UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Jéssica Chiaratto

Caracterização de fatores de transcrição de *Aspergillus
fumigatus* importantes para respostas a diferentes estresses

Ribeirão Preto
2019

Jéssica Chiaratto

Caracterização de fatores de transcrição de *Aspergillus fumigatus* importantes para respostas a diferentes estresses

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman

Ribeirão Preto

2019

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Chiaratto, Jéssica

Caracterização de fatores de transcrição de *Aspergillus fumigatus* importantes para respostas a diferentes estresses. Ribeirão Preto, 2019

107 p.: il.; 30 cm

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de Concentração: Bioquímica.

Orientador: Goldman, Gustavo Henrique

1. *Aspergillus fumigatus*. 2. Cálcio. 3. Reprodução assexuada.
4. Caspofungina. 5. Efeito paradoxical. 6. Fatores de transcrição.
7. Virulência

Jéssica Chiaratto

Caracterização de fatores de transcrição de *Aspergillus fumigatus* importantes para respostas a diferentes estresses

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof(a) Dr(a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a) Dr(a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a) Dr(a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho especialmente aos meus pais, Rogério e Adriana, pelo cuidado e amor que sempre me concederam.

A minha querida irmã, Jacqueline, pela amizade e carinho.

A minha namorada, Sabrina, por ter compartilhado comigo todos os dias desta etapa da minha vida.

Aos meus bebês caninos, Branco, Helena, Lina e Marie, por toda a alegria que trazem aos meus dias.

Agradecimentos especiais

Ao meu orientador, Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman, idealizador deste projeto, obrigada pela grande oportunidade de desenvolver este trabalho e pelos ensinamentos compartilhados ao longo dos últimos anos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro ao laboratório e pelas bolsas concedidas de iniciação científica (nº processo: 2012/24688-9) e de mestrado (nº processo: 2016/22062-6).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro ao laboratório.

Agradecimentos

Aos meus pais, *Rogério* e *Adriana*, por serem meus maiores exemplos, guiarem meu caminho e me incentivarem a estudar. Essa conquista jamais seria alcançada sem o apoio e dedicação que concederam à mim ao longo de todos os anos de minha vida. Agradeço imensamente por todos os momentos e ensinamentos que me proporcionaram. Eu amo vocês!

À minha irmã, *Jacqueline*, que desde seu nascimento, preencheu meus dias com sua alegria, seu humor e sua bravura.

À minha namorada, *Sabrina*, que há quatro anos torna meus dias mais doces e minhas manhãs mais felizes com seu carinho e dedicação.

Aos meus cães (filhos), *Helena*, *Lina*, *Marie* e *Branco*, mesmo não podendo ler isto, que me trazem alegria e despertam somente o que há de melhor em mim.

À todos meus familiares, pelo carinho e confiança que sempre depositaram em mim, por acreditarem que essa conquista seria possível, e pelos momentos felizes compartilhados.

Às minhas amigas, Ma. *Lívia Marangoni* e Dra. *Patrícia A. Castro Silva*, que acompanharam todo meu desenvolvimento profissional, intelectual e pessoal ao longo dos últimos sete anos, cuja presença foi fundamental para que o caminho se tornasse menos árduo.

Aos amigos que o laboratório proporcionou, Dra. *Eliciane C. Mattos*, Ma. *Lilian P. Silva*, Dra. *Thaila F. Dos Reis*, Dra. *Marcela Savoldi*, Dra. *Adriana O. Manfiolli*, Dra. *Clara Valero*, Dra. *Ana C. Colabardini*, Dra. *Laure N. A. Ries*, Dr. *Leandro J. Assis*, Dr. *Rafael W. Bastos* e Dra. *Laura M. Maronas*. Obrigada pelo carinho e pelas alegrias do dia-a-dia.

Aos Professores Dr. *Iran Malavazi* e Dr. *Roberto do Nascimento Silva*, e ao Dr. *Fausto B. R. Almeida* que contribuíram com o desenvolvimento do trabalho.

A todos os professores que contribuíram com o envio de cepas, plasmídeos e sugestões.

À Faculdade de Ciências Farmacêutica de Ribeirão Preto e todos os professores que participaram da minha formação como Farmacêutica-Bioquímica.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica, em especial à secretária Maria Ivone Campos Fonseca, pela sua gentileza e disposição em ajudar.

“Na atitude de negação, omissão e de deturpação ao bem, o ser humano assume uma conduta contrária à verdadeira realidade da existência - o que caracteriza a visão invertida, vendo as coisas externas maravilhosas e as internas doentias. ”

Norberto R. Keppe

RESUMO

CHIARATTO, J. **Caracterização de fatores de transcrição de *Aspergillus fumigatus* importantes para respostas a diferentes estresses**. 2019. 107f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Aspergillus fumigatus é um fungo saprófita e um dos principais fungos patogênicos humanos. Os seus conídios são inalados e chegam ao pulmão, onde se tornam ativos e germinam, dando origem a uma doença conhecida como aspergilose. A aspergilose é um conjunto de formas clínicas que apresenta grande risco, principalmente, para indivíduos imunossuprimidos. A sinalização de cálcio desempenha importante papel na regulação de diversas respostas fisiológicas, já que o Ca^{2+} corresponde a um mensageiro secundário que participa de diferentes processos biológicos, como ciclo celular, diferenciação, ou homeostase. Além disso, as equinocandinas, como a caspofungina, são antifúngicos cujo alvo é a parede celular do fungo. Esses agentes reduzem a concentração total de 1,3- β -D-glucanos na parede da célula, através da inibição da atividade da 1,3- β -glucano sintase. A inibição da síntese de componentes da parede celular através de drogas antifúngicas pode ser um alvo importante contra infecções causadas por *A. fumigatus*. Através de um *screening* de fatores de transcrição, foram identificados genes pertinentes a esses processos. A deleção do gene *nsdC* resultou em maior sensibilidade ao CaCl_2 , EGTA, Congo Red, *Nikkomycin Z*, Calcoflúor White, Caspofungina (efeito paradoxical reduzido), 44°C, Menadiona e T-butil hidroperóxido. Além disso, o mutante nulo ΔnsdC mostrou-se mais resistente ao Sorbitol e à Ciclosporina. O fator de transcrição NsdC parece estar envolvido na via de sinalização de cálcio, por ter sua expressão alterada na ausência do fator de transcrição CrzA. Além disso, NsdC mostrou-se importante em processos relacionados à parede celular, pois sua deleção leva à formação de hifas mais ramificadas e desorganizadas, e parede celular mais espessa. Esse fator de transcrição aparenta, ainda, ser repressor da reprodução assexuada. Isso se deve ao fato de o mutante nulo ΔnsdC apresentar conídios em meio líquido e aumento significativo da expressão de *brlA*. Ademais, a proteína NsdC encontra-se majoritariamente presente no núcleo, após tratamento com CaCl_2 . Outros mutantes de fatores de transcrição, que apresentam sensibilidade à Caspofungina, foram identificados: ΔcbfA , ΔnctA , ΔnctB e ΔnctC . Algumas evidências apontam que NctA e NctB fazem parte de um mesmo complexo. Já NctC parece estar relacionado a estresses de temperatura e osmótico, sendo importante para a virulência em *A. fumigatus*. Portanto, mais estudos são necessários a fim de melhor compreender os papéis desses genes, podendo ser importantes para trazer maiores informações acerca de potenciais alvos terapêuticos no tratamento de aspergilose.

Palavras-chave: 1. *Aspergillus fumigatus*. 2. Cálcio. 3. Reprodução assexuada. 4. Caspofungina. 5. Efeito paradoxical. 6. Fatores de transcrição. 7. Virulência

ABSTRACT

CHIARATTO, J. **Characterization of transcription factors of *Aspergillus fumigatus* important for responses to different stresses.** 2019. 107p. Dissertation (Master). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Aspergillus fumigatus is a saprophytic fungus and one of the main human pathogenic fungi. Their conidia are inhaled and reach the lungs, where they activate and germinate, and can trigger aspergillosis. Aspergillosis clinical forms presents great risk, mainly for the immunosuppressed patients. Calcium signaling has important role in physiological responses. Calcium corresponds to a secondary messenger that participates in different biological processes, such as cell cycle, differentiation, or homeostasis. In addition, echinocandins, such as caspofungin, are antifungal drugs that target the fungal cell wall. These agents reduce the total concentration of 1,3- β -D-glucans on the cell wall, by inhibiting the activity of 1,3- β -glucan synthase. Inhibition of the synthesis of cell wall components through antifungal drugs may be an important target against infections caused by *A. fumigatus*. Screening of transcription factors genes have been identified. The deletion of the *nsdC* gene results from increased sensitivity to CaCl_2 , EGTA, Congo Red, *Nikkomycin Z*, Calcofluor White, Caspofungin (reduced paradoxical effect), 44C, Menadione and T-butyl hydroperoxide. In addition, the $\Delta nsdC$ null mutant is more resistant to Sorbitol and Cyclosporin. The transcription factor NsdC seems to be involved in the signaling of calcium, and its expression is altered in the absence of the CrzA transcription factor. In addition, NsdC has been shown to be important in processes related to the cell wall, since its deletion leads to the formation of more branched and disorganized hyphae and thicker cell wall. This transcription factor also appears to be a repressor of asexual reproduction. This is due to the fact that the null mutant $\Delta nsdC$ produces conidia in liquid medium and leads to a significant increase in the expression of *brlA*. In addition, the NsdC protein is mostly present in the nucleus, after treatment with CaCl_2 . Other mutants of transcription factors sensitivity to Caspofungin have been identified: $\Delta cbfA$, $\Delta nctA$, $\Delta nctB$ and $\Delta nctC$. Some evidence indicates that NctA and NctB are part of the same complex. Besides that, NctC seems to be related to temperature and osmotic stresses, being important for virulence in *A. fumigatus*. Therefore, more studies are needed in order to better understand the roles of these genes and may be important in bringing greater information about potential therapeutic targets in the treatment of aspergillosis.

Keywords: 1. *Aspergillus fumigatus*. 2. Calcium. 3. Asexual reproduction. 4. Caspofungin. 5. Paradoxical effect. 6. Transcription factors. 7. Virulence

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A regulação da reprodução assexuada em <i>A. nidulans</i>	25
Figura 2. Interação dos dímeros de histona	31
Figura 3. O controle da iniciação da transcrição	33
Figura 4. Análises fenotípicas em meio mínimo sólido.....	50
Figura 5. A construção de $\Delta nsdC::nsdC^+$ foi confirmada por Southern Blot	54
Figura 6. $\Delta nsdC$ apresenta virulência atenuada.....	55
Figura 7. $\Delta nsdC$ pode alterar a resposta imune do hospedeiro	56
Figura 8. A expressão de <i>nsdC</i> parece ser dependente de CrzA na presença de Caspofungina	57
Figura 9. NsdC localiza-se nos núcleos	58
Figura 10. $\Delta nsdC$ apresenta exposição alterada de polissacarídeos da parede celular	60
Figura 11. NsdC é importante para a composição da parede celular	60
Figura 12. $\Delta nsdC$ possui parede celular mais espessa que o tipo selvagem	61
Figura 13. $\Delta nsdC$ apresenta conídios quando cultivado em meio líquido.....	63
Figura 14. O mutante $\Delta nsdC$ apresenta conidióforos quando cultivado em meio líquido	63
Figura 15. A produção de conídios no mutante $\Delta nsdC$ é menor	64
Figura 16. KNC64 produz conídios em meio líquido	64
Figura 17. <i>brlA</i> é induzido na ausência de <i>nsdC</i>	65
Figura 18. KNC64 apresenta sensibilidade diferente em relação ao tipo selvagem	66
Figura 19. Caracterização fenotípica do mutante $\Delta cbfA$	69

Figura 20. Construção da cepa $\Delta cbfA::cbfA^+$	71
Figura 21. Caracterização fenotípica do mutante $\Delta nctA$	72
Figura 22. Southern blot da construção $\Delta nctA::nctA^+$	74
Figura 23. Caracterização fenotípica do mutante $\Delta nctB$	75
Figura 24. Construção de $\Delta nctC::nctC^+$	77
Figura 25. Análises fenotípicas em meio mínimo sólido de $\Delta nctC$ e $\Delta nctC::nctC^+$..	78
Figura 26. Fusão do gene <i>cbfA</i> com GFP	81
Figura 27. Fusão do gene <i>nctA</i> com GFP	81
Figura 28. Fusão do gene <i>nctC</i> com GFP	82
Figura 29. CbfA, NctA e NctC localizam-se nos núcleos.....	82
Figura 30. Análises fenotípicas em meio líquido	83
Figura 31. Os mutantes $\Delta cbfA$ e $\Delta nctC$ podem ter produção de metabólitos secundários alterada	85
Figura 32. Gráficos representativos do ensaio de virulência para as cepas $\Delta cbfA$, $\Delta cbfA::cbfA^+$, $\Delta nctC$, $\Delta nctC::nctC^+$ e tipo selvagem.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Genótipos das linhagens de <i>A. fumigatus</i> utilizadas neste trabalho.....	37
Tabela 2. Genótipos das linhagens de <i>A. nidulans</i> utilizadas neste trabalho.....	37
Tabela 3. <i>Primers</i> utilizados nas construções dos mutantes de <i>A. fumigatus</i>	40
Tabela 4. <i>Primers</i> utilizados para reação de PCR quantitativo em tempo real.....	43
Tabela 5. Concentração inibitória mínima (MIC) para azoles.	84
Tabela 6. Metabólitos secundários produzidos em maior concentração nos mutantes $\Delta cbfA$ e $\Delta nctC$	86

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
BPS	<i>Bathophenanthroline disulfonate</i>
CaM	Calmodulina
CBF	<i>CCAAT-binding factor</i>
CDD	<i>Calcineurin-docking domain</i>
CDRE	<i>Calcineurin-Dependent Response Elements</i>
CFW	Calcofluor White
CHD	<i>Chromodomain helicase DNA binding</i>
Cn	Calcineurina
CnA	Subunidade catalítica A
CnB	Subunidade regulatória B
conA	Concavalina A
CsA	Ciclosporina
CR	Congo Red
Crz1	<i>Calcineurin Responsive Zinc Finger 1</i>
EGTA	<i>Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
HOG	<i>High-osmolarity glycerol</i>
HMG	<i>High mobility group</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
ISWI	<i>Imitation Switch</i>
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
MAT	<i>Mating-type</i>
MIC	Concentração inibitória mínima
NAG	N-acetilglicosamina
NSD	<i>never in sexual development</i>

NC2	<i>Negative cofactor 2</i>
ORF	<i>Open reading frame</i>
PBS	Tampão fosfato-salino
PP2B	Proteína serina-treonina fosfatase tipo B
PKC	Proteína quinase C
RT-PCR	<i>Reverse transcription polimerase chain reaction</i>
SBA	<i>Soybean agglutinin</i>
TBP	<i>TATA-binding protein</i>
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão
UTR	<i>Untranslated region</i>
WGA	<i>Wheat germ agglutinin</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 A biologia de <i>A. fumigatus</i>	20
1.2 A patogênese de <i>A. fumigatus</i>	21
1.3 Os fatores de transcrição relacionados a sensibilidade ao cálcio	22
1.3.1 A transdução de sinal mediada por cálcio	22
1.3.2 A reprodução assexuada e sexuada em <i>Aspergillus</i>	24
1.4 Fatores de transcrição relacionados a sensibilidade à caspofungina	26
1.4.1 A equinocandina caspofungina	26
1.4.2 <i>Histone fold proteins</i>	30
2 OBJETIVOS	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1 Linhagens utilizadas neste trabalho	37
3.2. Meios e métodos de cultura	37
3.3 <i>Screening</i> dos fatores de transcrição	38
3.4 Construção das cepas	38
3.5 Análises fenotípicas	41
3.6 Isolamento do DNA	42
3.7 Curva de sobrevivência em modelo animal de aspergilose pulmonar	42
3.8 Histopatologia	42
3.9 Preparação de macrófagos derivados da medula óssea, fagocitose e <i>killing assay</i>	42
3.10 Reação de PCR quantitativo em tempo real (“RT-PCR”)	42
3.11 Microscopia de fluorescência para GFP	43
3.12 Coloração para os polissacarídeos da superfície da parede celular	43
3.13 Extração e quantificação de açúcares dos polissacarídeos da parede celular	44
3.14 Análise por microscopia de transmissão eletrônica (TEM) da parede celular	45

3.15 Microscopia de contraste diferencial de interferência (DIC) dos micélios	45
3.16 Contagem de conídios produzidos em meio mínimo sólido	46
3.17 Análise de crescimento em meio líquido	46
3.18 Concentração inibitória mínima (MIC)	46
3.19 Dosagem de metabólitos secundários	46
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1 A identificação de fatores de transcrição envolvidos em diferentes tipos de estresses	49
4.2 A caracterização molecular do fator de transcrição NsdC envolvido na resposta ao cálcio	49
4.2.1 A caracterização fenotípica do mutante nulo $\Delta nsdC$ e construção da cepa complementada $\Delta nsdC::nsdC^+$	50
4.2.2 NsdC é importante para a virulência de <i>A. fumigatus</i> em modelo murino neutropênico	54
4.2.3 A expressão de <i>nsdC</i> parece ser dependente de CrzA	56
4.2.4 NsdC está localizado no núcleo	57
4.2.5 O fator de transcrição NsdC parece ser importante para processos relacionados a síntese da parede celular	58
4.2.6 Os fatores de transcrição NsdC de <i>A. fumigatus</i> e de <i>A. nidulans</i> parecem ter função semelhante	62
4.3 Caracterização dos fatores de transcrição envolvidos no efeito paradoxal em resposta à elevadas concentrações de caspofungina	68
4.3.1 As análises fenotípicas de $\Delta cbfA$ e a construção da cepa complementada $\Delta cbfA::cbfA^+$	68
4.3.2 As análises fenotípicas de $\Delta nctA$ e a construção da cepa complementada $\Delta nctA::nctA^+$	71
4.3.3 As análises fenotípicas de $\Delta nctB$	74
4.3.4 As análises fenotípicas de $\Delta nctC$ e a construção da cepa complementada $\Delta nctC::nctC^+$	77
4.3.5. Os fatores de transcrição CbfA, NctA e NctC se encontram nos núcleos	80
4.3.6 Análises fenotípicas em meio líquido: peso seco	82
4.3.7 Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) a azoles	83

4.3.8 Fenótipos de crescimento em meio mínimo líquido e produção de metabólitos secundários	84
4.3.9 Curvas de sobrevivência em camundongos BALB/c.....	86
5 CONCLUSÕES	87
6 REFERÊNCIAS	90

1. Introdução

1.1 A biologia de *A. fumigatus*

A. fumigatus é um fungo filamentoso saprófito ubíquo normalmente encontrado no solo em matéria vegetal em decomposição (Dagenais e Keller, 2009; Nierman et al., 2005; Sugui et al., 2014; Bayram et al., 2018). A reprodução assexual é o principal meio de propagação e dispersão no habitat natural do fungo, embora a reprodução sexual também ocorra (O’Gorman et al., 2009). Os conídios produzidos por esse fungo podem permanecer dormentes no ambiente por vários meses, e são capazes de germinar em um emaranhado de hifas ao pousar sobre um substrato apropriado. O tamanho reduzido e o número abundante de conídios de *A. fumigatus* encontrados no ar os ajudam a alcançar cavidades profundas alveolares em animais e humanos (Bultman et al., 2017; Cramer, 2016; Bayram et al., 2018). Nos últimos 20 anos, *A. fumigatus* tornou-se um dos principais agentes patogênicos, apresentando maior risco de vida, principalmente para indivíduos imunocomprometidos. Isso se deve ao aumento do número de pacientes imunossuprimidos e ao aumento da severidade das terapias imunossupressoras, já que em indivíduos saudáveis os conídios são eficientemente eliminados pela resposta imune inata (Latgé, 2001).

Embora diversas espécies como *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus clavatus* e *Aspergillus nidulans* possam causar doenças, *A. fumigatus* é a espécie mais comum do gênero *Aspergillus*, causadora da aspergilose invasiva e doenças alérgicas (Veerdonk et al., 2017).

A identificação de *A. fumigatus* é baseada predominantemente na morfologia dos seus conídios e conidióforos (Latgé, 1999). As colônias verde-acinzentadas, geralmente, granulares e com abundantes conídios são características do organismo, quando este cresce em ágar glicose-peptona a 37°C. Entretanto, algumas linhagens de *A. fumigatus* isolados produzem conídios sem pigmentação (Latgé, 1999). A micromorfologia desta espécie apresenta hifas hialinas e septadas com paredes paralelas; ao microscópio óptico, as cabeças conidiais apresentam aspecto de vesículas em forma de frasco, com uma série de fíalides uniseriadas, recobrando dois terços superiores de sua superfície.

A dispersão assexual dos conídios de *A. fumigatus* no ambiente é altamente eficiente (Taha et al., 2005; Veerdonk et al., 2017). Estes são muito mais hidrofóbicos do que os conídios produzidos por outras espécies do mesmo gênero,

podendo se dispersar facilmente (Kwon-Chung e Sugui, 2013; Veerdonk et al., 2017). Isso justifica a predominância de conídios de *A. fumigatus* em amostras de ar (Hammed et al. 2004), incluindo o ar de hospitais (Hammed et al., 2004; Mahieu et al., 2000; Pini et al., 2008; Veerdonk et al., 2017). Estima-se que os humanos inalem de 100 a 1000 conídios por dia, alguns deles podendo atingir os alvéolos pulmonares graças ao seu pequeno tamanho que pode variar entre 2 a 3 μm (Latgé, 1999; Veerdonk et al., 2017). Entretanto, os cílios nas células epiteliais das vias aéreas e os macrófagos alveolares residentes removem os conídios inalados. Em indivíduos incapazes de remover esses conídios, os mesmos permanecem nos pulmões e podem germinar, causando infecção invasiva. A temperatura fisiológica do corpo humano de 37 °C é ideal para o crescimento de *Aspergillus* spp. Dessa forma, dentro de 4-6 h, os conídios podem germinar e se tornar pequenas hifas, chamadas tubos germinativos (Veerdonk et al., 2017).

1.2 A patogênese de *A. fumigatus*

Uma das questões mais relevantes no entendimento da patobiologia de *A. fumigatus* é a identificação de determinantes de virulência, o que é complicado devido à redundância de genes com as mesmas funções, efeitos pleiotrópicos de diversos genes e sistemas enzimáticos complexos codificados por *clusters* genéticos. De acordo com a definição clássica, “fatores de virulência” incluem genes que afetam a virulência, mas que são dispensáveis para o crescimento normal. Em *A. fumigatus*, poucos genes atendem a esses requisitos (Sugui et al., 2015). Além disso, *A. fumigatus* possui algumas características que aparentemente contribuem para sua patogenicidade, tais como: rápido crescimento, conídios muito pequenos (diâmetro de 3 a 5 μm), presença de um vasto sistema de reciclagem de radicais livres, componentes específicos da parede celular, além de metabólitos secundários do fungo que atuam como toxinas no organismo hospedeiro, entre outros (Stevens, 2004; Tekaia and Latgé, 2005). Durante a infecção por *Aspergillus*, as hifas representam o morfotipo mais importante, pois seu crescimento apical promove a infecção por invasão do tecido e a penetração de barreiras do hospedeiro. Elas também são demasiadamente grandes para serem eliminadas por fagocitose, sendo

assim um grande desafio para a resposta imune (Brakhage et al., 2010; Beck et al., 2013).

As espécies do gênero *Aspergillus* são relativamente únicas entre os patógenos, pois são responsáveis por uma gama de infecções que se estendem ao longo do espectro clínico, incluindo reações alérgicas primárias, envolvimento saprófito e doença invasiva. O tipo da infecção causada por *Aspergillus* geralmente depende do estado imunológico do hospedeiro. Assim sendo, pacientes imunodeficientes desenvolvem a doença invasiva, enquanto pacientes imunorreativos desenvolvem a doença alérgica. A apresentação clínica mais frequente envolve os pulmões, como a aspergilose invasiva aguda ou crônica e a aspergilose broncopulmonar alérgica. Além dessas doenças, outras infecções causadas por *Aspergillus* são comuns, incluindo sinusite invasiva aguda ou crônica, aspergilose cutânea, aspergiloma e aspergilose cerebral. Em alguns pacientes imunocompetentes, a inalação dos conídios pode resultar em colonização saprofítica não patogênica; entretanto, em pacientes imunocomprometidos a aquisição dos conídios provavelmente resultará no estabelecimento da doença invasiva (Tomee e van der Werf, 2001; Sugui et al., 2015). O grande número de infecções causadas por *Aspergillus* é sustentada por indivíduos imunocomprometidos, incluindo aqueles que passaram por transplante de células-tronco hematopoiéticas ou transplantes de órgãos sólidos, pacientes com câncer ou imunodeficiência congênita (e. g. doença granulomatosa crônica) e pacientes após tratamento de doença autoimune (Richardson, 2005; Sugui et al., 2015). Além disso, a falta de terapias efetivas contribui para a alta mortalidade, resultando num índice de mortes entre 30 e 90 % (Ellis, 1999; Brakhage, 2002).

1.3 Os fatores de transcrição relacionados a sensibilidade ao cálcio

1.3.1 A transdução de sinal mediada por cálcio

Por ser um patógeno oportunista, quase todos os mutantes com defeitos em genes responsáveis pelo crescimento normal de *A. fumigatus*, mostraram virulência deficiente em modelos murinos. Entretanto, sabe-se que nem todos os mutantes de *A. fumigatus* com defeitos de crescimento apresentam alterações na virulência.

Diversos desses genes podem ser considerados fatores de virulência por serem cruciais no estabelecimento da infecção no hospeiro, onde os nutrientes são limitados (Sugui et al., 2015). A via de sinalização cálcio/calcineurina é um exemplo de sistema necessário para o crescimento normal e que gera alto impacto na virulência de *A. fumigatus* (Steinbach et al. 2007; Sugui et al., 2015).

A sinalização de cálcio desempenha importante papel na regulação de diversas respostas fisiológicas tanto em organismos procariotos, quanto em eucariotos. O Ca^{2+} é um mensageiro secundário ubíquo que participa de diversos processos biológicos, como ciclo celular, diferenciação, ou homeostase. Dessa forma, os níveis de cálcio intracelular devem ser cuidadosamente regulados, já que concentrações excessivas podem levar a morte celular (Clapham, 2007; Hernández-Ortiz e Espeso, 2013).

As células eucarióticas possuem uma gama complexa de canais permeáveis, bombas, transportadores e proteínas sinalizadoras de Ca^{2+} (Matheos et al., 1997; Ren et al., 2017). A calmodulina (CaM) é um mediador da sinalização de cálcio essencial. O cálcio se liga à CaM desencadeando mudanças estruturais que permitem a interação da CaM com seus efetores. Um importante alvo da CaM é a proteína serina-treonina fosfatase tipo B (PP2B) calcineurina (Chin e Means, 2000; Hernández-Ortiz e Espeso, 2013). A calcineurina, Cn, é um heterodímero composto de uma subunidade catalítica A (CnA) e uma subunidade regulatória B (CnB) (Guerini, 1991; Hernández-Ortiz e Espeso, 2013). A ativação da fosfatase calcineurina requer, primeiramente, a ligação de Ca^{2+} na subunidade regulatória CnB; em seguida, o complexo Ca^{2+} -CaM, se liga ao domínio de ligação presente na subunidade CnA (Guerini, 1997; Hernández-Ortiz e Espeso, 2013). A eficiência da desfosforilação realizada pela calcineurina é dependente da interação com uma sequência específica do substrato, chamada *calcineurin-docking domain* (CDD) (Hernández-Ortiz e Espeso, 2013).

Em mamíferos, a calcineurina está envolvida com a diferenciação muscular cardíaca (Chin et al., 1998; Kramer et al., 2003; Parsons et al., 2007; Reedy et al., 2010), a memória (Mansuy et al., 1998; Weitlauf and Winder, 2001; Reedy et al., 2010), a ativação de células-T (Clipstone e Crabtree, 1992; Reedy et al., 2010) e a apoptose (Krebs, 1998; Saito et al., 2000; Shibasaki and McKeon, 1995; Wang et al., 1999; Reedy et al., 2010). Em *Cryptococcus neoformans*, a atividade da calcineurina é essencial para o crescimento do fungo na temperatura corporal de um mamífero, à

37 °C (Liu et al., 2006), mas não à temperatura ambiente. É também necessária para o alongamento das hifas durante o acasalamento e a frutificação haplóide (Odom et al., 1997; Cruz et al., 2000, 2001; Fox et al., 2001; da Silva Ferreira et al., 2007). Mutantes para o gene da calcineurina em *C. albicans* tiveram a virulência reduzida em uma modelo de infecção sistêmica (Cruz et al., 2002; Sanglard et al., 2003; da Silva Ferreira et al., 2007).

A calcineurina também regula a localização e a atividade do fator de transcrição chamado Crz1p (**Calcineurin Responsive Zinc Finger 1**). Em resposta ao aumento de Ca^{2+} , a calcineurina desfosforila o Crz1p, e este é translocado para o núcleo (Stathopoulos-Gerontides et al., 1999; Karababa et al., 2006). O Crz1p contém o motivo de ligação ao DNA C2H2 *zinc finger* e interage com seqüências específicas (motifs) da região promotora de diversos genes, denominadas CDRE (*Calcineurin-Dependent Response Elements*; Elementos responsivos dependentes de calcineurina), regulando a sua expressão (Stathopoulos e Cyert, 1997; Soriani et al., 2008). Tem sido relatado que a terapia com inibidores da via de calcineurina e agentes antifúngicos existentes aumenta a atividade contra *A. fumigatus* (Kontonyannis et al., 2003; Steinbach et al., 2004; da Silva Ferreira et al., 2007).

O CrzA em *A. fumigatus*, homólogo do gene Crz1 em *Saccharomyces cerevisiae*, não é um gene essencial para *A. fumigatus*. Entretanto, a sua deleção confere uma severa deficiência de crescimento na presença de altas concentrações de cálcio e manganês. Além disso, a inibição da calcineurina mediada por ciclosporina (CsA), condições ácidas ou caspofungina, são capazes de inibir o crescimento do mutante ΔcrzA . A deleção de *crzA* também causa diminuição da conidiação, altera a expressão de mRNA de transportadores de cálcio e a perda de virulência quando comparado ao tipo selvagem ou com o complementante correspondente (Soriani et al., 2008).

1.3.2 A reprodução assexuada e sexuada em *Aspergillus*

As espécies de *Aspergillus* são bem conhecidas pela produção de esporos assexuais, chamados conídios. Estes são produzidos por conidióforos (Yu, 2010; Samson et al., 2014; Ojeda-López et al., 2018). O *A. nidulans* tem sido usado como modelo de estudo de conidiação por muitas décadas e, conseqüentemente,

conhecimentos consideráveis tem sido acumulados sobre vias de regulação das espécies de *Aspergillus* (Adams et al., 1998; Etxebeste et al., 2010; Park e Yu, 2012; Ojeda-López et al, 2018). Como pode ser visto na Figura 1, o início da conidiação envolve a regulação de milhares de genes em *A. nidulans* (Garzia et al., 2013; Cánovas et al., 2014; Ojeda-López et al, 2018), os quais representam uma série de reguladores *upstream* (FluG, FluC, FlibD, FlibE, FlibB), negativos (SfgA, NsdD, StuA, MedA), centrais (BrlA, AbaA, WetA), e *velvet* (VelB, VosA, VeA, VelC) (de Vries et al., 2017; Ojeda-López et al., 2018). Além disso, o primeiro projeto de sequenciamento de *Aspergillus* demonstrou que a via central de regulação (composta por BrlA, AbaA, WetA) está presente também em espécies como *A. fumigatus* e *A. niger*, sugerindo que essa via também controla a reprodução assexuada nessas espécies (Pel et al., 2007; Samson et al., 2009; Yu, 2010; Ojeda-López et al, 2018).

Figura 1. A regulação da reprodução assexuada em *A. nidulans*. (A) Representação esquemática do desenvolvimento de conidióros em *A. nidulans*. (B) Modelo genético da regulação do desenvolvimento de conidióforos (Ojeda-López et al., 2018).

Fonte: Ojeda-López et al. (2018)

Enquanto a reprodução assexuada é observada em todas as espécies de *Aspergillus* (Raper e Fennell, 1965; Samson et al., 2014; Ojeda-López et al, 2018), a reprodução sexual é observada somente em aproximadamente 36% das espécies

(Dyer e O'Gorman, 2012; Ojeda-López et al, 2018). Quando a reprodução sexuada ocorre, há formação de ascósporos dentro de clestotécios, que são rompidos, quando maduros, para liberação dos esporos (Ojeda-López et al, 2018). Diversos estudos tem sido feitos com *A. nidulans* para determinar as bases genéticas do desenvolvimento sexual, com mais de 70 genes com papel em diferentes estágios do processo sexual identificados. Esses genes foram divididos em envolvidos na percepção de sinais ambientais, *mating*, transdução de sinal, fatores de transcrição e outras proteínas reguladoras, além de relacionados a processos fisiológicos endógenos, e produção e maturação de ascósporos (Dyer e O'Gorman 2012; Ojeda-López et al, 2018). Em especial, pode-se destacar a descoberta de que o sistema reprodutivo de determinadas espécies é regulado pela presença de genes *mating-type* (MAT) (Dyer et al., 2016; Ojeda-López et al, 2018). O genoma de *A. nidulans* contém os genes *mating-type* MAT1 e MAT2, que codificam o domínio alfa e o grupo de alta mobilidade (HMG)-*domain*, respectivamente (Galagan et al., 2005; Paoletti et al., 2007; Ojeda-López et al, 2018). Descobertas similares foram feitas para os homotáticos *Aspergillus (Neosartorya) fischeri* e *Aspergillus (Petromyces) alliaceus* (Rydholm et al., 2006; Ramirez-Prado et al., 2008; Ojeda-López et al, 2018). Outros trabalhos identificaram os isolados complementares MAT1-1 e MAT1-2 em espécies como *A. fumigatus*, *Aspergillus parasiticus*, *A. flavus* e *Aspergillus lentulus* (Paoletti et al., 2005; O'Gorman et al., 2009; Horn et al., 2009a,b; Swilaiman et al., 2013; Ojeda-López et al, 2018).

1.4 Fatores de transcrição relacionados a sensibilidade à caspofungina

1.4.1 A equinocandina caspofungina

As infecções fúngicas são um dos maiores problemas de saúde global, com mais de 300 milhões de pessoas atingidas, resultando em aproximadamente 1,35 milhões de mortes anualmente (Brown et al., 2012; Perlin, 2015). As infecções invasivas de fungos são consequência de doenças subjacentes e condições como AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), câncer, transplante de órgãos e terapias com corticosteroides, sendo o *A. fumigatus* um dos principais organismos responsáveis pelas mortes nessas condições (Brown et al., 2012; Perlin, 2015). Em

todos os casos, o tratamento requer o uso de agentes antifúngicos, que são ainda restritos (Perlin, 2015). Dessa forma, são necessárias novas estratégias de terapias (Cowen e Lindquist, 2005; Cowen, 2008; Cowen et al., 2009; Lamoth et al., 2014). As equinocandinas (e. g. caspofungina, anidulafungina e micafungina) são antifúngicos que tem como alvo a parede da célula fúngica. Esses agentes reduzem a concentração total de 1,3- β -D-glucanos na parede celular, através da inibição da atividade da 1,3- β -glucana sintase, resultando na produção de hifas com defeitos morfológicos (Bowman et al, 2002; Fortwendel et al., 2009). Curiosamente, a inibição da síntese de um tipo de polissacarídeo presente na parede celular pode levar ao aumento de outro, o que presumivelmente representa um mecanismo de defesa. Esse fenômeno, denominado efeito paradoxical, é resultado da atenuação da atividade das equinocandinas em elevadas concentrações (Lamoth et al., 2014). Por exemplo, em *C. albicans* a inibição da síntese de 1,3- β -D-glucana sintase pela caspofungina leva a um aumento compensatório de quitina, permitindo que a célula escape da letalidade (Stevens et al, 2006; Walker et al., 2008; Fortwendel et al., 2009), por resultar numa restauração da integridade da parede celular (Walker et al., 2008; Walker et al., 2015). Assim sendo, se a síntese de ambos for inibida, o fungo poderia ficar sem defesas (Stevens et al., 2006).

Moreno-Velásquez et al. (2017) mostraram que as principais hifas de *A. fumigatus* rapidamente superam o efeito fungicida da caspofungina, principalmente por lise celular repetida acoplada à regeneração intra-hifa. Isso, juntamente com a hiper-ramificação, representam as principais razões pelas quais a colônia apresenta tamanho reduzido, observado macroscopicamente, durante as primeiras 36 – 48 h de tratamento com caspofungina, quando comparada com colônias não tratadas. O tamanho reduzido nesse período não é devido à atividade fungistática da caspofungina, mas, aos efeitos da atividade lítica e fungicida.

A parede celular de *A. fumigatus* é composta de 20% de quitina, que é sintetizada por oito enzimas diferentes: *A. fumigatus* ChsA (AfChsA), AfChsB, AfChsC, AfChsD, AfCsmA (AfChsE), AfChsF, AfChsG, e AfCsmB (Mellado et al., 1995; Mellado et al., 1996a; Mellado et al., 1996b; Latgé, 2007; Jimenez-Ortigosa et al., 2012; Muszkieta et al., 2014; Walker et al., 2015). Por homologia, essas enzimas foram classificadas em diferentes classes. As classes III e V a VII de quitina sintases são específicas de fungos filamentosos. O mutante $\Delta AfchsD$ (classe VI) mostrou aumento no conteúdo de quitina, enquanto que o $\Delta AfchsF$ apresentou 25% de

redução de quitina, comparados com o tipo selvagem (Muszkieta et al., 2014; Walker et al., 2015). A deleção da enzima de classe V, *AfcsmA*, resultou numa redução de 80% da quitina dos conídios (Muszkieta et al., 2014; Walker et al., 2015), e a deleção de *AfcsmA* e *AfcsmB* (classe VII) gerou uma hipersensibilidade a caspofungina (Jimenez-Ortigosa et al., 2012; Walker et al., 2015). O *AfChsG* também mostrou-se importante para a atividade *in vitro* da enzima Chs (quitina sintase) e está envolvido na síntese de quitina na parede de conídios (Muszkieta et al., 2014; Walker et al., 2015). Entretanto, o mutante quádruplo $\Delta AfchsA \Delta AfchsC \Delta AfchsB \Delta AfchsG$ é tão virulento quanto o tipo selvagem, em um modelo murino de aspergilose pulmonar (Muszkieta et al., 2014; Walker et al., 2015). O mutante duplo classe III / classe V $\Delta AfchsG \Delta AfchsE$ teve redução de 50% de quitina quando comparado ao tipo selvagem e de 95% da atividade da quitina sintase (Mellado et al., 2003; Walker et al., 2015). Walker et al. (2015) mostraram que a alta concentração de quitina pode fazer com que a célula sobreviva ao tratamento com caspofungina e que essa resposta é fortemente dependente de *AfCHSG*.

As equinocandinas são capazes de induzir um conjunto de genes relacionados a via da proteína quinase C (PKC) que mantém a integridade da parede celular (Reinoso-Martin et al., 2003; Perlin, 2015). Os sinais de estresse na superfície celular são transmitidos para Rho1 GTPase, que pode mobilizar uma variedade de efetores. A ativação de sinais pertinentes a integridade da parede da célula altera a produção de diversos polímeros de carboidratos presentes na parede, resultando em remodelagem da parede celular (Levin, 2011; Perlin, 2015). A inibição da biossíntese de glucanos por equinocandinas induz a PKC, Ca^{2+} /calcineurina/Crz1 e HOG que estão mediando as respostas (Munro et al., 2007; Walker et al., 2008; Perlin, 2015). A Hsp90 também é induzida, levando a tolerâncias a equinocandinas através das proteínas calcineurina, Mkc1 (LaFayette et al., 2010; Singh et al., 2009; Perlin, 2015) e co-chaperonas Sgt1 (Singh et al., 2009; Shapiro et al., 2012; Singh-Babak et al., 2012; Perlin, 2015). O Hsp90 regula a resposta ao estresse celular que tem um profundo impacto na resistência a equinocandinas (Singh et al., 2009; Singh-Babak et al., 2012; Cowen, 2009; Cowen e Lindquist, 2005; Lamothe et al., 2014; Cowen et al., 2009; Perlin, 2015).

O aumento compensatório da quitina é coordenado pela PKC, HOG e via da calcineurina (Munro et al., 2007; Perlin, 2015). Para a maioria das espécies de *Candida*, a ativação do Chs2 e Chs8 permite a sobrevivência na presença de

equinocandinas (Walker et al., 2008; Walker et al., 2013; Perlin, 2015). Em *Candida glabrata*, a proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) da via de sinalização PKC, Slt2, controla o aumento de quitina em resposta a equinocandinas (Cota et al., 2008; Perlin, 2015). Além disso, os esfingolípídios de membrana podem interagir com as equinocandinas e modular a sensibilidade de enzimas a droga (Healey et al., 2011; Healey et al., 2012; Perlin, 2015). O tratamento de *C. albicans* com uma combinação de CaCl_2 e Calcofluor White estimulou a via Ca^{2+} -calcineurina e as vias de sinalização PKC, respectivamente, o que levou a uma concentração de quitina na parede celular 3 a 4 vezes maior. As cepas de *C. albicans* com maiores conteúdos de quitina apresentaram menor susceptibilidade a caspofungina quando comparadas a células com conteúdo semelhante ao tipo selvagem (Walker et al., 2008; Mora-Montes et al., 2011; Lee et al., 2012; Walker et al., 2013; Walker et al., 2015). Ademais, em *A. fumigatus*, o tratamento com caspofungina no mutante ΔcrzA (derivado da linhagem clínica Af293) não resultou em aumento de quitina na parede celular, revelando uma função da via da calcineurina na regulação compensatória da quitina quando ocorre a inibição da 1,3- β -D-glucana sintase (Fortwendel et al., 2009). Em *C. albicans*, a presença de ciclosporina (inibidor da via da calcineurina) é capaz de modular o efeito paradoxical da calcineurina, tornando-o completamente ausente (Wiederhold et al., 2005). Além disso, em resposta a caspofungina, ocorre uma rápida e transitória indução de genes que codificam os componentes responsáveis pela integridade da parede celular em *C. albicans* (Wiederhold et al., 2005). De fato, a integridade da parede celular e a via da calcineurina, embora independentes, possuem funções correlacionadas em *S. cerevisiae* (Nakamura et al., 2001; Wiederhold et al., 2005). Em suma, a hipótese proposta é de que as respostas adaptativas estabilizam as células na presença da droga, o que dá ao organismo tempo para escapar da ação da droga através da formação de mutações *hot-spot* no gene *FKS1* (Perlin, 2015).

A plasticidade da parede celular fúngica é mantida pela via de integridade da parede celular, uma cascata de sinalização conservada em levedura e fungos filamentosos, que é ativada em resposta a vários estresses, e visa proteger a parede celular a fim de garantir a sobrevivência do fungo. Em *A. fumigatus*, a via de integridade da parede celular engloba a cascata de proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), resultando na fosforilação de MpkA e subsequente translocação para o núcleo, onde estimula a resposta transcripcional (Valiante et al., 2008; Valiante et al., 2009; Jain, et

al., 2011; Ries et al., 2017). A exposição a baixas concentrações de caspofungina, cujo efeito paradoxical é ausente, ativa a via de sinalização de integridade da parede celular. Isso foi mostrado pelo aumento da fosforilação do MpkA dessa via. Entretanto, altas concentrações de caspofungina não resultam na fosforilação de MpkA, sugerindo uma inativação da via (Ries, et al., 2017). Na verdade, MpkA parece exercer função repressiva em alguns genes codificadores da quitina-sintase em altas concentrações de caspofungina (Ries et al., 2017). Entretanto, é possível que MpkA esteja envolvido na regulação positiva de outros genes como a expressão de β -1,3- e α -1,3-glucano sintases e 1,3- β -glucanosiltransferases (Rocha et al., 2016; Ries et al., 2017). Em *A. fumigatus*, assim como em *C. albicans*, o aumento da expressão de genes que codificam quitina-sintases, durante o efeito paradoxical provocado pela caspofungina, é dependente da sinalização por calcineurina (Fortwendel et al., 2010; Walker et al., 2008; Ries et al., 2017). Análises subsequentes de ligação ao promotor da quitina-sintase identificaram que o fator de transcrição dependente de cálcio/calcineurina, o CrzA, tem papel no efeito paradoxical por se ligar e regular diretamente a expressão de genes que codificam as quitina-sintases. Além disso, o CrzA é translocado para o núcleo, de maneira dependente da calcineurina, na presença de diferentes concentrações de caspofungina. Outro fator de transcrição identificado na via de sinalização cálcio-calcineurina, nomeado ZipD, parece estar envolvido na mediação da resposta de integridade da parede celular regulando, direta ou indiretamente, genes que codificam enzimas da parede celular. Juntos esses resultados sugerem que a regulação de genes que codificam quitina-sintases é governada por vias diversas e paralelas e/ou pelo *cross-talking* de vias de sinalização celular (Ries, et al., 2017).

1.4.2 Histone fold proteins

A estrutura da cromatina pode atuar como uma estrutura repressiva, que permite maior controle de diversos processos celulares, incluindo transcrição, replicação, recombinação e reparo do DNA. Ela é composta de uma estrutura dinâmica regulada por várias enzimas como complexos de remodelagem ATP-dependentes, que mobilizam nucleossomos para expor ou ocultar diferentes regiões promotoras da transcrição (Naklikar et al., 2002; Dang et al., 2007). Os complexos remodeladores de cromatina ATP-dependentes são classificados em subfamílias

baseado em suas subunidades catalíticas ATPase, como SNF2, ISWI (*Imitation Switch*), CHD (*Chromodomain helicase DNA binding*) e INO80 (Naklikar et al., 2002; Shen et al., 2000; Dang et al., 2007). Os membros de subfamílias diferentes apresentam especificidade a substratos diferentes. Os complexos ISWI são responsáveis pelo movimento de nucleossomos em *cis*, sem o deslocamento permanente do DNA e o rompimento da estrutura final do nucleossomo (Hamiche et al., 1999; Langst et al., 1999; Dang et al., 2007). Em *S. cerevisiae*, dois ISWI ATPases foram identificados e caracterizados, Isw1 e Isw2 (Tsukiyama et al., 1999; Dang et al., 2007). Inicialmente, verificou-se que Isw2 (130 kDa) se liga a Itc1 (145 kDa); posteriormente, duas outras *histone fold proteins*, Dpb4 e Dls1, também foram identificadas como componentes do complexo ISW2 (Iida e Araki, 2004; McConnell et al., 2004; Dang et al., 2007). A Dpb4p (22.0 kDa) é homóloga a HuCHRA-17 em humanos e a CHRA-14, em *Drosophila*. A Dpb4 também é parte da DNA polimerase ϵ e está envolvida na síntese da fita molde e complementar de DNA (Ohya et al., 2000; Dang et al., 2007). Já Dls1 (*Dpb3-like subunit 1*) é homóloga a Dpb3p, que corresponde a outra subunidade da DNA polimerase ϵ , que interage com a Dpb4p. Essas proteínas apresentam similaridade com os *histone fold domains* dos fatores de transcrição NF-YC (CBF-C) e NF-YB (CBF-A), respectivamente, e supostamente interagem entre si via “*handshake*” *motif*, similar ao dímero de histona H2A/H2B (Ohya et al., 2000; Dang et al., 2007), o que pode ser visto na Figura 2.

Figura 2. Interação dos dímeros de histona. As proteínas histona (H3, H4, H2A e H2B) têm um domínio estrutural em comum que consiste em 3 α -hélices ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$) separadas em dois loops (L1 e L2), chamados de *histone fold*, que facilitam a heterodimerização de H2A com H2B e H3 com H4. Essas interações resultam na unidade estrutural dimérica básica do nucleossomo (Luger et al., 1997; Swaminathan e Workman, 2015). Cada par forma o ‘handshake’ *motif* a partir da interação cabeça-cauda, que forma o eixo tetramérico central do nucleossomo (Swaminathan e Workman, 2015).

Fonte: Swaminathan e Workman (2015)

1.4.3 A regulação transcripcional por NC2

A ligação do TATA-binding protein (TBP) ao TATA box corresponde ao primeiro passo da montagem do complexo de pré-iniciação da RNA polimerase II no promotor, visando o subsequente recrutamento dos fatores de transcrição restantes e da polimerase II (Burley e Roeder, 1996; Cang e Prelich, 2002), ilustrado na Figura 3. O recrutamento de TBP é um alvo frequente para a regulação da transcrição. Diversas proteínas que estimulam a formação do complexo TBP-TATA já foram identificadas (Lee e Young, 1998; Cang e Prelich, 2002), incluindo os *promoter-bound activators* TFIi e IIB (Yokomori et al., 1994; Weideman et al., 1997; Imbalzano et al., 1994; Zhao e Herr, 2002; Hisatake et al., 1993; Cang e Prelich, 2002). Entretanto, o complexo TBP-TATA é inibido através de mecanismos distintos por histonas (Workman e Roeder, 1987; Cang e Prelich, 2002), Mot1 (Auble et al., 1994, Cang e Prelich, 2002), dTAFII230 (Liu et al., 1998; Cang e Prelich, 2002) e dimerização do TBP (Jackson-Fisher et al., 1999; Cang e Prelich, 2002).

O TBP é regulado, também, depois de se ligar ao TATA box, pelo NC2 (*negative cofactor 2*). Inicialmente, o NC2 foi identificado por uma atividade em extratos nucleares de humanos, que se ligava a TBP, inibindo o recrutamento de TFIIA e TFIIB (Meisterernst e Roeder, 1991; Cang e Prelich, 2002) e, posteriormente, a montagem do complexo de pré-iniciação. O NC2 é formado por duas subunidades (Eagelson et al., 1996; Inostroza et al., 1992; Goppelt e Meisterernst, 1996; Cang e Prelich, 2002) que são altamente conservadas em eucariotos. Em *S. cerevisiae*, a subunidade NC2 α é codificada por *BUR6/NCB1* e a subunidade NC2 β por *YDR1/NCB2* (Goppelt e Meisterernst, 1996;

Prelich, 1997; Gadbois, et al., 1997, Kim, 1997; Cang e Prelich, 2002). Mutações em *BUR6* aumentam a transcrição a partir do promotor UAS-*less* SUC2 (Prelich e Winston, 1993; Cang e Prelich, 2002), enquanto mutações tanto em *BUR6* quanto *NCB2* são capazes de suprimir a mutação em *SRB4*, que codifica uma subunidade da holoenzima polimerase II (Gadbois, et al., 1997, Lee et al., 1998; Cang e Prelich, 2002).

A função de *NC2 in vivo* parece ser mais complexa, pois mutações em *BUR6* reduzem a transcrição a partir de vários promotores em levedura (Prelich, 1997; Geisberg et al., 2001; Cang e Prelich, 2002) e mutações em *NCB2* reduzem a transcrição dos promotores *HIS3* e *HIS4* TATA-less (Lemaire et al., 2000; Cang e Prelich, 2002). Essas observações sugerem que *NC2* pode tanto inibir quanto estimular a transcrição *in vivo*. (Cang e Prelich, 2002).

Figura 3. O controle da iniciação da transcrição. Fatores de transcrição se ligam a elementos de DNA para recrutar complexos regulatórios como *Mediator*, histona aciltransferases e remodeladores de cromatina (SWI/SNF) alterando a estrutura da cromatina. O complexo de pré-iniciação (PIC) começa pela ligação do TFIID, incluindo *TATA-binding protein* (TBP), ao promotor principal. A associação de TFIID ao promotor é estabilizada pela ligação dinâmica de fatores associados a TBP (TAFs) a caudas de histona modificadas. BTAF1/Mot1 e NC2 podem remover TBP do promotor. Proteínas móveis estão indicadas em vermelho, enquanto as mais estáveis estão indicadas em azul (Koster et al., 2015)

2 Objetivos

O *A. fumigatus* é um importante patógeno causador de infecções severas e, geralmente, fatais. Para fungos patogênicos, o cálcio é essencial no crescimento, na tolerância a estresses e na diferenciação (Jackson e Heath, 1989; Jackson e Heath, 1993; Silverman-Gavrila e Lew, 2000; Loss et al., 2017). Através do *screening* realizado em nosso laboratório, o fator de transcrição NsdC mostrou-se importante nas vias de sinalização dependentes de cálcio, por sua deleção resultar em elevada sensibilidade, além de defeitos no crescimento vegetativo. Este fator de transcrição, por ser ortólogo ao NsdC de *A. nidulans*, parece ser de grande relevância, pois pode nos proporcionar maiores conhecimentos sobre a regulação da reprodução sexuada em *A. fumigatus*. Também, vias de sinalização dependentes de cálcio já se mostraram importantes para a virulência (Cruz et al., 2002; Sanglard et al., 2003; da Silva Ferreira et al., 2007). Além disso, a composição, a arquitetura e os mecanismos biossintéticos da parede celular fúngica são importantes para o entendimento da patogênese da aspergilose invasiva (Latgé, 2007; Fortwendel et al., 2009). Devido ao seu papel na proteção celular e no crescimento das hifas, a inibição da síntese de componentes da parede celular através de drogas antifúngicas pode ser um alvo importante contra infecções causadas por *A. fumigatus* (Maertens et al., 2004; Fortwendel et al., 2009). Através de *screenings* para a sensibilidade a cálcio, caspofungina e outros tipos de estresses, nós fomos capazes de identificar cinco mutantes ($\Delta cbfA$, $\Delta nctA$, $\Delta nctB$, $\Delta nctC$, $\Delta nsdC$) em fatores de transcrição que mostram sensibilidade diferencial a esses agentes. Dessa forma, com o intuito de conhecer melhor o envolvimento desses fatores de transcrição nas vias de sinalização dependentes de cálcio, na reprodução e no efeito paradoxal de *A. fumigatus*, os objetivos deste trabalho foram:

- (i) A caracterização fenotípica de mutantes nulos para os cinco fatores de transcrição;
- (ii) A construção de cepas complementadas para os mutantes deletados;
- (iii) A verificação da localização celular das proteínas de interesse através da fusão funcional destas proteínas com GFP;
- (iv) A verificação do envolvimento desses fatores de transcrição na virulência através do modelo neutropênico de aspergilose pulmonar em camundongos e do modelo imunocompetente larval em *G. mellonella*

3 Materiais e Métodos

3.1 Linhagens utilizadas neste trabalho

Para os experimentos realizados com *A. fumigatus*, foram utilizadas as seguintes cepas:

Tabela 1. Genótipos das linhagens de *A. fumigatus* utilizadas neste trabalho.

Linhagem	Genótipo	Referência
CEA17	<i>akuB</i> (KU80)Δ, MAT1-1	Da Silva Ferreira et al., 2006
Δ <i>nsdC</i>	Δ <i>nsdC</i> :: <i>pyrG</i> , <i>akuB</i> (KU80)Δ, MAT1-1	este trabalho
Δ <i>nsdC</i> :: <i>nsdC</i> +	Δ <i>nsdC</i> :: <i>nsdC</i> :: <i>prtA</i> , <i>akuB</i> (KU80)Δ, MAT1-1	este trabalho
<i>nsdC</i> :GFP	<i>nsdC</i> ::GFP:: <i>pyrG</i> , <i>akuB</i> (KU80)Δ, MAT1-1	este trabalho
<i>nsdC</i> ::3xHA	<i>nsdC</i> ::3xHA:: <i>pyrG</i> , <i>akuB</i> (KU80)Δ, MAT1-1	este trabalho
Δ <i>cbfA</i>	Δ <i>cbfA</i> :: <i>pyrG</i> , <i>akuB</i> (KU80)Δ, MAT1-1	este trabalho
<i>cbfA</i> :GFP	<i>cbfA</i> ::GFP:: <i>pyrG</i> , <i>akuB</i> (KU80)Δ, MAT1-1	este trabalho
Δ <i>nctB</i>	Δ <i>nctB</i> :: <i>pyrG</i> , <i>akuB</i> (KU80)Δ, MAT1-1	este trabalho
<i>nctB</i> :GFP	<i>nctB</i> ::GFP:: <i>pyrG</i> , <i>akuB</i> (KU80)Δ, MAT1-1	este trabalho
Δ <i>nctA</i>	Δ <i>nctA</i> :: <i>pyrG</i> , <i>akuB</i> (KU80)Δ, MAT1-1	este trabalho
<i>nctA</i> :GFP	<i>nctA</i> ::GFP:: <i>pyrG</i> , <i>akuB</i> (KU80)Δ, MAT1-1	este trabalho
Δ <i>nctC</i>	Δ <i>nctC</i> :: <i>pyrG</i> , <i>akuB</i> (KU80)Δ, MAT1-1	este trabalho
<i>nctC</i> :GFP	<i>nctC</i> ::GFP:: <i>pyrG</i> , <i>akuB</i> (KU80)Δ, MAT1-1	este trabalho

Já para os experimentos realizados com *A. nidulans*, foram utilizadas as cepas:

Tabela 2. Genótipos das linhagens de *A. nidulans* utilizadas neste trabalho.

Linhagem	Genótipo	Referência
A4	Glasgow wild type (veA+)	FGSC
KNC64	<i>anA1</i> ; Δ <i>nsdC</i> :: <i>argB</i> ; Δ <i>arB</i> :: <i>trpC</i>	Kim et al., 2009
KNC64 <i>pyrG89</i> ⁻	<i>pyrG89</i> ; Δ <i>nsdC</i> :: <i>argB</i> ; Δ <i>arB</i> :: <i>trpC</i>	este trabalho
GR5	<i>pyroA4 pyrG89, wA3</i>	FGSCA773

3.2. Meios e métodos de cultura

As cepas de *A. fumigatus* foram cultivadas em meio YAG (dextrose 2% p/v, extrato de levedura 0,5% p/v, solução de elementos traços 0,1% v/v, ágar 2% p/v), ou meio mínimo (MM), que consiste de glicose 1%, solução de elementos traços

0,1% v/v, soluções de sais 20X, pH 6.5) com ou sem a adição de ágar 2% (p/v) (KAFFER, 1997) e/ou uridina (0,12%) e uracila (0,12%). As cepas foram incubadas a 37°C, por 48h.

3.3 Screening dos fatores de transcrição

A partir de uma biblioteca de 395 deleções de fatores de transcrição foi realizado um *screening* na presença de diferentes tipos de estresses como CaCl₂ e NaCl (estresse iônico), EGTA (quelante de cálcio), Congo Red e Calcoflúor White (estresse de parede celular), Sorbitol (estresse osmótico), *Nikkomycin Z* (inibidor competitivo da quitina sintase 3), Caspofungina (inibidor da 1,3-β-D-glucano sintase), 44°C (estresse térmico), Ciclosporina (inibidor da calcineurina), Menadiona e T-butil hidroperóxido (estresse oxidativo), entre outros. Foram inoculadas 10⁴ conídios de cada linhagem em meio mínimo sólido juntamente com o agente causador de estresse, e incubadas por 48 h, à 37 °C. Os mutantes que apresentaram sensibilidade aumentada para CaCl₂ e Caspofungina foram selecionados e validados como descrito no item 3.5.

3.4 Construção das cepas

As construções foram feitas através do sistema de recombinação *in vivo* em *S. cerevisiae*, descrito por COLOT e colaboradores (2006) e adaptado para *A. fumigatus* por Malavazi & Goldman (2012). As deleções foram realizadas em colaboração com Paul Bowyer e Michael Bromley, na Universidade de Manchester, a partir da amplificação das regiões 5UTR e 3UTR de *A. fumigatus* dos genes de interesse, utilizando a Higromicina B fosfotransferase como marcador, sob controle do promotor *gpdA* e terminador exógeno *trpC*. Para construção das fusões com GFP e 3xHA, a partir do plasmídeo pOB435 e pOB430, respectivamente, foram amplificados os fragmentos contendo linker-GFP-*trpC*-pyrG e linker-3xHA-*trpC*-pyrG (com exceção de *nctC::GFP*). Já para a construção de *nctC::GFP*, o marcador pyrG utilizado foi amplificado do plasmídeo pCDA21 e o GFP, a partir do pMCB17apx. Através de recombinação homóloga em *S. cerevisiae*, foram adicionados a ORF e as regiões 5UTR e 3UTR dos genes de interesse. Além disso, as complementações foram realizadas com fragmentos contendo 1kb das regiões 5UTR e 3UTR e a

respectiva ORF, em co-transformação com vetor pPTRI. O meio de cultura foi suplementado com *Pyrithiamine hydrobromide* (Sigma) 1 µg/mL. A recombinação homóloga e a substituição dos genes foi confirmada por PCR e Southern blot. Os primers utilizados nas construções encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3. *Primers* utilizados nas construções dos mutantes de *A. fumigatus*.

Gene / Plasmídeo	Primer	Sequência 5'-3'
pOB435 / pOB430	OZG916 fw	GGAGGTGGTAGCGGTGGT
	OZG694 rv	CTGTCTGAGAGGAGGCACTGA
<i>ptrA</i>	Piritiamina fw	GATCTGACAGACGGGCAATTG
	Piritiamina rv	CTATCATGGGGTGACGATGAGCCG
	ORF piritiamina fw	GTGCCATGACCAGACGTTACT
	ORF piritiamina rv	GCCATCAATTTTCAGACAGCTC
<i>nsdC</i>	Southern_5UTR fw Afu7g03910	ACCCAGCAACACTAACCTTTT
	Southern_5UTR rv Afu7g03910	GACAACAAGCATCTGTTATCC
	GFP_pRS426 5UTR fw nsdC	GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACG TCTCCAGCCACTTTTTTGTC
	GFP_linker orf rv nsdC	ACCACCGCTACCACCTCCTCGCTGTGCAG TGCTACC
	GFP_pyrG 3UTR fw nsdC	CAGTGCCTCCTCTCAGACAGCCGTCATGC ACTCACCTGTTA
	GFP_pRS426 3UTR rv nsdC	GCGGATAACAATTTTCACACAGGAAACAGC TGGCCAGCAGAGAAACAATA
	Complem_ Afu7g03910 5UTR-orf pRS426 fw	GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACG CGGCTTGCAAGGCTCAGTCAC
	Complem_ Afu7g03910 3UTR pRS426 rv	GCGGATAACAATTTTCACACAGGAAACAGC AGTGGAGACAAACCATCATA
<i>cbfA</i>	Southern_5UTR fw cbfA	AGGTGTTGACACAAAACAGAT
	Southern_5UTR rv cbfA	CTTGCTTGCTGTTTAACAGTG
	GFP_pRS426_5UTR_Afu1g10550 fw	GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACG CAATGGCCACCTGTA
	GFP_linker pOB435 orf rv cbfA	ACCACCGCTACCACCTCCTCCCAAACCAA GCCCGCTCTG
	GFP_pyrG pOB435 3UTR fw cbfA	TCAGTGCCTCCTCTCAGACAGACACAAAA AATTGCTTTGC
	GFP_3UTR_pRS426_Afu1g10550 rv	GCGGATAACAATTTTCACACAGGAAACAGT CAAACCTGGAGAAGGATGATG
<i>nctA</i>	Southern_5UTR fw <i>nctA</i>	AGGAGCAGGAAAACATCAAAG
	Southern_5UTR rv <i>nctA</i>	TGCTAGGAAAATGCTTTAGCA
	Complem_GFP_pRS 5UTR fw <i>nctA</i>	GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACG ACACGCCATCAGATTAGATCA
	Complem_ GFP_3UTR pRS rv <i>nctA</i>	GCGGATAACAATTTTCACACAGGAAACAGG TAGTCGAATGTTATTGGCGA
	GFP_linker orf rv <i>nctA</i>	ACCACCGCTACCACCTCCATCACTATCATC TTTGGG
	GFP_pyrG 3UTR fw <i>nctA</i>	CAGTGCCTCCTCTCAGACAGTTGTCTTCAA TTCTGGGGCAT

Gene / Plasmídeo	Primer	Sequência 5'-3'
<i>nctB</i>	Southern_5UTR fw <i>nctB</i>	CGGAAAATTCCTCTCGTAAGT
	Southern_5 UTR rv <i>nctB</i>	ATCGTCAGATGAAATCGAGGT
	GFP_pRS426 5 UTR fw <i>nctB</i>	GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACG TAGATCAAAGCTGGTCTACCG
	GFP_linker orf rv <i>nctB</i>	ACCACCGCTACCACCTCCTTCGGGAGCCG CATTGTATTT
	GFP_pyrG 3UTR fw <i>nctB</i>	CAGTGCCTCCTCTCAGACAGGCTTCTCGA ATAAATACCGTG
	GFP_pRS426 3UTR rv <i>nctB</i>	GCGGATAACAATTTTACACAGGAAACAGC CTCTTCATAGAACACCTCCT
<i>nctC</i>	Southern_AFUB_058240 3UTR F	CCTGTTGGTCAGTTGCTTTC
	Southern_AFUB_058240 3UTR R	CGATTGGGGTCATTTGGTATC
	GFP_Afu5g10620 5UTR-orf pRS426 <i>nctC</i> fw	GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACG TTTTGCGGTAAGAGCATAGTC
	GFP_Afu5g10620 orf spacer GFP rv	AGTTCTTCTCCTTTACTCATTCCCCGTGTT CCTTGGTCTACCATTTCGACATC
	Spacer GFP fw	GGAACACGGGAATGAGTAAAGGAGAAGA ACT
	GFP VE rv	CTCAGACAGAATACGCCAAGCTTGCATGC
	GFP pyrG fw	GCATGCAAGCTTGGCGTATTCTGTCTGAG AGGAGGC
	pyrG rv	GAATTCGCCTCAAACAATGCTCTTCACC
	GFP_Afu5g10620 3UTR pyrG fw <i>nctC</i>	GCATTGTTTGAGGCGAATTCTCGAATCAG GCGCAAGTCCTT
	GFP_Afu5g10620 3UTR pRS426 rv <i>nctC</i>	GCGGATAACAATTTTACACAGGAAACAGG GGAAGAGAGCAATTGAATGA

3.5 Análises fenotípicas

Com o intuito de verificar os fenótipos apresentados pelas linhagens deletadas selecionadas diversos ensaios foram realizados em meio mínimo (MM) e completo (YAG) sólidos utilizando os seguintes suplementos: CaCl_2 e NaCl (estresse iônico), *Nikkomycin Z* (inibidor competitivo seletivo da quitina sintetase 3), Calcofluor White e Congo Red (estresse de parede celular), EGTA (quelante de cálcio), Sorbitol (estresse osmótico), Caspofungina (inibidor da 1,3 β -glucano sintase), Menadiona e T-butil hidroperóxido (estresse oxidativo), Ciclosporina (inibidor da calcineurina), BPS e Ferrozina (quelantes de ferro), FeSO_4 . A incubação foi feita a 37 °C, por 120h. Além disso, foram feitos ensaios em MM e YAG, a 44 °C, e incubados também por 120h.

3.6 Isolamento do DNA

A extração do DNA de *A. fumigatus* foi realizada de acordo com modificações do método descrito por Junghans et al. (1990).

3.7 Curva de sobrevivência em modelo animal de aspergilose pulmonar

Os ensaios de virulência das cepas deletadas e complementadas foram realizados conforme descrito em de Castro et al. (2014), sendo avaliadas a mortalidade ao longo de 15 dias após a infecção, em camundongos fêmeas BALB/c.

3.8 Histopatologia

Depois de serem fixadas em solução de formaldeído 10% pra metodologia histopatológica, os pulmões foram diafanizados e incorporados em parafina. Em seguida, os blocos de parafina contendo os pulmões foram cortados em seções seriadas de aproximadamente 5 µm de espessura. A coloração foi realizada com Hematoxilina e Eosina (HE). As lâminas foram analisadas e as imagens obtidas utilizando o microscópio (Leica DM6000 B).

3.9 Preparação de macrófagos derivados da medula óssea, fagocitose e *killing assay*

Os macrófagos foram obtidos a partir de fêmur de camundongos C57BL/6 adultos para a avaliar a fagocitose e *killing* de conídios, de acordo com Rocha et al. (2018).

3.10 Reação de PCR quantitativo em tempo real (“RT-PCR”)

A extração de RNA foi feita utilizando-se o Método do Trizol (Invitrogen), seguida de tratamento com DNase livre de RNase e síntese de cDNA. Todas as reações de RT-PCR foram realizadas no aparelho 7500 Real Time PCR System

(Applied Biosystems), com o Kit SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). As condições de termociclagem para as reações compreendem uma etapa inicial a 50 °C por 2', seguido de 10' a 95°C e 40 ciclos de 15'' a 95°C e 1'a 60°C. A expressão relativa dos transcritos foi quantificada utilizando o método $\Delta\Delta C_t$ e normalizada para expressão de β -tubulina. Os *primers* utilizados encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4. *Primers* utilizados para reação de PCR quantitativo em tempo real.

Gene	Primer	Sequência 5'- 3'
β <i>tubulina</i>	β tubulina fw	ATATGTTCTCTCGTGCCGTTT
	β tubulina rv	GAGAGAGTGGGTGACCTGGA
<i>brlA</i>	<i>brlA</i> fw	CATCCATCATCAAGCAGGTG
	<i>brlA</i> rv	TTGCTGTGGGTCTTGGTGTA
<i>nsdC</i>	5'fw Afu7g03910 sybr	AGCAGAATGTCTGGTTCCATC
	3'rv Afu7g03910 sybr	ACCGTCCTGGGAGGTAGAGT

3.11 Microscopia de fluorescência para GFP

As linhagens foram cultivadas sobre lamínulas em 4 ml de MM por 16 h à 30 °C. Em seguida, foram feitos os seguintes tratamentos: (a) CaCl_2 200 mM, 5 e 15 min.; (b) Ciclosporina A 0.25 $\mu\text{g/mL}$ por 30min.; e (c) Ciclosporina A 0.25 $\mu\text{g/mL}$ por 30 min. mais CaCl_2 200 mM por 5 e 15 min. Os núcleos foram corados com Hoechst (Life Technologies, Inc.) 25 $\mu\text{g/mL}$, 5 min., 30 °C, e lavados com PBS (NaCl 140 mM, KCl 2 mM, NaHPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1.8 mM, pH 7.4), visualizados com microscópio de fluorescência Z1, usando lente objetiva de imersão em óleo 100x [para GFP, filtro 38 (alta eficiência), 450 a 490 nm de excitação e 525 a 550 nm de emissão; para Hoechst/DAPI (4=,6-diamidino-2-phenylindole), filtro 49, 365 nm de excitação e 420 a 470 nm de emissão]. As imagens de contraste de interferência diferencial (DIC) e fluorescência foram capturadas com câmera AxioCam (Carl Zeiss, Inc.) e processadas usando *software* AxioVision (versão 4.8).

3.12 Coloração para os polissacarídeos da superfície da parede celular

A coloração dos polissacarídeos da superfície da parede celular foi feita conforme descrito em Winkelströter *et al.* (2015). Primeiramente, as cepas foram cultivadas a partir de 2.5×10^3 conídios em 200 µl de meio mínimo líquido, 16 h, 37 °C. Em seguida, o meio foi removido e os tubos germinativos inativados com solução de fixação [PBS 1x, DMSO 5% (v/v), formaldeído 3,7% (v/v), methanol 10% (v/v)], lavados com PBS e bloqueados com solução de bloqueio [BSA 1% (m/v), Triton X-100 0.1% (v/v), Tween 20 0.05% (v/v) e 0.01M PBS] por 30 minutos em temperatura ambiente (TA). Para coloração com dectina, 0.2 µg/ml de Fc-hDectin-1 foram adicionados aos conídios inativados e tratados com solução de bloqueio, solução contend 1:1000 DyLight 594-*conjugated, goat anti-human IgG1* por 1 h. Após três lavagens com PBS, a fluorescência foi lida em 587 nm de excitação e 615 nm de emissão. Para a coloração com SBA-FITC, WGA-FITC e conA-FITC, após inativação e bloqueio, foram adicionados 200 µl de 0.1 mg/ml de SBA-FITC, WGA ou ConA, preparadas em PBS, seguido de incubação de 1 h, TA. Após lavagem dos poços com PBS, a fluorescência foi determinada em 492 nm de excitação e 517 nm de emissão. Para a coloração da quitina, foram adicionados 200 µl de uma solução 10 µg/ml de CFW, preparada em PBS, às células inativadas, por 5 minutos. Depois, os tubos germinativos foram lavados três vezes com PBS, e a fluorescência foi lida em 380 nm de excitação e 450 nm de emissão. Todos os experimentos foram realizados utilizando 12 repetições e a fluorescência determinada pelo leitor de placas de microtitulação SpectraMax i3 (Molecular Devices).

3.13 Extração e quantificação de açúcares dos polissacarídeos da parede celular.

Os polissacarídeos da parede celular fúngica foram extraídos a partir de 10 mg de biomassa seca e congelada, como descrito por François (2006). Um mililitro das amostras extraídas foi concentrado 10x por liofilização, e os açúcares, analisados por cromatografia líquida de alta performance (HPLC), usando YoungLin YL9100 *series system* (YoungLin, Anyang, South Korea) equipado com detector YL9170 *series refractive index* (RI), à 40 °C. As amostras foram passadas na coluna (300 por 7.8 mm) Rezex ROA (Phenomenex, USA) à 85 °C e eluídas com ácido sulfúrico 0.05 M, em fluxo de 1.5 ml/min.

3.14 Análise por microscopia de transmissão eletrônica (TEM) da parede celular

As cepas foram cultivadas sem agitação a partir de 1×10^7 conídios, 37 °C, MM, 24 h, antes de serem tratadas com caspofungina 0.125 µg/ml por 120 min. Os micélios, então, foram colhidos e fixados imediatamente em tampão de fosfato de sódio 0.1 M (pH 7.4), contendo 2.5% (v/v) de glutaraldeído e 2% (m/v) de paraformaldeído, por 24 h, à 4 °C. As amostras foram encapsuladas em ágar 2% (m/v) e submetidas à fixação (OsO₄ 1%), contraste (acetato de uranila 1%), desidratação com etanol, e dois passos do processo de infiltração com resina *Spurr* (*Electron Microscopy Sciences*), com 16 h e 4 h, respectivamente, TA. Foi feita infiltração adicional à vácuo em TA, antes da incorporação em cápsulas BEEM (*Electron Microscopy Sciences*) e polimerização à 60 °C por 72 h. Secções seminafinas (0.5 µm) foram coradas com azul de toluidina afim de se identificar as áreas com maior densidade celular. Secções ultrafinas (60 nm) foram preparadas e coradas novamente com acetato de uranila (1%) e citrato de chumbo (2%). As imagens da microscopia de transmissão eletrônica (TEM; *Transmission electron microscopy*) foram obtidas utilizando o microscópio eletrônico Philips CM-120 na voltagem de aceleração de 120 kV, câmera MegaView3 e software iTEM 5.0 (*Olympus Soft Imaging Solutions GmbH*). As espessuras da parede celular de 200 secções de diferentes tubos germinativos foram medidas em 23,500 x *magnification* e as imagens analisadas com software ImageJ (Schneider *et al.*, 2012). A diferença estatística foi avaliada utilizando *one-way ANOVA* e *Turkey's post hoc test*.

3.15 Microscopia de de contraste diferencial de interferência (DIC) dos micelios

As linhagens foram cultivadas, sob agitação, em *erlenmeyers* contendo MM líquido e 10^7 conídios por 48 h, à 37 °C. Em seguida, os micélios foram recolhidos e colocados entre lâmina e lamínula juntamente com glicerol 34% (Merck KGaA). As hifas foram visualizadas no microscópio de fluorescência Z1, usando lente objetiva de 40x. As imagens de contraste diferencial de interferência (DIC) foram capturadas com câmera AxioCam (Carl Zeiss, Inc.) e processadas usando *software* AxioVision (versão 4.8).

3.16 Contagem de conídios produzidos em meio mínimo sólido

As linhagens foram cultivadas em meio mínimo sólido com 10^4 conídios, inoculados no centro da placa, por 120 h à 37 °C. Depois, quatro secções circulares de mesmo tamanho foram cortadas do meio de cultura cultivado e vortexadas em 1mL de *tween* 0.1%. Após diluição de 100x, a quantidade de conídios foi determinada utilizando câmara de Neubauer e microscópio óptico, objetiva de 40x.

3.17 Análise de crescimento em meio líquido

As cepas foram cultivadas em meio mínimo líquido contendo 10^7 conídios por 48 h, à 37 °C. Os micélios foram recolhidos, liofilizados por 48 h, e a massa seca foi obtida. Os resultados correspondem à média e o respectivo desvio padrão de três replicatas.

3.18 Concentração inibitória mínima (MIC)

A susceptibilidade das cepas à azoles foi obtida utilizando o método antifúngico MIC (CISI, 2008). Os experimentos foram realizados em placas de microtitulação contendo 200 µl de meio mínimo líquido, inoculado com 1×10^4 conídios por poço. As placas foram incubadas à 37 °C por 48 h. Os MICs das drogas testadas foram determinados visualmente como o ponto onde não havia crescimento depois da incubação. Três repetições foram realizadas em cada tratamento.

3.19 Dosagem de metabólitos secundários

Para dosagem dos metabólitos secundários, as cepas foram crescidas em meio mínimo líquido, à 37 °C, por 48 h. Em seguida, o sobrenadante foi recolhido e liofilizado de forma a se obter um extrato. Então, pesou-se 100 mg do extrato de cada uma das amostras e adicionou-se 1 mL de MeOH. Esse material foi levado ao sonificador por 45 min, em temperatura ambiente. Em seguida, o extrato foi filtrado e

seco sob fluxo de N₂. Posteriormente, ressuspendeu-se o extrato em 500 µL de MeOH que foi filtrado em filtro 0.22 µm e submetido a análises por HPLC-MS/MS. O equipamento utilizado nas análises foi o Espectrômetro de Massas Agilent LC – MSMS modelo 6100, ESI (Agilent). Para a separação cromatográfica utilizou-se a coluna de fase reversa C18 (Accurare C18, 2,6 µm, 100 x 2,1 mm), como fase móvel foram utilizados acetonitrila (B) e água suplementada com 0,1% de ácido fórmico (A), a vazão da fase móvel foi de 0,2 mL.min⁻¹. A eluição foi realizada em modo gradiente nas proporções (B:A) iniciando de (5:95) v:v até (98:2) v:v em 10 minutos, sendo essa condição mantida por mais 10 minutos, totalizando 20 minutos de corrida.

4 Resultados e Discussão

4.1 A identificação de fatores de transcrição envolvidos em diferentes tipos de estresses

Através de *screenings* para a sensibilidade ao cálcio, à caspofungina e a outros tipos de estresses, nós fomos capazes de identificar cinco mutantes ($\Delta cbfA$, $\Delta nctA$, $\Delta nctB$, $\Delta nctC$, e $\Delta nsdC$) em fatores de transcrição que mostraram sensibilidade diferencial a esses agentes. Os fatores de transcrição NctA-C foram selecionados com base na maior sensibilidade à elevadas concentrações de caspofungina. Já o fator de transcrição NsdC foi selecionado por apresentar-se mais sensível na presença de $CaCl_2$. Análises de buscas de domínios por Pfam indicam que NctA e NctB são membros da família evolutivamente conservada de fatores de transcrição CBF/NF-Y, os quais incluem o complexo regulador transcricional CBC (Hortschansky *et al.*, 2017). NctA (AFUB_029870) codifica uma proteína de 247 aminoácidos e apresenta-se, numa análise de BLASTp recíproco com *S. cerevisiae*, como o homólogo putativo da subunidade α Bur6 do complexo do cofator 2 (NC2). Entretanto, NctA e Bur6 mostram muita pouca similaridade de sequência, com a exceção do domínio CBF/NFYB, que apresenta 49% identidade em 75 aminoácidos adjacentes. NctA tem dois parálogos putativos em *A. fumigatus*, HapE e NctC (AFUB_058240). NctB (AFUB_045980) codifica a proteína de 142 aminoácidos e apresenta-se, numa análise de BLASTp recíproco com *S. cerevisiae*, como a subunidade β do complexo NC2 (Ncb2), com 49% de identidade (em torno de 86% da proteína). NctB tem um outro parálogo em *A. fumigatus*, HapC. CbfA (AFUB_026340) é o homólogo putativo de *DPB4* de *Saccharomyces cerevisiae*, uma subunidade da DNA polimerase epsilon e do complexo de acessibilidade a cromatina ISW2 (identity, 34%; similarity, 55%; e-value, 4e-09). O fator de transcrição NsdC é o homólogo putativo de NsdC de *A. nidulans*, um fator de transcrição envolvido na ativação do processo sexual (Kim *et al.*, 2009).

4.2 A caracterização molecular do fator de transcrição NsdC envolvido na resposta ao cálcio

4.2.1 A caracterização fenotípica do mutante nulo $\Delta nsdC$ e construção da cepa complementada $\Delta nsdC::nsdC^+$

Para melhor entender a função do fator de transcrição *nsdC*, foram feitas análises fenotípicas do mutante nulo para esse gene na presença de CaCl_2 e NaCl (estresse iônico), EGTA (quelante de cálcio), Congo Red e Calcoflúor White (estresse de parede celular), Sorbitol (estresse osmótico), *Nikkomycin Z* (inibidor competitivo da quitina sintase 3), Caspofungina (inibidor da 1,3- β -D-glucano sintase), 44 °C (estresse térmico), Ciclosporina (inibidor da calcineurina), Menadiona e T-butil hidroperóxido (estresse oxidativo). A deleção do gene *nsdC* resultou em maior sensibilidade à CaCl_2 , EGTA, Congo Red, *Nikkomycin Z*, Calcoflúor White, Caspofungina (efeito paradoxical reduzido), 44 °C, Menadiona e T-butil hidroperóxido. Além disso, o mutante nulo $\Delta nsdC$ mostrou-se mais resistente ao Sorbitol e à Ciclosporina (Figura 4). Nas demais drogas testadas, a deleção de *nsdC* não resultou em diferença de crescimento comparado ao tipo selvagem. Estes resultados sugerem um possível envolvimento de NsdC com vias metabólicas dependentes de cálcio.

Figura 4. Análises fenotípicas em meio mínimo sólido. As cepas $\Delta nsdC$, $\Delta nsdC::nsdC^+$ e tipo selvagem foram inoculadas em meio mínimo na presença de CaCl_2 (A-B), EGTA (C-D), Congo Red (E-F), Sorbitol (G-H), Nikkomicina Z (I-J), Calcoflúor White (K-L), Caspofungina (M-N), 44 °C (O-P), Ciclosporina (Q-R), Menadiona (S-T), e incubadas por 120 h.

C.

D.

E.

F.

G.

H.

I.

J.

K.

L.

M.

N.

O.

P.

Q.

R.

S.

T.

Além disso, construiu-se a cepa complementada $\Delta nsdC::nsdC^+$ a fim de se confirmar que os fenótipos obtidos são referentes somente a deleção do gene *nsdC*. Para isso, foi feita a co-tranformação do cassete com aproximadamente 1 kb na região 5UTR e 3UTR e ORF do gene de interesse, juntamente com o plasmídio pPTR1, que contém o gene *ptrA*, responsável pela resistência a droga piritiamina (Tabela 3). A seleção foi realizada com 1 µg/mL da droga e a cepa complementada, confirmada por Southern blot. Foram produzidos fragmentos pela digestão com a enzima de restrição *ScaI* de aproximadamente 4.4 kb para o tipo selvagem e complementado e de 3.7 kb para a cepa deletada. A visualização do fragmento foi possível pela ligação de sonda marcada na região 5UTR (Figuras 5A-B). A presença do gene *ptrA* foi verificada por PCR (Figura 5C).

Como pode ser visto na Figura 4, a complementação do gene recuperou o fenótipo do tipo selvagem.

Figura 5. A construção de $\Delta nsdC::nsdC^+$ foi confirmada por Southern Blot. Os DNAs foram digeridos com *ScaI*, produzindo fragmentos de ~4.4 kb e 3.7 kb (A-B). A presença do gene *ptrA* foi confirmada por PCR, a partir da amplificação de um fragmento de 750 pb dentro da ORF deste gene (C).

4.2.2 NsdC é importante para a virulência de *A. fumigatus* em modelo murino neutropênico

A fim de se verificar se o fator de transcrição NsdC é importante para a patogenicidade de *A. fumigatus*, em camundongos imunossuprimidos, as cepas selvagem, $\Delta nsdC$ e $\Delta nsdC::nsdC^+$ foram inoculadas em fêmeas BALB/c. Os animais

foram acompanhados durante 15 dias após a infecção. De acordo com a Figura 6A, enquanto a cepa tipo selvagem matou 100% dos animais, a deleção de *nsdC* resultou em 60% de animais sobreviventes, sendo o mutante $\Delta nsdC$ atenuado. Estatisticamente, a cepa complementada se comportou igual ao tipo selvagem. Além disso, análises histopatológicas do pulmão dos camundongos mostraram menor concentração de fungos (Figura 6B), o que foi confirmado no ensaio de *fungal burden* (Figura 6C). Portanto, os resultados sugerem que o fator de transcrição NsdC tem papel importante na virulência de *A. fumigatus*.

Figura 6. $\Delta nsdC$ apresenta virulência atenuada. Os camundongos foram imunossuprimidos com injeções de ciclofosfamida e hidrocortisona, na sétima semana de vida. Em seguida, foram infectados com as cepas de *A. fumigatus*. As mortes foram acompanhadas por 15 dias após a infecção.

Com a finalidade de investigar se a deleção de *nsdC* seria capaz de alterar a resposta imune do hospedeiro, foram analisadas a internalização e a capacidade fungicida de macrófagos de camundongos C57BL/6. Na Figura 7, pode-se observar que, embora a virulência do mutante esteja atenuada em camundongos, os níveis de

internalização e morte dos conídios sofrem redução na cepa deletada $\Delta nsdC$, o que pode ser consequência de uma maior evasão do sistema imunológico, devido a alterações na parede celular (ver item 4.2.5). Isto poderia dificultar o reconhecimento dos conídios pelos macrófagos residentes. Portanto, os defeitos de crescimento, observados na presença diferentes estresses, podem ser a explicação para a infecção deficiente, considerando que o hospedeiro fornece um ambiente hostil para o desenvolvimento do fungo, o que resultaria na virulência atenuada apesar da fagocitose mostrar-se diminuída.

Figura 7. $\Delta nsdC$ pode alterar a resposta imune do hospedeiro. (A) Índice de fagocitose e de (B) capacidade fungicida de macrófagos perante conídios do tipo selvagem, $\Delta nsdC$ e $\Delta nsdC::nsdC^+$.

4.2.3 A expressão de *nsdC* parece ser dependente de CrzA

Há mais de uma década, já foi mostrado que altas concentrações de Caspofungina podem reverter seu efeito inibitório em *A. fumigatus*, fenômeno chamado de efeito paradoxical (Steinbach et al., 2015; Ries et al., 2017). Assim, as altas concentrações de Caspofungina provocam um pico na concentração de Ca^{2+} citosólico, sendo o metabolismo de cálcio importante para a manutenção do efeito paradoxical através da ativação da calcineurina/CrzA (Fortwendel et al., 2010; Juvvadi et al., 2015; Ries et al., 2017). Como mostrado no item 4.1.1, a deleção do gene *nsdC* gera maior sensibilidade à caspofungina, embora a cepa $\Delta nsdC$ não tenha perdido o efeito paradoxical. Dessa forma, as cepas selvagem e $\Delta crzA$ foram

tratadas com Caspofungina 0.2 $\mu\text{g/mL}$ e 2.0 $\mu\text{g/mL}$. A Figura 8 mostra a expressão de *nsdC* nessas condições. Enquanto o tipo selvagem tem aumento de cerca de 2x na expressão de *nsdC* quando tratado com Caspofungina, a deleção de *crzA* diminui significativamente a indução do mesmo, embora ainda ocorra um pequeno aumento. Portanto, a expressão do fator de transcrição NsdC parece ser dependente de CrzA. Entretanto, pode também ser regulada por outras vias ainda não elucidadas.

Figura 8. A expressão de *nsdC* parece ser dependente de *CrzA* na presença de Caspofungina. As cepas selvagem e ΔcrzA foram tratadas com Caspofungina, e a expressão do gene *nsdC* quantificada por PCR em tempo real.

4.2.4 NsdC está localizado no núcleo

Para melhor caracterização do fator de transcrição estudado, NsdC foi fusionado à proteína fluorescente GFP. Nesta construção, foram recombinados homologamente em *S. cerevisiae* os fragmentos 5UTR mais ORF *nsdC* e 3UTR, juntamente com a construção *linker-GFP-trpC-pyrG*, amplificada a partir do plasmídeo pOB435. Este cassete foi então inserido homologamente na cepa ΔKu80 pyrG^- . Posteriormente, através de microscopia de fluorescência, foi possível visualizar a proteína NsdC nos núcleos dos tubos germinativos, após 16 horas à 30°C (100% de localização nuclear; Figura 9A). Após o tratamento com 200 mM de CaCl_2 , NsdC mostrou-se majoritariamente presente no núcleo (70% e 95% dos

núcleos de aproximadamente 100 tubos germinativos contendo a proteína NsdC após o tratamento por 5 e 15 minutos com cálcio, respectivamente). Mesmo após a inibição da via da calcineurina (através da adição de 0,25 µg/mL de ciclosporina A por 30 minutos previamente ao tratamento com cálcio) a localização de NsdC não foi alterada (90% e 83% dos núcleos de aproximadamente 100 tubos germinativos contendo a proteína NsdC após 200 mM de CaCl₂, por 5 e 15 minutos, respectivamente). Esses dados indicam que NsdC:GFP possui localização nuclear majoritariamente constitutiva.

Figura 9. NsdC localiza-se nos núcleos. (A) Os conídios foram incubados por 16h, 30°C. Em seguida os núcleos foram corados com Hoechst 33342® e visualizados por microscopia de fluorescência (escala: 5 µm). (B e C) Análises fenotípicas mostrando que a fusão é funcional.

4.2.5 O fator de transcrição NsdC parece ser importante para processos relacionados a síntese da parede celular

Anteriormente, foi mostrado que a deleção de *nsdC* leva a sensibilidade à Caspofungina e a outros agentes que causam estresse na parede celular, como CR

e CFW. Além disso, em meio mínimo sólido, o mutante *ΔnsdC* apresenta ramificação exacerbada das hifas e coloração da frente e do verso da colônia mais escuras que as observadas no tipo selvagem (dados não mostrados).

O passo seguinte foi a investigação de possíveis efeitos causados pela deleção de *nsdC* na estrutura da parede celular fúngica, sendo esta uma possível explicação para os defeitos morfológicos das hifas. A parede celular fúngica é essencial para a manutenção da forma da célula. Ela constitui uma estrutura altamente dinâmica que muda em resposta tanto a sinais externos, quanto internos (Klis, 1994; Park et al., 2014). Assim, mudanças reguladas na estrutura e composição da parede celular devem ser o primeiro passo para o crescimento e o desenvolvimento normais (Cabib et al., 1982; Park et al., 2014). Mais de 90% da parede celular dos micélios de *A. fumigatus* é formada por polissacarídeos (Fontaine et al., 2000; Latgé, 2010; Latgé et al., 2017), sendo que alguns deles estão ligados, de forma estrutural e covalente, em um complexo composto por β -(1,3)-glucana ligadas a quitina, galactomanano e β -(1,3)- β -(1,4)-glucanas. Outros polissacarídeos, como α -(1,3)-glucana e galactosaminogalactano, preenchem os poros entre os polissacarídeos fibrilares (Latgé et al., 2017). Então, para melhor avaliar o papel desse gene na integridade da parede celular, foram realizados ensaios a fim de elucidar a exposição de polissacarídeos na parede celular de *ΔnsdC*. Dessa forma, as cepas selvagem, *ΔnsdC* e *ΔnsdC::nsdC⁺* foram cultivadas por 16h e, posteriormente, marcadas por corantes fluorescentes como CFW (liga-se a quitina), SBA-FITC (liga-se a resíduos α - e β -N-acetilglicosamina e galactopiranosil), WGA-FITC (liga-se a N-acetilglicosamina), conA-FITC (liga-se a resíduos α -manosil e α -glicosil) ou Fc-hDectin-1 (liga-se a β -glucano). Segundo os dados obtidos, a deleção de *nsdC* leva a diminuição significativa da exposição de quitina, β -glucano e resíduos de galactopiranosil (Figura 10), e nenhuma alteração na exposição de N-acetilglicosamina e resíduos α -manosil e α -glicosil (dados não mostrados).

Figura 10. $\Delta nsdC$ apresenta exposição alterada de polissacarídeos da parede celular. Os polissacarídeos da parede celular foram marcados com (A) Calcofluor White, (B) *Glycine max* Soybean lectin SBA-FITC e (C) Fc-hDectin-1.

Para se investigar melhor o papel de NsdC na manutenção da integridade da parede celular, os conteúdos de glicose e N-acetilglicosamina (NAG) da parede celular foram determinados nas cepas selvagem, $\Delta nsdC$ e $\Delta nsdC::nsdC^+$ em meio completo líquido, a partir do micélio liofilizado. Tanto a concentração de glicose quanto a de NAG apresentaram-se significativamente diminuídas no mutante $\Delta nsdC$ (Figura 11).

Figura 11. NsdC é importante para a composição da parede celular. As concentrações de (A) glicose e (B) NAG foram determinadas por HPLC a partir de extratos obtidos de micélios das cepas selvagem, $\Delta nsdC$ e $\Delta nsdC::nsdC^+$.

Embora a concentração de NAG na parede celular tenha se apresentado diminuída no mutante deletado $\Delta nsdC$, análises por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) mostraram que, em meio completo, a deleção do fator de transcrição NsdC resultou em um aumento da espessura da parede celular em cerca de 5x (Figura 12). Juntos, esses dados sugerem que NsdC possui papel importante em processos relacionados a síntese da parede celular em *A. fumigatus*, de forma que, as anomalias observadas podem ser consequência de um rearranjo estrutural diferente ao tipo selvagem. Isso porque, tanto a composição quanto a exposição dos polissacarídeos presentes na parede celular mostraram-se alteradas.

Figura 12. $\Delta nsdC$ possui parede celular mais espessa que o tipo selvagem. (A) Microscopia eletrônica de transmissão mostrando a espessura da parede celular das cepas selvagem, $\Delta nsdC$ e $\Delta nsdC::nsdC^+$. (B) Gráfico mostrando média das cem medidas realizadas da parede celular (escala: 200 nm).

4.2.6 Os fatores de transcrição NsdC de *A. fumigatus* e de *A. nidulans* parecem ter função semelhante

Diversos fungos reproduzem-se através do desenvolvimento sexual e assexual para resistir a condições não favoráveis ou propagarem-se a outros ambientes (Axelrod et al., 1973; Kim et al., 2009). Fatores ambientais que afetam o crescimento dos micélios, como *status* nutricional, condições de cultura e alguns estresses ambientais, são responsáveis por decisões no desenvolvimento, determinando se a reprodução será sexual ou assexual (Zonneveld, 1977; Han et al., 1990; Han et al., 2007; Dyer et al., 2003; Han et al., 2003; Kim et al., 2009). Possivelmente, muitos genes estão envolvidos no reconhecimento das condições ambientais, o que é imprescindível para decisões pertinentes a regulação da expressão de genes de desenvolvimento (Kim et al., 2009). Em *A. nidulans*, a deleção de *nsdC* gera um mutante incapaz de produzir clestotécios e células de Hülle em condições padrões de cultivo, inclusive após incubação prolongada. Além disso, não há desenvolvimento sexual neste mutante, mesmo em condições favoráveis ao desenvolvimento sexual como altas concentrações de glicose e/ou aeração restrita (Kim et al., 2009).

O mutante nulo $\Delta nsdC$, quando crescido em meio mínimo por 48h, à 37 °C apresenta coloração escura (Figura 13). Isto se deve a produção de conídios na cepa deletada. Dessa forma, para confirmação do fenótipo, foi feita microscopia de contraste diferencial de interferência (DIC), mostrando presença de conidióforos, nas mesmas condições de cultivo. Neste ensaio, os micélios foram cultivados em meio mínimo líquido por 48 h (Figura 14). O mutante nulo mostrou (a) ramificação exacerbada no ápice das hifas, (b) crescimento desorganizado e (c) conidiação em meio líquido, quando comparado ao tipo selvagem e ao respectivo complementado. Ademais, a cepa complementada recuperou o fenótipo do tipo selvagem, sem alterar a produção de conídios. Entretanto, apesar da reprodução em meio líquido, a quantidade total de conídios em meio sólido é menor (Figura 15).

Figura 13. $\Delta nsdC$ apresenta conídios quando cultivado em meio líquido. As cepas foram inoculadas em meio mínimo e incubadas por 48 h, à 37°C.

Figura 14. O mutante $\Delta nsdC$ apresenta conidióforos quando cultivado em meio líquido. As cepas foram inoculadas em meio mínimo líquido e incubadas, por 48h, à 37°C (escala 10 μm).

Figura 15. A produção de conídios no mutante $\Delta nsdC$ é menor. O cultivo em meio mínimo sólido por 48h, à 37C, mostrou menor produção de conídios no mutante $\Delta nsdC$. Os esporos foram contados a partir de quatro frações de ágar de mesmo tamanho.

Da mesma forma, a deleção de *nsdC* em *A. nidulans* (KNC64), resultou na produção de conídios em meio mínimo líquido (Figura 16). Isto corrobora o que foi descrito por Kim et al. (2009), cujos resultados sugerem que o gene *nsdC* de *A. nidulans* controla negativamente a esporulação assexual. Assim sendo, os resultados indicam que em *A. fumigatus* o fator de transcrição NsdC também está envolvido na repressão da esporulação assexual.

Figura 16. KNC64 produz conídios em meio líquido. As cepas foram inoculada em meio mínimo líquido e incubadas por 48 h, a 37°C.

Um passo essencial para a conidição em *Aspergillus* é a ativação de *brlA* (Adams et al., 1988; Park e Yu, 2012). O gene *brlA* codifica uma proteína que se liga ao ácido nucleico com TFIIIA-like zinc finger, cuja expressão é necessária para

direcionar uma mudança de uma extensão polarizada do ápice da haste do conidióforo para uma tumefação não-polar, resultando na formação de vesículas de conidióforos (Adams et al. 1988; Wieser et al., 1994). Os mutantes nulos para *brlA* formam estruturas com forma de cerda, que produzem hastes alongadas, mas não conseguem formar vesículas e outras estruturas subsequentes (Clutterbuck, 1969; Boylan et al., 1987; Park e Yu, 2012). Assim, as cepas selvagem, $\Delta nsdC$ e $\Delta nsdC::nsdC^+$ foram incubadas por 24 h em meio mínimo, e tiveram os RNAs isolados. A partir deste material, foi sintetizado cDNA e a expressão do gene *brlA* foi quantificada por qRT-PCR (Figura 17). Na ausência do gene *nsdC*, a expressão de *brlA* encontra-se induzida cerca de 23x, em *A. fumigatus*. Juntos, esses resultados indicam que NsdC reprime direta ou indiretamente a expressão de *brlA* no estágio inicial da esporulação assexual, conforme observado em *A. nidulans*, cuja cepa KNC64 também apresenta maior expressão de *brlA* (Kim et al., 2009).

Figura 17. *brlA* é induzido na ausência de *nsdC*. A expressão de *brlA* foi dosada em triplicata biológica na cepa selvagem, $\Delta nsdC$ e $\Delta nsdC::nsdC^+$. Como normalizador, foi usada a β -tubulina.

Para melhor caracterizar as semelhanças funcionais entre os genes ortólogos *nsdC* de *A. fumigatus* e *A. nidulans*, análises fenotípicas em meio sólido foram realizadas na presença de CaCl_2 , NaCl, Sorbitol, CFW, CR, EGTA, 44 °C e Caspofungina. De acordo com os dados obtidos, a cepa KNC64 apresenta sensibilidade aumentada na presença de CaCl_2 , CFW e CR (Figura 17A, B, G-J), assim como $\Delta nsdC$ de *A. fumigatus*. Isso confirma a semelhança de funções entre os ortólogos, além de reforçar o papel de NsdC nas vias de sinalização dependentes

de cálcio e na manutenção da integridade da parede celular. Além disso, KNC64 também mostrou-se sensível ao Sorbitol e resistente ao EGTA e à Caspofungina (Figura 18).

Figura 18. KNC64 apresenta sensibilidade diferente em relação ao tipo selvagem. . Foram inoculados 10^4 conídios em YAG nas seguintes condições: (A, B) CaCl_2 ; (C, D) NaCl; (E, F) Sorbitol; (G, H) CFW; (I, J) CR; (K, L) EGTA; (M, N) 44°C ; (O, P) Caspofungina. As placas foram incubadas a 37°C , por 5 dias.

A.

B.

C.

D.

E.

F.

O.

P.

4.3 Caracterização dos fatores de transcrição envolvidos no efeito paradoxal em resposta à elevadas concentrações de caspofungina

4.3.1 As análises fenotípicas de $\Delta cbfA$ e a construção da cepa complementada $\Delta cbfA::cbfA^+$

Para melhor investigar processos em que o gene *cbfA* possa estar envolvido, foram feitas as análises fenotípicas em meio mínimo sólido em 30 °C, 44 °C, e 37 °C suplementadas com CaCl_2 , Caspofungina, Sorbitol e NaCl. O mutante nulo $\Delta cbfA$ mostrou-se mais resistente que o tipo selvagem apenas quando crescido à 30 °C. Entretanto, quando incubado à 44 °C foi incapaz de crescer (Figuras 19A e B). Já para CaCl_2 , Caspofungina, Sorbitol e NaCl, apresentou-se mais sensível (Figuras 19C-J). Dessa forma, o fator de transcrição CbfA pode ser importante para a resposta ao estresse de temperatura.

Posteriormente, com a finalidade de se confirmar que os fenótipos produzidos pelo mutante nulo $\Delta cbfA$ são de fato decorrentes da deleção, a cepa complementada $\Delta cbfA::cbfA^+$ foi construída. Para isso, o mutante $\Delta cbfA$ foi transformado com um cassete contendo aproximadamente 1 kb das regiões 5UTR e 3UTR e a ORF do gene *cbfA*. A seleção foi feita por resistência ao crescimento em elevadas temperaturas, e a construção confirmada por Southern Blot (Figura 20).

Figura 19. Caracterização fenotípica do mutante $\Delta cbfA$. Esporos das cepas deletada e complementada foram inoculadas em meio mínimo nas seguintes condições: 30°C e 44°C (A,B), CaCl_2 (C,D), Caspofungina (E,F), NaCl (G,H), Sorbitol (I,J) e BPS mais Ferrozina (K,L).

G.

H.

I.

J.

K.

L.

Figura 20. Construção da cepa $\Delta cbfA::cbfA^+$. O mutante nulo foi transformado com cassete contendo a ORF *cbfA* e checado por *Southern Blot*, após digestão com a enzima de restrição *Bam*HI.

4.3.2 As análises fenotípicas de $\Delta nctA$ e a construção da cepa complementada $\Delta nctA::nctA^+$

Sucessivamente, foram feitas análises fenotípicas de $\Delta nctA$. Este mutante foi submetido à CaCl_2 (Figura 21A-B), EGTA (Figura 21C-D), NaCl (Figura 21E-F), Congo Red (Figura 21G-H), 44 °C (Figura 21I-J), Caspofungina (Figura 21K-L), Sorbitol (Figuras 21M-N), Calcoflúor White e 30 °C (dados não mostrados). Dessa forma, a cepa $\Delta nctA$ mostrou-se sensível à 44 °C, mas não a 30 °C. Entretanto $\Delta nctA$ parece ser mais resistente as altas e baixas concentrações de CaCl_2 , e a Congo Red. Ademais, $\Delta nctA$ é mais sensível que o tipo selvagem perante NaCl . Nenhuma alteração na sensibilidade foi observada nas demais condições testadas.

A construção da cepa complementada, a fim de se verificar se os fenótipos são causados exclusivamente pela deleção do gene *nctA*, foi realizada a partir de co-transformação de $\Delta nctA$ com fragmentos de DNA genômico contendo a ORF de *nctA* e aproximadamente 1 kb das regiões 5UTR e 3UTR, e plasmídios pPTRI (confere resistência à piritiamina). A seleção foi feita em MM na presença de 1 µg/ml de piritiamina. A integração do gene de interesse foi checada por Southern blot, sendo a digestão realizada com a enzima de restrição *Eco*RV. Para as cepas selvagem e complementada, a digestão gerou um fragmento de 3465 pb, enquanto,

para a cepa deletada, 5350 pb. As bandas foram visualizadas a partir da marcação com sonda na região 5UTR (Figura 22).

Figura 21. Caracterização fenotípica do mutante $\Delta nctA$. Os conídios das cepas deletada e complementada foram inoculadas em meio mínimo nas seguintes condições: CaCl_2 (A, B), EGTA (C, D), NaCl (E, F), Congo Red (G, H), 44°C (I, J), Caspofungina (K, L) e Sorbitol (M, N).

Figura 22. Southern blot da construção $\Delta nctA::nctA^+$. (A) Esquema da estratégia usada digestão do DNA. (B) Southern blot mostrando as bandas referentes as cepas tipo selvagem, $\Delta nctA$ e $\Delta nctA::nctA^+$.

4.3.3 As análises fenotípicas de $\Delta nctB$

Da mesma forma que o item 4.3.2, a cepa $\Delta nctB$ foi caracterizada fenotipicamente em meio mínimo sólido, a fim de se investigar melhor o papel do fator de transcrição NctB. Assim, pode-se observar que a deleção de *nctB* leva ao aumento de sensibilidade ao cálcio (Figura 23A e B), à temperaturas diferentes da considerada ideal para o crescimento de *A. fumigatus* (Figura 23C e D) e à Caspofungina (Figura 23O). Entretanto, não fomos capazes de construir a cepa complementada referente à deleção de *nctB*. Juntos, estes dados sugerem que o fator de transcrição NctB pode ter papel na regulação de vias dependentes de cálcio. Além disso, NctB pode desempenhar algum papel em vias relacionadas ao estresse de temperatura e estresse de parede celular.

Figura 23. Caracterização fenotípica do mutante $\Delta nctB$. Os conídios da cepa deletada foram inoculados em meio mínimo nas seguintes condições: CaCl_2 (A, B), 30°C e 44°C (C, D), CR (E, F), EDTA (G, H), NaCl (I, J), CFW (K, L), Sorbitol (M, N), Caspofungina (O).

G.

H.

I.

J.

K.

L.

M.

N.

O.

4.3.4 As análises fenotípicas de $\Delta nctC$ e a construção da cepa complementada $\Delta nctC::nctC^+$

Para se realizar a fenotipagem e confirmar que os fenótipos observados no mutante nulo $\Delta nctC$ não são devidos a mutações secundárias presentes na cepa, construiu-se seu respectivo complementado $\Delta nctC::nctC^+$ transformando-se a cepa deletada com cassete contendo aproximadamente 1 kb da região 5UTR e 3UTR do gene *nctC* e sua ORF, juntamente com o plasmídeo pPTRI, que contém o gene *ptrA*, responsável pela resistência a droga piritiamina. A seleção foi feita com base no crescimento na presença da droga e a checagem da complementação, por Southern Blot (Figuras 24A e B). Além disso, a presença no gene *ptrA* foi confirmada por PCR (Figura 24C).

Figura 24. Construção de $\Delta nctC::nctC^+$. A cepa $\Delta nctC$ foi transformada com cassete contendo a ORF *nctC* juntamente com o plasmídeo pPTRI. A seleção foi feita com 2 μg/mL de piritiamina. (A) A digestão dos DNAs foi feita com *EcoRV* e (B) as construções, confirmadas por Southern Blot. (C) PCR mostrando a presença o gene *ptrA* na cepa complementada.

A cepa deletada para *nctC* mostrou-se mais resistente a EGTA. Assim como o mutante nulo, a cepa complementada foi testada com EGTA, CaCl_2 e NaCl, Sorbitol, 44 °C e Caspofungina e recuperou o fenótipo apresentado pelo tipo selvagem, com exceção da Caspofungina (Figura 25). Nas demais drogas testadas o mutante nulo $\Delta nctC$ não apresentou diferença de crescimento quando comparado ao tipo selvagem (dados não mostrados).

Figura 25. Análises fenotípicas em meio mínimo sólido de $\Delta nctC$ e $\Delta nctC::nctC^+$. Os esporos foram inoculados pontualmente em meio mínimo sólido contendo (A, B) EGTA, (C, D) CaCl_2 , (E, F) NaCl, (G, H) Sorbitol, (I, J) 44°C, (K, L) Caspofungina, e incubadas por 120 h, à 37°C.

4.3.5. Os fatores de transcrição CbfA, NctA e NctC se encontram nos núcleos

Com o propósito de identificar a localização dos fatores de transcrição, as proteínas CbfA, NctA e NctC foram fusionadas a uma proteína fluorescente (GFP). Apesar de diversas tentativas, nós não fomos capazes de construir uma cepa NctB:GFP. Assim sendo, dois modelos diferentes foram usadas para a construção dessas cepas. Para as construções CbfA:GFP e NctA:GFP, foram amplificados fragmentos a partir do plasmídio pOB435 contendo *linker*, GFP (proteína fluorescente), *trpC* (terminador exógeno) e *pyrG* (marcador). Este fragmento foi ligado, por recombinação homóloga em *S. cerevisiae*, às regiões 5UTR + ORF (*cbfA* ou *nctA*) e 3UTR. Em seguida, os cassetes foram transformados em *A. fumigatus* e a integração confirmada por Southern blot, com sondas na região 5UTR (Figuras 26 e 27). Para CbfA:GFP, os DNAs genômicos foram digeridos com a enzima de restrição *EcoRI*, produzindo fragmento de ~3.9 kb para o tipo selvagem e ~7.2 kb para a proteína fusionada (Figura 26). Já para NctA::GFP, os DNAs genômicos foram digeridos com *BamHI*, produzindo fragmento de ~7.4 kb para a cepa selvagem e ~5.1 kb para a fusão com GFP (Figura 27). Ademais, para a construção da cepa NctC::GFP, os fragmentos 5' e 3' UTR do gene selecionado foram amplificados e transformados em *S. cerevisiae*, juntamente com o marcador auxotrófico *pyrG* e o vetor pRS426 linearizado. A recombinação foi confirmada por PCR. Uma vez amplificado, o cassete foi transformado em *A. fumigatus*. A Figura 28 representa a confirmação da fusão via Southern Blot. Nesta estratégia, as sondas foram produzidas e marcadas a partir da região 3UTR do gene de interesse. Os DNAs genômicos da cepa selvagem e do NctC:GFP foram extraídos e digeridos com a enzima *BglII*, produzindo fragmentos de aproximadamente 5,7 kb e 8,4 kb, respectivamente (Figura 28). A partir destas construções foi possível visualizar a presença de CbfA, NctA e NctC nos núcleos, o que foi confirmado com o marcador nuclear Hoechst (Figura 29). Neste experimento, os conídios foram incubados a 30 °C, por 16 h em meio mínimo (Figura 29) e meio completo (dados não mostrados). Em ambos os casos, CbfA, NctA e NctC foram vistos nos núcleos da hifa.

Figura 26. Fusão do gene *cbfA* com GFP. A construção da cepa CbfA:GFP foi checada por *Southern Blot*. (A) Estratégia utilizada no *Southern blot*. (B) Bandas observadas após marcação dos fragmentos.

Figura 27. Fusão do gene *nctA* com GFP. A construção da cepa NctA:GFP foi checada por *Southern Blot*. (A) Estratégia utilizada no *Southern blot*. (B) Bandas observadas após marcação dos fragmentos.

Figura 28. Fusão do gene *nctC* com GFP. A construção da cepa NctC:GFP foi checada por Southern Blot. (A) Estratégia utilizada no Southern blot. (B) Bandas observadas após marcação dos fragmentos.

Figura 29. CbfA, NctA e NctC localizam-se nos núcleos. Os conídios foram incubados em MM líquido, por 16 h, à 30°C. Os núcleos foram marcados com Hoechst 25 µg/mL por 10 minutos (escala 5µm).

4.3.6 Análises fenotípicas em meio líquido: peso seco

Com a finalidade de observar se as deleções de *cbfA* e *nctA-C* afetam o crescimento em meio líquido, assim como ocorre em meio sólido (exceto para

$\Delta nctB$), as cepas selvagem, $\Delta cbfA$ e $\Delta nctA-C$, $\Delta cbfA::cbfA^+$ e $\Delta nctC::nctC^+$ foram inoculadas, em triplicata, em meio mínimo e completo e incubadas a 37 °C por 48 h. Os micélios foram recuperados por filtração e liofilizados. A Figura 30 representa a média das massas obtidas do material seco. Pode-se observar que em meio mínimo apenas o mutante nulo $\Delta nctA$ apresentou massa de crescimento inferior ao tipo selvagem (Figura 30A). Esse fenótipo também foi observado em meio completo (Figura 30B), mostrando que a deleção destes fatores de transcrição somente alteram o crescimento no caso de $\Delta nctA$.

Figura 30. Análises fenotípicas em meio líquido. Os mutantes nulos $\Delta cbfA$, $\Delta nctA-C$, os complementados $\Delta cbfA::cbfA^+$ e $\Delta nctC::nctC^+$, e a cepa selvagem foram inoculados em meio mínimo (A) e completo (B), líquidos, e incubados a 37°C por 48h.

4.3.7 Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) a azoles

A aspergilose crônica e alérgica pulmonar tem sido cada vez mais identificada em diversos ambientes clínicos. Medicamentos como itraconazole, voriconazole e, mais recentemente, posaconazole são os principais adotados no tratamento para essas condições, já que os azoles correspondem à única classe de drogas licenciada para a terapia oral contra aspergilose. Ademais, tratamentos com caspofungina são licenciados apenas para aplicação intravenosa em pacientes com aspergilose invasiva, mas têm utilidade limitada para aspergilose crônica e alérgica (Howard et al., 2009). Dessa forma, para identificar se as deleções poderiam afetar significativamente a sensibilidade de *A. fumigatus* aos azoles, foram determinadas as concentrações inibitórias mínimas para o tipo selvagem, $\Delta cbfA$ and $\Delta nctA-C$,

$\Delta cbfA::cbfA^+$ e $\Delta nctC::nctC^+$ na presença de azoles. Pode-se notar que a deleção do gene *nctA* apresentou resistência acentuada na presença de voriconazole (MIC = 1.8 $\mu\text{g/mL}$), posaconazole (MIC = 0.8 $\mu\text{g/mL}$) e itraconazole (MIC = 4.0 $\mu\text{g/mL}$) quando comparada ao tipo selvagem (MIC = 0.4, 0.4 e 2.0 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente). Além disso, para voriconazole, os mutantes $\Delta cbfA$ (MIC = 0.6 $\mu\text{g/mL}$) e $\Delta nctC$ (MIC = 0.6 $\mu\text{g/mL}$) apresentaram resistência um pouco maior que o tipo selvagem (MIC = 0.4 $\mu\text{g/mL}$; Tabela 5).

Tabela 5. Concentração inibitória mínima (MIC) para azoles.

	Voriconazole ($\mu\text{g/mL}$)	Posaconazole ($\mu\text{g/mL}$)	Itraconazole ($\mu\text{g/mL}$)
Wild type	0,4	0,4	2,0
$\Delta cbfA$	0,6	0,4	2,0
$\Delta cbfA::cbfA^+$	0,4	0,4	2,0
$\Delta nctA$	1,8	0,8	4,0
$\Delta nctA::nctA^+$	0,4	0,4	2,0
$\Delta nctB$	0,4	0,4	2,0
$\Delta nctC$	0,6	0,4	2,0
$\Delta nctC::nctC^+$	0,4	0,4	2,0

4.3.8 Fenótipos de crescimento em meio mínimo líquido e produção de metabólitos secundários

Um aspecto complexo e ao mesmo tempo fascinante do desenvolvimento fúngico é a produção de metabólitos secundários. Esses compostos, frequentemente associados com os processos de esporulação, são considerados parte do arsenal químico requerido para a especialização de um nicho e têm ganhado interesse devido à potencial aplicação farmacêutica e biotecnológica (Chalfie et al., 1994; Calvo, et al., 2002; Bok e Keller, 2004). Muitos deles apresentam grande diversidade de antibióticos, antivirais, antitumorais, anti-hipercolesterolêmico e atividade imunossupressora, assim como atividades fitotóxicas e micotóxicas (Bok e Keller, 2004). Em vista disso, determinados fatores de transcrição podem estar envolvidos em vias de sinalização responsáveis pela produção de metabólitos secundários em *A. fumigatus*. O crescimento em meio mínimo líquido das cepas $\Delta cbfA$ e $\Delta nctA-C$ mostrou fenótipo diferencial. Os mutantes nulos $\Delta cbfA$ e $\Delta nctC$, após 48 h de

incubação, à 37 °C, produziram de coloração rosada (Figura 31), indicando uma possível alteração na produção de metabólitos secundários nestas cepas. Ademais, a complementação das mesmas reverteu a produção de cor no meio de cultura. Análises mais precisas foram realizadas a partir dos sobrenadantes das culturas do tipo selvagem, $\Delta cbfA$, $\Delta cbfA::cbfA^+$, $\Delta nctC$ e $\Delta nctC::nctC$, utilizando-se HPLC-MS/MS, mostrando que a deleção de *cbfA* leva ao aumento da produção de Fumiquinazoline A, Fumiquinazoline C, Fumiquinazoline F e Piripropene A. Da mesma forma, a deleção de *nctC* também altera o padrão de produção de metabólitos secundários, sendo que neste mutante ocorre aumento da produção de Tryprostatin A e Fumitremorgin C (Tabela 6). Portanto, os fatores de transcrição CbfA e NctC podem ter papel importante na regulação da produção de metabólitos secundários.

Figura 31. Os mutantes $\Delta cbfA$ e $\Delta nctC$ podem ter produção de metabólitos secundários alterada. As cepas foram inoculadas em meio mínimo por 48 h, à 37°C. Após esse período foi possível a visualização de coloração rosada nos mutantes $\Delta cbfA$ e $\Delta nctC$.

Tabela 6. Metabólitos secundários produzidos em maior concentração nos mutantes $\Delta cbfA$ e $\Delta nctC$.

Cepa	Composto	Fórmula molecular
$\Delta cbfA$	Fumiquinazoline A	$C_{24}H_{23}N_5O_4$
	Fumiquinazoline C	$C_{24}H_{21}N_5O_4$
	Fumiquinazoline F	$C_{21}C_{18}N_5O_4$
	Piripropene A	$C_{31}H_{37}NO_{10}$
$\Delta nctC$	Tryprostatin A	$C_{22}H_{27}N_3O_3$
	Fumitremorgin C	$C_{22}H_{25}N_3O_3$

4.3.9 Curvas de sobrevivência em camundongos BALB/c

Diversas características parecem contribuir para a patogenicidade de *A. fumigatus*, sendo esta multifatorial (Osheroov, 2007; Abad et al., 2010). Dessa forma, para melhor entender os mecanismos que levam ao sucesso da infecção, curvas de sobrevivência foram feitas no modelo murino neutropênico (Figuras 32A e B). No modelo murino, apenas $\Delta cbfA$ apresentou-se estatisticamente virulento, enquanto que $\Delta nctC$ mostrou-se avirulento. Isso sugere que o gene *nctC* pode ter papel fundamental na virulência de *A. fumigatus*.

Figura 32. Gráficos representativos do ensaio de virulência para as cepas $\Delta cbfA$, $\Delta cbfA::cbfA^+$, $\Delta nctC$, $\Delta nctC::nctC^+$ e tipo selvagem. Em camundongos, somente $\Delta cbfA$ apresentou-se virulento (A), enquanto $\Delta nctC$ (B), avirulento.

5 Conclusões

Para *A. fumigatus*, a via de sinalização de cálcio é essencial para diversas funções como crescimento, tolerância a estresses, entre outros. Da mesma forma, processos relacionados à arquitetura e à biossíntese da parede celular também são fundamentais, pois estão envolvidos com a proteção e o crescimento das hifas. Assim sendo, através de um *screening* de fatores de transcrição, foram identificados genes pertinentes a esses processos. Com base nos resultados obtidos neste trabalho, foi possível concluir que:

(i) NsdC parece estar envolvido com a via de sinalização de cálcio dependente de CrzA, já que: (a) a deleção desse gene leva ao aumento da sensibilidade à CaCl_2 ; (b) o tipo selvagem tem aumento de cerca de 2x na expressão de *nsdC*, quando tratado com Caspofungina, já em ΔcrzA a indução de *nsdC* diminui significativamente.

(ii) O fator de transcrição NsdC parece ser importante em processos relacionados a parede celular. Isso se deve ao aumento da sensibilidade à agentes causadores de estresse da parede celular, na ausência do gene, como Calcofluor White, Congo Red, *Nikkomycin Z* e Caspofungina. Além disso, o mutante nulo ΔnsdC apresentou exposição alterada dos polissacarídeos quitina, β -glucano e resíduos de galactopiranosil. Ademais, o crescimento das hifas mostrou-se desorganizado e altamente ramificado, e a espessura da parede celular diâmetro aproximadamente 5x maior do que a cepa correspondente selvagem.

(iii) O fator de transcrição NsdC parece ser importante na regulação da reprodução de *A. fumigatus*, já que a deleção de *nsdC* leva à conidiação em meio mínimo líquido, além de aumentar a expressão de *brlA* cerca de 23x. Isso sugere fortemente que NsdC reprime a expressão de *brlA* no estágio inicial da conidiação assexual.

(iv) Nós identificamos quatro mutantes nulos dos fatores de transcrição *cbfA*, *nctA*, *-B*, e *-C* que apresentam sensibilidade aumentada à Caspofungina, parecendo estar relacionados às respostas pertinentes ao efeito paradoxal em *A. fumigatus*.

(v) O fator de transcrição CbfA é ortólogo a Dpb4p de *S. cerevisiae*, que corresponde a uma subunidade da DNA polimerase epsilon e do complexo de

acessibilidade a cromatina ISW2. A deleção de *cbfA* levou ao aumento da sensibilidade da cepa à temperatura de 44°C, CaCl₂, Caspofungina, Sorbitol e NaCl, sugerindo o envolvimento desse fator de transcrição na resposta de diversos estresses.

(vi) NctA é ortóloga a Ncb2p de *S. cerevisiae*, enquanto NctB é ortóloga a Bur6p, ambos correspondem a subunidades do complexo heterodimérico regulador de transcrição NC2 de *S. cerevisiae*, indicando que possivelmente, em *A. fumigatus*, NctA e NctB também sejam componentes do mesmo complexo. Além disso, a deleção desses fatores de transcrição apresenta sensibilidade tanto a crescimento a 44°C, quanto a Caspofungina, o que reforça que esses genes podem ter papéis em comum.

(vii) NctC é ortólogo ao Hap5p de *S. cerevisiae*, que corresponde a uma subunidade do complexo de ligação Hap2p/3p/4p/5p CCAAT, e parece estar envolvido com a resposta a estresses de temperatura e osmótico. Isso se deve ao fato de NctC mostrar-se induzido tanto ao nível transcripcional quanto ao nível proteico, perante estresses de temperatura de 44 °C e de Sorbitol 1.2 M. Além disso, a deleção de *nctC* leva ao aumento a sensibilidade à Caspofungina, sugerindo que esse fator de transcrição pode estar envolvido em mecanismos de resistência à essa equinocandina. Além disso, NctC mostrou-se imprescindível para a virulência no modelo murino neutropênico.

(viii) A produção de metabólitos secundários se mostrou diferente do tipo selvagem nas cepas $\Delta cbfA$ e $\Delta nctC$. Dessa forma, é possível que esses fatores de transcrição ajam de forma conjunta ou sejam pertencentes à mesma via de sinalização. Mais estudos são necessários para confirmar a interação dos mesmos.

Assim, esses fatores de transcrição parecem ser promissores na elucidação dos mecanismos envolvidos na reprodução sexuada de *A. fumigatus* e, também, no esclarecimento dos mecanismos relativos ao efeito paradoxical provocados por caspofungina. Em conclusão, mais estudos são necessários a fim de melhor compreender os papéis desempenhados por esses genes, pois podem ser importantes para o estabelecimento da infecção e podem trazer maiores informações acerca de potenciais alvos terapêuticos no tratamento de aspergilose.

6 Referências

ABAD, A.; FERNÁNDEZ-MOLINA, J. V.; JOSEBA BIKANDI, J., ANDONI RAMÍREZ, A. R.; MARGARETO, J.; SENDINO, J.; FERNANDO LUIS HERNANDO, F. L.; PONTÓN, J.; GARAIZAR, J.; REMENTERIA, A. What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. **Rev Iberoam Micol.** v.27(4), p.155–182, 2010.

ADAMS, T.H.; BOYLAN, M.T.; TIMBERLAKE, W.E. *brlA* is necessary and sufficient to direct conidiophore development in *Aspergillus nidulans*. **Cell.** v.54, p.353-362, 1988.

ADAMS, T.H.; WIESER, J.K.; YU, J.H. Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans* **Microbiology and Molecular Biology Reviews.** v.62, pp. 35-54, 1998.

ARENDRUP MC, GARCIA-EFFRON G, BUZINA W, MORTENSEN KL, REITER N, LUNDIN C, JENSEN HE, LASS-FLÖRL C, PERLIN DS, BRUUN B. Breakthrough *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* double infection during caspofungin treatment: laboratory characteristics and implication for susceptibility testing. **Antimicrob Agents Chemother** 53:1185–1193, 2009.

AUBLE, D. T., HANSEN, K. E., MUELLER, C. G., LANE, W. S., THORNER, J. & HAHN, S. **Genes Dev.** 8, 1920–1934, 1994.

AXELROD, D.E.; GEALT, M.; PASTUSHOK, M. Gene control of developmental competence in *Aspergillus nidulans*. **Dev Biol** v.34, p.9-15, 1973.

BAYRAM, O.S.; LATGÉ, J.P.; BAYRAM, O. MybA, a new player driving survival of the conidium of the human pathogen *Aspergillus fumigatus*. **Curr Genet.** 64:141–146, 2018.

BECK, J.; ECHTENACHER, B.; EBEL, F. Woronin bodies, their impact on stress resistance and virulence of the pathogenic mould *Aspergillus fumigatus* and their anchoring at the septal pore of filamentous *Ascomycota*. **Molecular Microbiology.** v. 89, n. 5, p. 857–871, 2013.

BOK, J. W.; KELLER, N. P. LaeA, a Regulator of Secondary Metabolism in *Aspergillus* spp. **Eukaryotic Cell.** v. 3, p. 527–535, 2004.

BOWMAN, J. C.; HICKS, P. S.; KURTZ, M. B.; ROSEN, H.; SCHMATZ, D. M.; LIBERATOR, P. A.; DOUGLAS, C. M. The antifungal echinocandin caspofungin acetate kills growing cells of *Aspergillus fumigatus* in vitro. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 46, p. 3001–3012, 2002.

BOYLAN, M.T.; MIRABITO, P.M.; WILLETT, C.E., ZIMMERMAN, C.R.; TIMBERLAKE, W.E. Isolation and physical characterization of three essential conidiation genes from *Aspergillus nidulans*. **Mol Cell Biol.** v.7, p.3113-3118, 1987.

BRAKHAGE, A. A.; BRUNS, S.; THYWISSEN, A.; ZIPFEL, P. F., BEHNSEN, J. Interaction of phagocytes with filamentous fungi. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, p. 409–415, 2010.

BRAKHAGE, A.A; LANGFELDER, K. **Menacing Mold**: The Molecular Biology of *Aspergillus fumigatus*. **Annu. Rev. Microbiol.** 56:433–55, 2002.

BROWN, G. D.; DENNING, D. W.; GOW, N. A. R.; LEVITZ, S. M.; NETEA, M. G.; T WHITE, T. C. Hidden killers: human fungal infections. **Sci Transl Med**, v. 4, 2012.

BULTMAN KM, KOWALSKI CH, CRAMER RA. *Aspergillus fumigatus* virulence through the lens of transcription factors. **Med Mycol** 55:24–38, 2017

BURLEY, S. K. & ROEDER, R. G. **Annu. Rev. Biochem.** 65, 769–799, 1996.

CABIB, E.; ROBERTS, R.; BOWERS, B.. Synthesis of the yeast cell wall and its regulation. **Annu. Rev. Biochem.** v.51, p.763–793, 1982.

CALVO, A. M.; WILSON, R. A.; BOK, J. W; KELLER, N. P. Relationship between secondary metabolism and fungal development. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v. 66, p.447–459, 2002

CANG, Y.; PRELICH, G. Direct stimulation of transcription by negative cofactor 2 (NC2) through TATA-binding protein (TBP). **PNAS**. vol. 99 no. 20 12727–12732, 2002.

CHALFIE, M.; TU, Y., EUSKIRCHEN, G.; WARD, W. W.; PRASHER, D. C.. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**. v. 263, p.802– 805, 1994.

CHIN, D., MEANS, A.R. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. **Trends Cell Biol** 10: 322–328, 2000.

CHIN, E.R., OLSON, E.N., RICHARDSON, J.A., YANG, Q., HUMPHRIES, C., SHELTON, J.M., WU, H.,ZHU, W., BASSEL-DUBY, R., WILLIAMS, R.S. A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. **Genes Dev.** v.12, p.2499–2509, 1998.

CLAPHAM, D.E. Calcium signaling. **Cell** 131: 1047– 1058, 2007.

CLIPSTONE, N.A., CRABTREE, G.R. Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. **Nature** v.357, p.695–697, 1992.

CLUTTERBUCK, A.J. A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. **Genetics**, v.63, p.317-327, 1969.

COTA, J. M.; GRABINSKI, J. L.; TALBERT, R. L.; BURGESS, D. S.; ROGERS, P. D.; EDLIND, T. D.; WIEDERHOLD, N. P. Increases in SLT2 expression and chitin content are associated with incomplete killing of *Candida glabrata* by caspofungin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, p. 1144–1146, 2008.

COWEN, L. E. The evolution of fungal drug resistance: modulating the trajectory from genotype to phenotype. **Nat Rev Microbiol**, v. 6, p. 187–98, 2008. '

COWEN, L. E. Hsp90 orchestrates stress response signaling governing fungal drug resistance. **PLoS Pathog**, v. 5, e1000471, 2009.

COWEN, L. E.; LINDQUIST, S. Hsp90 potentiates the rapid evolution of new ' traits: drug resistance in diverse fungi. **Science**, v. 309, p. 2185–9, 2005. '

COWEN, L. E.; SINGH, S. D.; KOHLER, J. R, ET, A. L. Harnessing Hsp90 function as a powerful, broadly effective therapeutic strategy for fungal infectious ' disease. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, p. 2818–23, 2009.

CRAMER RA. In vivo veritas: *Aspergillus fumigatus* proliferation and pathogenesis—conditionally speaking. **Virulence** 7:7–10, 2016

CRUZ, M.C., GOLDSTEIN, A.L., BLANKENSHIP, J.R., DEL POETA, M., DAVIS, D., CARDENAS, M.E., PERFECT, J.R., MCCUSKER, J.H., HEITMAN, J. Calcineurin is essential for survival during membrane stress in *Candida albicans*. **EMBO J.** v.21, p.546–559, 2002.

CRUZ, M.C., SIA, R.A., OLSON, M., COX, G.M., HEITMAN, J. Comparison of the roles of calcineurin in physiology and virulence in serotype D and serotype A strains of *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.** v.68, p.982–985, 2000.

DAGENAIS TR, KELLER NP. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. **Clin Microbiol Rev** 22:447–465, 2009

DANG, W; KAGALWALA, M. N.; BARTHOLOMEW, B. The Dpb4 Subunit of ISW2 Is Anchored to Extranucleosomal DNA. **The Journal Of Biological Chemistry**. VOL.282,NO.27,p.19418–19425, 2007.

DA SILVA FERREIRA, M.E.; KRESS, M.R.; SAVOLDI, M.; GOLDMAN, M.H.; HÄRTL, A.; HEINEKAMP, T., BRAKHAGE, A.A., GOLDMAN, G.H. The akuB(KU80) mutant deficient for nonhomologous end joining is a powerful tool for analysing pathogenicity in *Aspergillus fumigatus*. **Eukaryot Cell**. v.5, p.207-211, 2006

DA SILVA FERREIRA, M.E., HEINEKAMP T., HÄRTL, A., BRAKHAGE, A.A., SEMIGHINI, C.P., HARRIS, S.D., SAVOLDI, M., DE GOUVÊA, P.F., DE SOUZA GOLDMAN, M.H., GOLDMAN, G.H. Functional characterization of the *Aspergillus fumigatus* calcineurin. **Fungal Genet Biol.**, v. 44(3), p. 219-30, 2007.

DE VRIES, R.P.; RILEY, R.; WIEBENGA, A. et al. Comparative genomics reveals high biological diversity and specific adaptations in the industrially and medically important fungal genus *Aspergillus*, 2017.

DYER, P.S.; O'GORMAN, C.M. Sexual development and cryptic sexuality in fungi: insights from *Aspergillus* species. **FEMS Microbiology Reviews**, v.36, p.165-192, 2012.

ELLIS M. Therapy of *Aspergillus fumigatus*-related diseases. **See Ref.** 11, 2:105–29, 1999.

ETXEBESTE, O.; GARZIA, A.; ESPESO, E.A. et al. *Aspergillus nidulans* asexual development: making the most of cellular modules. **Trends in Microbiology**. v.18, pp.569-576, 2010.

FONTAINE, T.; SIMENEL, C.; DUBREUCQ, G.; ADAM, O.; DELEPIERRE, M., et al. Molecular organization of the alkali-insoluble fraction of *Aspergillus fumigatus* cell wall. **J. Biol. Chem.** v.275(36), p.27594–607, 2000.

FORTWENDEL, J. R.; JUVVADI, P. R.; PINCHAI, N.; PERFECT, B. Z.; ALSPAUGH, J. A.; PERFECT, J. R.; STEINBACH, W.J. Differential Effects of Inhibiting Chitin and 1,3-β-D-Glucan Synthesis in Ras and Calcineurin Mutants of *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. 476–482, 2009.

FORTWENDEL JR, JUVVADI PR, PERFECT BZ, ROGGE LE, PERFECT JR, STEINBACH WJ. Transcriptional regulation of chitin synthases by calcineurin controls paradoxical growth of *Aspergillus fumigatus* in response to caspofungin. **Antimicrob Agents Chemother** 54:1555–1563, 2010.

FOX, D.S., CRUZ, M.C., SIA, R.A., KE, H., COX, G.M., CARDENAS, M.E., HEITMAN, J. Calcineurin regulatory subunit is essential for virulence and mediates interactions with FKBP12-FK506 in *Cryptococcus neoformans*. **Mol. Microbiol.** v.39, p.835–849, 2001.

FRANÇOIS, J.M. A simple method for quantitative determination of polysaccharides in fungal cell walls. **Nat Protoc.** v. 1, p. 2995–3000, 2006.

GADBOIS, E. L., CHAO, D. M., REESE, J. C., GREEN, M. R. & YOUNG, R. A. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 94, 3145–3150, 1997.

GALAGAN, J. E. et al. Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. **Nature** 438, 1105–1115, 2005.

GEISBERG, J. V., HOLSTEGE, F. C., YOUNG, R. A. & STRUHL, K. **Mol. Cell.Biol.** 21, 2736–2742, 2001.

GOPPELT, A. & MEISTERERNST, M. **Nucleic Acids Res.** 24, 4450–4455, 1996.

GUERINI, D. Calcineurin: not just a simple protein phosphatase. **Biochem Biophys Res Commun** 235: 271– 275, 1997.

HAN, K. H., K. Y. HAN, J. H. YU, K. CHAE, K. Y. JAHNG ET AL., The nsdD gene encodes a putative GATA-type transcription factor necessary for sexual development of *Aspergillus nidulans*. **Mol. Microbiol.** 41: 299–309, 2001.

HAN, K. H., AND R. A. PRADE, Osmotic stress-coupled maintenance of polar growth in *Aspergillus nidulans*. **Mol. Microbiol.** 43: 1065–1078, 2002.

HAN, K. H., J. A. SEO AND J. H. YU, A putative G protein-coupled receptor negatively controls sexual development in *Aspergillus nidulans*. **Mol. Microbiol.** 51: 1333–1345, 2004.

HAMICHE,A.,SANDALTZOPOULOS,R.,GDULA,D.A.,ANDWU,C. **Cell** 97, 833– 842, 1999.

HEALEY KR, KATIYAR, S. K.; CASTANHEIRA, M.; PFALLER, M. A.; EDLIND, T. D. *Candida glabrata* mutants demonstrating paradoxical reduced caspofungin susceptibility but increased micafungin susceptibility. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, p. 3947–3949, 2011.

HEALEY, K. R.; KATIYAR, S. K.; RAJ, S.; EDLIND, T. D. CRS-MIS in *Candida glabrata*: sphingolipids modulate echinocandin-Fks interaction. **Molecular Microbiology**, v. 86, p. 303–313, 2012.

HERNÁNDEZ-ORTIZ, P.; ESPESO, E. A. Phospho-regulation and nucleocytoplasmic trafficking of CrzA in response to calcium and alkaline-pH stress in *Aspergillus nidulans*. **Molecular Microbiology** 89(3), 532–551, 2013

HISATAKE, K., ROEDER, R. G. & HORIKOSHI, M. **Nature** 363, 744 –747, 1993.

HORN, B.W.; MOORE, G.G.; CARBONE, I. Sexual reproduction in *Aspergillus flavus*. **Mycologia**, v.101, p.423-429, 2009a.

HORN, B.W.; RAMIREZ-PRADO, J.H.; CARBONE, I. Sexual reproduction and recombination in the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus parasiticus*. **Fungal Genetics and Biology**. v.46, p.169-175, 2009b.

HOWARD, S.J.; CERAR, D.; ANDERSON, M.J.; ALBARRAG, A.; FISHER, M.C.; PASQUALOTTO, A. C.; LAVERDIERE, M.; ARENDRUP, M. C.; PERLIN, D. S.; DENNING, D. W. Frequency and Evolution of Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus* Associated with Treatment Failure. **Emerg Infect Dis**. v. 15(7), p.1068–1076, 2009.

IIDA, T., AND ARAKI, H. **Mol. Cell. Biol.** 24, 217–227, 2004.

IMBALZANO, A. N., ZARET, K. S. & KINGSTON, R. E. **J. Biol. Chem.** 269,8280 – 8286, 1994.

INOSTROZA, J. A., MERMELSTEIN, F. H., HA, I., LANE, W. S. & REINBERG, D. **Cell** 70, 477–489, 1992.

JACKSON-FISHER, A. J., CHITIKILA, C., MITRA, M. & PUGH, B. F. **Mol. Cell** 3, 717–727, 1999.

JACKSON. S.L.; HEATH, I.B. Effects of exogenous calcium ions on tip growth, intracellular Ca^{2+} concentration, and actin arrays in hyphae of the fungus *Saprolegnia ferax*. **Exp Mycol.** v.13, p. 1–12, 1989.

JACKSON. S.L.; HEATH, I.B. Roles of calcium ions in hyphal tip growth. **Microbiol Rev** v.57, p.367–382, 1993.

JAIN R, VALIANTE V, REMME N, DOCIMO T, HEINEKAMP T, HERTWECK C, GERSHENZON J, HAAS H, BRAKHAGE AA. The MAP kinase MpkA controls cell wall integrity, oxidative stress response, gliotoxin production and iron adaptation in *Aspergillus fumigatus*. **Mol Microbiol** 82: 39–53, 2011.

JIMENEZ-ORTIGOSA, C.; AIMANIANDA, V.; MUSZKIETA, L.; MOUYNIA, I.; ALSTEENS, D.; PIRE, S.; BEAU, R.; KRAPPMANN, S.; BEAUVAIS, A.; DUFRENE, Y. F.; RONCERO, C.; LATGE, J. P. Chitin synthases with a myosin motor-like domain control the resistance of *Aspergillus fumigatus* to echinocandins. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, p. 6121–6131, 2012.

JUVVADI P.R.; MUÑOZ, A.; LAMOTH, F.; SODERBLOM, E.J.; MOSELEY, M.A.; READ, N.D.; STEINBACH, W.J.. Calcium-mediated induction of paradoxical growth following caspofungin treatment is associated with calcineurin activation and phosphorylation in *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrob Agents Chemother**. v.59, p.4946–4955, 2015.

KARABABA, M., VALENTINO, E., PARDINI, G., COSTE, A.T., BILLE, J., SANGULARD, D. *CRZ1*, a target of the calcineurin pathway in *Candida albicans*. **Molecular Microbiology**. v.(5)59, p.1429-1451, 2006.

KIM, S., NA, J. G., HAMPSEY, M. & REINBERG, D. **Proc. Natl. Acad. Sci.USA** 94, 820–825, 1997.

KIM, H.R.; SHAE, K.; HAN, K.; HAM, D. The *nsdC* gene encoding a putative C2H2-type transcription factor is a key activator of sexual development in *Aspergillus nidulans*. **Genetics** 182(3):771-83, 2009.

KLIS, F.M. Cell wall assembly in yeast. **Yeast**. v.10, p.851–869, 1994.

KONTONYANNIS, D.P., LEWIS, R.E., OSHEROV, N., ALBERT, N.D., MAY, G.S. Combination of caspofungin with inhibitors of the calcineurin pathway attenuates growth in vitro in *Aspergillus* species. **J Antimicrob Chemother**, v. 51, p. 313-316, 2003.

KOSTER, M.J.E.; SNEL, B.; TIMMERS, H.T.M. Genesis of Chromatin and Transcription Dynamics in the Origin of Species. **Cell** 161, p.724-736, 2015.

KRAMER, D., FRESU, L., ASHBY, D.S., FREEMAN, T.C., GENAZZANI, A.A. Calcineurin controls the expression of numerous genes in cerebellar granule cells. **Mol. Cell.Neurosci**. v.23, p.325–330, 2003.

KREBS, J. The role of calcium in apoptosis. **Biometals**. v.11, p.375–382, 1998.

KWON-CHUNG, K.J.; SUGUI, J.A. *Aspergillus fumigatus* — what makes the species a ubiquitous human fungal pathogen? **PLoS Pathog.** v.9, e1003743, 2013.

LAFAYETTE, S. L.; COLLINS, C.; ZAAS, A. K.; SCHELL, W. A.; BETANCOURT-QUIROZ, M.; GUNATILAKA, A. A. L.; PERFECT, J. R.; COWEN, L. E. PKC signaling regulates drug resistance of the fungal pathogen *Candida albicans* via circuitry comprised of Mkc1, calcineurin, and Hsp90. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 8, e1001069, 2010.

LAMOTH, F.; JUVVADI, P. R.; GEHRKE, C.; ASFAW, Y. G.; STEINBACH, W. J. Transcriptional Activation of Heat Shock Protein 90 Mediated Via a Proximal Promoter Region as Trigger of Caspofungin Resistance in *Aspergillus fumigatus*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 209, p. 473–81, 2014.’

LANGST, G., BONTE, E. J., CORONA, D. F., AND BECKER, P. B. **Cell** 97, 843–852, 1999.

LATGÉ, J.P. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. **Clin. Microbiol. Rev.** v.12, p.310–350, 1999. ’

_____. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. **TRENDS in Microbiology**, v. .9, n. 8, 2001.

_____. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. **Mol. Microbiol**, v. 66, p. 279–290, 2007.

_____. Tasting the fungal cell wall. **Cell Microbiol.** v.12(7), p.863–72, 2010.

LATGÉ, J.P.; BEAUVAIS, A.; CHAMILOS, G. The Cell Wall of the Human Fungal Pathogen *Aspergillus fumigatus*: Biosynthesis, Organization, Immune Response, and Virulence. **Annu. Rev. Microbiol.** v.71, p.99–116, 2017.

LEE, K.K.; MACCALLUM, D. M.; JACOBSEN, M. D.; WALKER, L. A.; ODDS, F. C.; GOW, N. A.; MUNRO, C. A. Elevated cell wall chitin in *Candida albicans* confers echinocandin resistance *in vivo*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, p. 208 – 217, 2012.

LEE, T. I., WYRICK, J. J., KOH, S. S., JENNINGS, E. G., GADBOIS, E. L. & YOUNG, R. A. **Mol. Cell. Biol.** 18, 4455–4462, 1998.

LEE, T. I.; YOUNG, R. A. **Genes Dev.** 12, 1398–1408, 1998.

LEMAIRE, M., XIE, J., MEISTERERNST, M. & COLLART, M. A. **Mol. Microbiol.** 36, 163–173, 2000.

LEVIN, D. E. Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. **Genetics**, v. 189, p. 1145–1175, 2011.

LIU, D., ISHIMA, R., TONG, K. I., BAGBY, S., KOKUBO, T., MUHANDIRAM, D. R., KAY, L. E., NAKATANI, Y. & IKURA, M. **Cell** 94, 573–583, 1998.

LIU, M., DU, P., HEINRICH, G., COX, G. M., GELLI, A. Cch1 mediates calcium in *Cryptococcus neoformans* and is essential in low-calcium environments. **Eukaryotic Cell**. v.(10)5, p.1788-1796, 2006.

LOSS, O.; BERTUZZI, M.; YAN, Y.; FEDOROVA, N.; L. MCCANN, B. L.; ARMSTRONG-JAMES, D.; ESPESO, E. A.; READ, N. D.; NIERMAN, W. C. BIGNELL, E. M. Mutual independence of alkaline- and calcium-mediated signalling in *Aspergillus fumigatus* refutes the existence of a conserved druggable signalling nexus. **Mol Microbiol.** v.106(6), p.861–875, 2017.

LUGER, K., MADER, A. W., RICHMOND, R. K., SARGENT, D. F. & RICHMOND, T. J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. **Nature** 389, 251–260, 1997.

MAERTENS, J.; RAAD, I.; PETRIKKOS, G.; BOOGAERTS, M.; SELLESLAG, D.; PETERSEN, F. B.; SABLE, C. A.; KARTSONIS, N. A.; NGAI, A.; TAYLOR, A.; PATTERSON, T. F.; DENNING, D. W.; WALSH, T. J. Efficacy and safety of caspofungin for treatment of invasive aspergillosis in patients refractory to or intolerant of conventional antifungal therapy. **Clin. Infect. Dis**, v. 39, p. 1563–1571, 2004.

MAHIEU, L. M.; DE DOOY, J. J.; VAN LAER, F. A.; JANSSENS, H.; IEVEN, M. M. A prospective study on factors influencing *Aspergillus* spore load in the air during renovation works in a neonatal intensive care unit. **J. Hosp. Infect.** v.45, p.191–197, 2000. '

MANSUY, I. M., MAYFORD, M., JACOB, B., KANDEL, E. R., BACH, M. E. Restricted and regulated overexpression reveals calcineurin as a key component in the transition from short-term to long-term memory. **Cell** v.92, p.39–49, 1998.

MATHEOS, D. P.; KINGSBURY, T. J.; AHSAN, U. S.; CUNNINGHAM, K. W. Tcn1p/Crz1p, a calcineurin-dependent transcription factor that differentially regulates gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genes Dev.** v.11, p.3445-58, 1997.

MCCONNELL, A. D.; GELBART, M. E.; ANDTSUKIYAMA, T. **Mol. Cell. Biol.** 24, 2605–2613, 2004.

MELLADO, E.; AUFAUVRE-BROWN, A.; SPECHT, C. A.; ROBBINS, P. W.; HOLDEN, D. W. A multigene family related to chitin synthase genes of yeast in the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus*. **Mol Gen Genet**, v. 246, p. 353–359, 1995.

MELLADO, E.; AUFAUVRE-BROWN, A.; GOW, N. A.; HOLDEN, D. W. The *Aspergillus fumigatus chsC* and *chsG* genes encode class III chitin synthases with different functions. **Mol Microbiol**, v. 20, p. 667–679, 1996a.

MELLADO, E.; DUBREUCQ, G.; MOL, P.; SARFATI, J.; PARIS, S.; DIAQUIN, M.; HOLDEN, D. W.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; LATGE, J. P. Cell wall biogenesis in a double chitin synthase mutant (*chsG-1chsE-*) of *Aspergillus fumigatus*. **Fungal Genet Biol**, v. 38, p. 98–109, 2003.

MELLADO, E.; SPECHT, C. A.; ROBBINS, P. W.; HOLDEN, D. W. Cloning and characterization of *chsD*, a chitin synthase-like gene of *Aspergillus fumigatus*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 143, p. 69–76. 1996b.

MEISTERERNST, M. & ROEDER, R. G. **Cell** 67, 557–567, 1991.

MORA-MONTES, H. M.; NETEA, M. G.; FERWERDA, G.; LENARDON, M. D.; BROWN, G. D.; MISTRY, A. R.; KULLBERG, B. J.; O'CALLAGHAN, C. A.; SHETH, C. C.; ODDS, F. C.; BROWN, A. J.; MUNRO, C. A.; GOW, N. A. Recognition and blocking of innate immunity cells by *Candida albicans* chitin. **Infect Immun**, v. 79, p. 1961–1970, 2011.

MORENO-VELÁSQUEZ, S. D.; SEIDEL, C.; JUVVADI, P. R.; STEINBACH, W. J.; READ, N. D. Caspofungin-Mediated Growth Inhibition and Paradoxical Growth in *Aspergillus fumigatus* Involve Fungicidal Hyphal Tip Lysis Coupled with Regenerative Intrahyphal Growth and Dynamic Changes in β -1,3-Glucan Synthase Localization. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 61(10), 2017.

MORIYAMA B, HENNING SA, PENZAK SR, WALSH TJ.. The postantifungal and paradoxical effects of echinocandins against *Candida* spp. **Future Microbiol** 7:565–569, 2012

MUNRO, C. A.; SELVAGGINI, S.; BRUIJN, I. DE; WALKER, L.; LENARDON, M. D.; GERSSSEN, B.; MILNE, S.; BROWN, A. J. P.; GOW, N. A. R. The PKC, HOG and Ca^{2+} signalling pathways co-ordinately regulate chitin synthesis in *Candida albicans*. **Molecular Microbiology**, v. 63, p. 1399–1413, 2007.

MUSZKIETA, L.; AIMANIANDA, V.; MELLADO, E.; GRIBALDO, S.; ALCAZAR-FUOLI, L.; SZEWCZYK, E.; PREVOST, M. C.; LATGE, J. P. Deciphering the role of the chitin synthase families 1 and 2 in the *in vivo* and *in vitro* growth of *Aspergillus fumigatus* by multiple gene targeting deletion. **Cell Microbiol**, v. 16, p. 1784–1805, 2014.

NAKAMURA, K.; KITANI, A.; STROBER, W. Cell Contact-dependent Immunosuppression by CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells Is Mediated by Cell Surface-bound Transforming Growth Factor **The Journal of Experimental Medicine**, v. 194, n. 5, p. 629–644, 2001.

NIERMAN, W. C. et al. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. **Nature** 438, 1151–1156, 2005.

ODOM, A., MUIR, S., LIM, E., TOVALETTI, D.L., PERFECT, J., HEITMAN, J. Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. **EMBO J.** v.16, p.2576–2589, 1997.

O'GORMAN, C. M.; FULLER, H. T.; DYER, P. S. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus* **Nature**. vol 457 (29), p. 471–475, 2009.

OHYA, T.; MAKI, S.; KAWASAKI, Y.; SUGINO, A. **NucleicAcidsRes.** 28, 3846 – 3852, 2000.

OJEDA-LÓPEZ, M.; CHEN, W.; EAGLE, C.E.; GUTIÉRREZ, G.; JIA, W.L.; SWILAIMAN, S.S.; HUANG, Z.; PARK, H.S.; YU, J.H.; CÂNOVAS, D.; DYER, P.S. Evolution of asexual and sexual reproduction in the aspergilli. **Studies In Mycology**. v.91, p.37–59, 2018.

PAOLETTI M.; RYDHOLM, C.; SCHWIER, E.U. et al. Evidence for sexuality in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. **Current Biology**. v.15, p.1242–1248, 2005.

PAOLETTI, M.; SEYMOUR, F.A.; ALCOCER, M.J.C. et al. Mating type and the genetic basis of self-fertility in the model fungus *Aspergillus nidulans*. **Current Biology**. v.17, p.1384–1389, 2007.

PARK, B.C.; PARK, T.H.; YI, S.; CHOI, Y.K.; KANG, E.H.; PARK H.M. Transcriptional Regulation of *fksA*, a β -1,3-Glucan Synthase Gene, by the APSES Protein StuA during *Aspergillus nidulans*. **Development Journal of Microbiology**. v.52, n.11, p.940–947, 2014.

PARK, H.S.; YU, J.H. Genetic control of asexual sporulation in filamentous fungi. **Current Opinion in Microbiology**. v.15, p.669–677, 2012.

PARSONS, S.A., MILLAY, D.P., SARGENT, M.A., NAYA, F.J., MCNALLY, E.M., SWEENEY, H.L., MOKKENTIN, J.D. Genetic disruption of calcineurin improves skeletal muscle pathology and cardiac disease in a mouse model of limb-girdle muscular dystrophy. **J. Biol. Chem.** v.282, p.10068–10078, 2007.

PERLIN, D. S. Mechanisms of echinocandin antifungal drug resistance. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1354, p. 1-11, 2015.

PINI, G.; FAGGI, E.; DONATO, R.; SACCO, C.; FANCI, R. Invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients and the influence of hospital renovation. **Mycoses** v.51, p.117–122, 2008.'

PRELICH, G. **Mol. Cell. Biol.** 17, 2057–2065, 1997

PRELICH, G. & WINSTON, F. **Genetics**. 135, 665–676, 1993.

RAPER, K.B.; FENNELL, D.I. The genus *Aspergillus* **The Williams & Wilkins Company**, Baltimore, USA (1965).

REEDY, J.L., FILLER, S.G., HEITMAN, J. Elucidating the *Candida albicans* calcineurin signaling cascade controlling stress response and virulence. **Fungal Genet Biol**, v.47, p.107-116, 2010.

REINOSO-MARTIN, C.; SCHULLER, C.; SCHUETZER-MUEHLBAUER, M.; KUCHLER, K. The yeast protein kinase C cell integrity pathway mediates tolerance to the antifungal drug caspofungin through activation of Slt2p mitogen-activated protein kinase signaling. **Eukaryot. Cell**, v. 2, p. 200–1210, 2003.

REN, X.X.; WANG, Y.; LIU, Y.X.; TAN, Y.; REN, C.; GE, Y.; LIU, Z. Comparative transcriptome analysis of the calcium signaling and expression analysis of sodium/calcium exchanger in *Aspergillus cristatus*. **Journal of reference microbiology**, 2017.

RICHARDSON, M.D. Changing patterns and trends in systemic fungal infections. **J Antimicrob Chemother.** v.56: i5 – i11, 2005.

RIES LNA, ROCHA MC, DE CASTRO PA, SILVA-ROCHA R, SILVA RN, FREITAS FZ, DE ASSIS LJ, BERTOLINI MC, MALAVAZI I, GOLDMAN GH. The *Aspergillus fumigatus* CrzA transcription factor activates chitin synthase gene expression during the caspofungin paradoxical effect. **mBio** 8:e00705-17, 2017.

ROCHA MC, FABRI JH, FRANCO DE GODOY K, ALVES DE CASTRO P, HORI JI, FERREIRA DA CUNHA A, ARENTSHORST M, RAM AF, VAN DEN HONDEL CA, GOLDMAN GH, MALAVAZI I. *Aspergillus fumigatus* MADS-box transcription factor RlmA is required for regulation of the cell wall integrity and virulence. **G3** 6:2983–3002, 2016.

ROCHA, M.C.; DE GODOY, K.F.; BANNITZ-FERNANDES, R.; FABRI, J.H.T.M.; BARBOSA, M.M.F.; DE CASTRO, P.A.; ALMEIDA, F.; GOLDMAN, G.H.; DA CUNHA, A.F.; NETTO, L.E.S.; DE OLIVEIRA, M.A.; MALAVAZI, I. Analyses of the three 1-Cys Peroxiredoxins from *Aspergillus fumigatus* reveal that cytosolic Prx1 is central to H₂O₂ metabolism and virulence. *Sci Rep.* v.8(1), p.12314, 2018.

RYDHOLM, C., SZAKACS, G., LUTZONI, F. Low genetic variation and no detectable population structure in *Aspergillus fumigatus* compared to closely related *Neosartorya* species. **Eukaryot. Cell** 5, 650–657, 2006.

SAMSON, R.A.; VISAGIE, C.M.; HOUBRAKEN, J. et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, v.78, pp. 141-173, 2014.

SANGLARD, D., ISCHER, F., MARCHETTI, O., ENTENZA, J., BILLE, J. Calcineurin A of *Candida albicans*: involvement in antifungal tolerance, cell morphogenesis, and virulence. **Mol. Microbiol.** v.48, p.959–976, 2003.

SCHNEIDER, C.A.; RASBAND, W.S.; ELICEIRI, K.W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nat Methods.** v. 9, p. 671-675, 2012.

SHAPIRO, R. S.; ZAAS, A. K.; BETANCOURT-QUIROZ, M.; PERFECT, J. R.; COWEN, L. E. The Hsp90 co-chaperone Sgt1 governs *Candida albicans* morphogenesis and drug resistance. **PLoS One**, v. 7, e44734, 2012.

SHEN, X., MIZUGUCHI, G., HAMICHE, A., AND WU, C. **Nature** 406, 541–544, 2000.

SHIBASAKI, F., MCKEON, F. Calcineurin functions in Ca(2+)-activated cell death in mammalian cells. **J. Cell. Biol.** v.131, p.735–743, 1995.

SHIELDS RK, NGUYEN MH, DU C, PRESS E, CHENG S, CLANCY CJ.. Paradoxical effect of caspofungin against *Candida* bloodstream isolates is mediated by multiple pathways but eliminated in human serum. **Antimicrob Agents Chemother** 55:2641–2647, 2011.

SILVERMAN-GAVRILA, L.B.; LEW, R.R. Calcium and tip growth in *Neurospora crassa*. *Protoplasma*. v.213, p.203–217, 2000.

SILVA, L. P.; DE CASTRO, P. A.; DOS REIS, T. F.; PAZIANI, M. H.; VON ZESKA KRESS, M. R.; RIAÑO-PACHÓN, D. M.; HAGIWARA, D.; RIES, L. N. A.; BROWN, N. A.; GOLDMAN, G. H. Genome-wide transcriptome analysis of *Aspergillus fumigatus* exposed to osmotic stress reveals regulators of osmotic and cell wall stresses that are SakA^{HOG1} and MpkC dependent. **Cellular Microbiology**, 2016.

SINGH-BABAK, S. D.; BABAK, T.; DIEZMANN, S.; HILL, J. A.; XIE, J. L.; CHEN, Y. L.; POUTANEN, S. M.; RENNIE, R. P.; HEITMAN, J.; COWEN, L. E. Global analysis of the evolution and mechanism of echinocandin resistance in *Candida glabrata*. **PLoS Pathog**, v. 8, e1002718, 2012.

SINGH, S. D.; ROBBINS, N.; ZAAS, A. K.; SCHELL, W. A.; PERFECT, J. R.; COWEN, L. E. Hsp90 governs echinocandin resistance in the pathogenic yeast *Candida albicans* via calcineurin. **PLoS Pathogens**, v. 5, e1000532, 2009.

SORIANI, F.M., MALAVAZI, I., DA SILVA FERREIRA, M.E., SAVOLDI, M., VON ZESKA KRESS, M.R., DE SOUZA GOLDMAN, M.H., LOSS, O., BIGNELL, E., GOLDMAN, G.H. Functional characterization of the *Aspergillus fumigatus* CRZ1 homologue, CrzA. **Molecular Microbiology**. v.67(6), p.1274-1291, 2008.

STATHOPOULOS, AM; CYERT, MS. Calcineurin acts through the CRZ1/TCN1-encoded transcription factor to regulate gene expression in yeast. **Genes Dev**, v.11, p.3432-3444, 1997.

STATHOPOULOS-GERONTIDES, A., GUO, J.J., AND CYERT, M.S. Yeast calcineurin regulates nuclear localization of the Crz1p transcription factor through dephosphorylation. **Genes Dev**.v.13, p.798–803, 1999.

STEINBACH, W.J., REEDY, J.L., CRAMER, R.A., PERFECT, J.R., HEITMAN, J. Harnessing calcineurin as a novel anti-infective agent against invasive fungal infections. **Nat Rev Microbiol**, v.5, p.418–430, 2007.

STEINBACH, W. J.; LAMOTH, F.; JUVVADI, P. R. Potential Microbiological Effects of Higher Dosing of Echinocandins. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, n.S6, p. S669–77, 2015.

STEVENS, D.A. Vaccinate against aspergillosis! A call to arms of the immune system. **Clin Infect Dis**, v.38, p.1131-1136, 2004.

STEVENS, D.A. Frequency of paradoxical effect with caspofungin in *Candida albicans*. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis** 28:717, 2009.

STEVENS, D.A. Vaccinate Against Aspergillosis! A Call to Arms of the Immune System. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, p. 1131–6, 2004.

STEVENS, D.A.; ICHINOMIYA, M.; KOSHI, Y.; HORIUCHI, H. Escape of *Candida* from caspofungin inhibition at concentrations above the MIC (paradoxical effect) accomplished by increased cell wall chitin; evidence for β -1,6-glucan synthesis inhibition by caspofungin. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 50, p. 3160–3161, 2006.

SUGUI, J.A.; KWON-CHUNG, K.J.; JUVVADI, P.R.; LATGÉ, J.P.; STEINBACH, W.J. *Aspergillus fumigatus* and Related Species. **Cold Spring Harb Perspect Med**. v.5:a019786, 2015.

SWILAIMAN, S.S.; O'GORMAN, C.M.; BALAJEE, S.A., et al. Discovery of a sexual cycle in *Aspergillus lentulus*, a close relative of *A. fumigatus*. **Eukaryotic Cell**. v.12, p.962-969, 2013.

TAHA, M.P.; POLLARD, S.J.; SARKAR, U.; LONGHURST, P. Estimating fugitive bioaerosol releases from static compost windrows: feasibility of a portable wind tunnel approach. **Waste Manag**. v.25, p.445–450, 2005. '

TEKAIA, F.; LATGÉ, J. P., *Aspergillus fumigatus*: saprophyte or pathogen? **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 385–392, 2005.

TOMEE, J.F.; VAN DER WERF, T.S. Pulmonary aspergillosis. **Neth J Med**. v.59: 244–258, 2001.

TSUKIYAMA, T., PALMER, J., LANDEL, C. C., SHILOACH, J., AND WU, C. **Genes Dev**. 13, 686 – 697, 1999.

VALIANTE V, HEINEKAMP T, JAIN R, HÄRTL A, BRAKHAGE AA. The mitogen-activated protein kinase MpkA of *Aspergillus fumigatus* regulates cell wall signaling and oxidative stress response. **Fungal Genet Biol** 45:618 – 627, 2008.

VALIANTE V, JAIN R, HEINEKAMP T, BRAKHAGE AA.. The MpkA MAP kinase module regulates cell wall integrity signaling and pyomelanin formation in *Aspergillus fumigatus*. **Fungal Genet Biol** 46:909–918, 2009.

VAN DE VEERDONK, F.L.; GRESNIGT, M.S.; ROMANI, L.; NETEA, M.G.; LATGÉ, J.P. *Aspergillus fumigatus* morphology and dynamic host interactions. **Nature Reviews Microbiology**. v.15, p. 661-674, 2017.

WALKER, L. A.; GOW, N. A.; MUNRO, C. A. Elevated chitin content reduces the susceptibility of *Candida* species to caspofungin. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 57, p. 146–154, 2013

WALKER, L. A.; LEE, K. K.; MUNRO, C. A.; GOW, N. A. R. ' Caspofungin Treatment of *Aspergillus fumigatus* Results in ChsG-Dependent Upregulation of Chitin Synthesis and the Formation of Chitin-Rich Microcolonies. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 10, 2015.

WALKER, L. A.; MUNRO, C. A.; DE BRUIJN, I.; LENARDON, M. D.; MCKINNON, A.; GOW, N. A. Stimulation of chitin synthesis rescues *Candida albicans* from echinocandins. **PLoS Pathog**, 4:e1000040, 2008.

WANG, H.G., PATHAN, N., ETHELL, I.M., KRAJEWSKI, S., YAMAGUCHI, Y., SHIBASAKI, F., MCKEON, F., BOBO, T., FRANKE, T.F., REED, J.C. Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. **Science** v.284, p.339–343, 1999.

WEIDEMAN, C. A., NETTER, R. C., BENJAMIN, L. R., MCALLISTER, J. J., SCHMIEDEKAMP, L. A., COLEMAN, R. A. & PUGH, B. F. J. **Mol. Biol.** 271,61–75, 1997.

WEITLAUF, C., WINDER, D. Calcineurin, synaptic plasticity, and memory. **Sci. World J.** v.1, p.530–533, 2001.

WIEDERHOLD, N.; KONTOYIANNIS, D.; PRINCE, R.; LEWIS, R. Attenuation of the Activity of caspofungin at high concentrations against *Candida albicans*: possible role of cell wall integrity and calcineurin pathways. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 49, p. 5146–5148, 2005.

WIESER, J.; LEE, B.N.; FONDON, JW. 3RD; ADAMS, T.H. Genetic requirements for initiating asexual development in *Aspergillus nidulans*. **Curr Genet**. v.27, p.62-69, 1994.

WINKELSTRÖTER, L.K.; BOM, V.L.; DE CASTRO, P.A.; RAMALHO, L.N.; GOLDMAN, M.H.; BROWN, N.A.; RAJENDRAN, R.; RAMAGE, G.; BOVIER, E.; DOS REIS, T.F.; HAGIWARA, D.; GOLDMAN, G.H. High osmolarity glycerol response PtcB phosphatase is importante for *Aspergillus fumigatus* virulence. **Mol Microbiol** v.96, p.42-54, 2015.

WORKMAN, J. L. & ROEDER, R. G. **Cell** 51, 613–622, 1987.

YOKOMORI, K., ZEIDLER, M. P., CHEN, J. L., VERRIJZER, C. P., MLODZIK, M. & TJIAN, R. **Genes Dev.** 8, 2313–2323, 1994.

YU, J.H. Regulation of development in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus*. **Mycobiology**, v.38, pp.229-237, 2010.

ZHAO, X.; HERR, W. **Cell** 108, 615–627, 2002.

ZONNEVELD, B.J.M. Biochemistry and ultrastructure of sexual development of *Aspergillus*, in **Genetics and Physiology of *Aspergillus***, p.59-80 1977.