.8, p.4731-4740, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC470587/>>. Acesso em: jan. 2013. doi: 10.1128/IAI.72.8.4731-4740.2004.
- BJELLQVIST, B. et al. Micropreparative two-dimensional electrophoresis allowing the separation of samples containing milligram amounts of proteins. **Electrophoresis**, v.14, n.1, p.1375-1378, 1993. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/elps.11501401212/pdf>>. Acesso em: dez. 2011. doi: 10.1002/elps.11501401212.

- BOABAID, F. M. et al. Conidiobolomycose em ovinos no Estado de Mato Grosso. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, n.1, p.77-81, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2008000100012>>. Acesso em: nov. 2011. doi: 10.1590/S0100-736X2008000100012.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976. Disponível em: <<http://www.ciens.ucv.ve:8080/generador/sites/labbioqgen/archivos/Bradford%201976.pdf>>. Acesso em: dez. 2011.
- CARRIGAN, M. J. et al. Ovine nasal zygomycosis caused by *Conidiobolus incongruus*. **Australian Veterinary Journal**, v.69, n.10, p.237-240, 1992. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1751-0813.1992.tb09869.x/abstract>>. Acesso em: dez. 2012. doi: 10.1111/j.1751-0813.1992.tb09869.x.
- DISMUKES, W. E. et al. **Clinical mycology**. New York: Oxford University, 519 p., 2003.
- GADGILE, D. P.; CHAVAN, A. M. Impact of temperature and relative humidity on development of *Aspergillus flavus* rot of mango fruit. **Recent Research in Science and Technology**, v.2, n.3, p.48-49, 2010. Disponível em: <<http://recentscience.com/index.php/trst/article/view/2413>>. Acesso em: jan. 2013.
- GALDOS-RIVEROS, A. C. et al. Proteômica: novas fronteiras na pesquisa clínica. **Enciclopédia Biosfera**, v.6, n.11, p.1-24, 2010. Disponível em: <<http://www.conhecer.org.br/enciclop/2010/c/proteonica.pdf>>. Acesso em: jan. 2012.
- GARCÍA, A. M. et al. Gene expression analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* transition from conidium to yeast cell. **Medical Mycology**, v.48, n.1, p.147-154, 2010. Disponível em: <<http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/13693780903055673>>. Acesso em: jan. 2013. doi: 10.3109/13693780903055673.
- KIMURA, M. et al. Disseminated human conidiobolomycosis due to *Conidiobolus lamprages*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.49, n.2, p.752-756, 2011. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/content/49/2/752>>. Acesso em: dez. 2012. doi: 10.1128/JCM.01484-10.
- KRAJAEJUN, T. et al. Effect of temperature on growth of the pathogenic oomycete *Pythium insidiosum*. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v.41, n.6, p.1462-1466, 2010. Disponível em: <<http://www.tm.mahidol.ac.th/seameo/2010-41-6/26-4876.pdf>>. Acesso em: dez. 2012.
- KRAUS, P. R. et al. Identification of *Cryptococcus neoformans* temperature-regulated genes with a Genomic-DNA microarray. **Eukaryotic Cell**, v.3, n.5, p.1249-1260, 2004. Disponível em: <<http://ec.asm.org/content/3/5/1249.full>>. Acesso em: dez. 2011. doi: 10.1128/EC.3.5.1249-1260.2004.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970. Disponível em: <<http://www.nature.com/nature/journal/v227/n5259/abs/227680a0.html>>. Acesso em: dez. 2011. doi: 10.1038/227680a0.
- MONTEIRO, J. P. et al. Genomic DNA microarray comparison of gene expression. Patterns in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelia and yeasts *in vitro*. **Microbiology**, v.155, p.2795-2808, 2009. Disponível em: <<http://mic.sgmjournals.org/content/155/8/2795.long>>. Acesso em: jan. 2013. doi: 10.1099/mic.0.027441-0.
- O'FARRELL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v.250, n.10, p.4007-4021, 1975. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/250/10/4007.long>>. Acesso em: dez. 2011.
- PAULA, D. A. J. et al. Molecular characterization of ovine zygomycosis in Central Western Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.22, n.2, p.274-277, 2010. Disponível em: <<http://vdi.sagepub.com/content/22/2/274.long>>. Acesso em: jan. 2012. doi: 10.1177/104063871002200220.
- PINEL, C. et al. Comparative proteomic profiles of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus lentulus* strains by surface-enhanced laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (SENDI-TOF-MS). **BMC Microbiology**, v.11, n.172, p.1-10, 2011. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2180/11/172>>. Acesso em: jan. 2013. doi: 10.1186/1471-2180-11-172.
- RABILLOUD, T. Use of thiourea to increase the solubility of membrane proteins in two-dimensional electrophoresis. **Electrophoresis**, v.19, n.5, p.758-760, 1998. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/elps.1150190526/pdf>>. Acesso em: dez. 2011. doi: 10.1002/elps.1150190526.
- RIBEIRO, C. S. A influência térmica na regulação da expressão gênica e sua ação na dinâmica das membranas celulares. **Revista da Biologia**, v.4, p.6-9, 2010. Disponível em: <<http://www.ib.usp.br/revista/volume4>>. Acesso em: dez. 2012. doi: 10.7594/revbio.04.02.
- RIBES, J. A. et al. Zygomycetes in human disease. **Clinical Microbiology Reviews**, v.13, n.2, p.236-301, 2000. Disponível em: <<http://cmr.asm.org/content/13/2/236.full>>. Acesso em: jan. 2012. doi: 10.1128/CMR.13.2.236-301.2000.
- ROSA E SILVA, L. K. et al. Identification of novel temperature-regulated genes in the human pathogen *Cryptococcus neoformans* using representational difference analysis. **Research in Microbiology**, v.159, p.221-229, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092325080700263X>>. Acesso em: nov. 2012. doi: 10.1016/j.resmic.2007.12.2006.
- SHAH, P. A.; PELL, J. K. Entomopathogenic fungi as biological control agents. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.61, n.5-6, p.413-423, 2003. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s00253-003-1240-8?LI=true>>. Acesso em: jan. 2013. doi: 10.1007/s00253-003-1240-8.
- SILVA, J. A. G. et al. Genes termorregulados diferencialmente expressos em *Conidiobolus lamprages*. **Ciência Rural**, v.42, p.1610-1613, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782012005000064>>. Acesso em: nov. 2012. doi: 10.1590/S0103-84782012005000064.
- WAINGANKAR, V. M. et al. A new thermophilic species of *Conidiobolus* from India. **Mycopathologia**, v.165, n.3, p.173-177, 2008. Disponível em: <<http://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s11046-007-9088-6>>. Acesso em: jan. 2013. doi: 10.1007/s11046-007-9088-6.
- WALKER, G. M.; WHITE, N. A. Introduction to fungal physiology. In: KAVANAGH, K. **Fungi: biology and applications**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, p. 1-34, 2005.
- WESTERMEIER, R.; NAVEN, T. **Proteomics in practice: a laboratory manual of proteome analysis**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 310 p., 2002.
- WINTERS, M. S. et al. *Histoplasma capsulatum* proteome response to decreased iron availability. **Proteome Science**, v.6, n.36, p.1-13, 2008. Disponível em: <<http://www.proteomesci.com/content/6/1/36>>. Acesso em: dez. 2011. doi: 10.1186/1477-5956-6-36.