UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Caracterização funcional dos genes codificadores de proteínas ADP-Ribosylation Factor no fungo filamentoso patogênico Aspergillus fumigatus

Mario Henrique Paziani

Ribeirão Preto 2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Caracterização funcional dos genes codificadores de proteínas ADP-Ribosylation Factor no fungo filamentoso patogênico Aspergillus fumigatus

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientado: Mário Henrique Paziani

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marcia Regina von Zeska Kress

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Biociências Aplicadas à Farmácia em 16/12/2016. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

> Ribeirão Preto 2016

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.

Paziani, Mario Henrique

Caracterização funcional dos genes codificadores de proteínas *ADP-Ribosylation Factor* no fungo filamentoso patogênico *Aspergillus fumigatus*. Ribeirão Preto, 2016.

97 p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Kress, Marcia Regina von Zeska

1. Aspergillus fumigatus. 2. transporte vesicular. 3. Crescimento

apical

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Mario Henrique Paziani

Título do trabalho: Caracterização funcional dos genes codificadores de proteínas *ADP-Ribosylation Factor* no fungo filamentoso patogênico *Aspergillus fumigatus*

> Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Ciências

> Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marcia Regina von Zeska Kress

Aprovado em:		
I	Banca Examinadora	
Prof. Dr		
Instituição:	Assinatura:	
Prof. Dr		
Instituição:	Assinatura:	
Prof. Dr		
Instituição:	Assinatura:	

Dedicatória

Aos meus queridos pais, *Dorival Roque Paziani* e *Olinda Rodrigues dos Santos Paziani*, com todo meu amor e gratidão, por tudo que fizeram por mim ao longo dessa jornada.

AGRADECIMENTOS

A Prof.^a Dr.^a Marcia Regina von Zeska Kress, pela orientação, pela confiança concedida a mim e pelos grandes ensinamentos, os quais levarei para todo sempre;

Aos meus familiares, Daniela Rodrigues Paziani, James Paziani de Oliveira, Karina Rodrigues Paziani, Davi Paziani do Nascimento, Diogo Paziani do Nascimento e Ivalda Paziani. Vocês são a minha mais absoluta alegria e a base para todas as minhas conquistas;

A minha amada avó paterna, Brigida Violin Paziani (In memoriam);

Ao meu grande companheiro Iuri Andrei Loria Pinto e seus familiares;

A minha grande amiga e mentora Ludmilla Tonani Carvalho e aos meus amigos Paulo Victor Machado Carvalho, Carolina Capizzani, Rodrigo Pezutto, Renata Galetti, Vittor Ribeiro Brito, Bárbara Cardoso, Raphael Akiyama, Heliara Spina e aos meus eternos amigos e mestres da graduação (37° Turma – Biologia, Centro Universitário Barão de Mauá, Ribeirão Preto-SP).

A equipe científica do laboratório LEGPFF/FCFRP-USP (Laboratório de Expressão Gênica e Proteômica de Fungos Filamentosos) Érika Nacimento, Vanessa Favaro Braga, Patrícia Helena Grizante Barião, Henrique Dantas de Meneses, Raquel dos Santos, Tiago Cocio e Raphael Festuccia.

Ao Prof.º Dr. Gustavo Henrique Goldman do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP-USP pela utilização de equipamentos e colaborações em pesquisas.

Aos Professores Dr. Gilberto Úbida Leite Braga do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto– SP (FCFRP-USP) e sua equipe científica; A Prof.^a Dr.^a Ana Lúcia da Costa Darini do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto–SP (FCFRP-USP) e sua equipe científica;

Aos técnicos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto–SP (FCFRP-USP) Eduardo Tozatto, Luciano Akira Takami e José Orestes Del Ciampo.

Aos técnicos do departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP) pela utilização dos equipamentos de microscopia eletrônica de transmissão (MET).

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado Cota Institucional;

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento de equipamentos e projeto de pesquisa.

"A mínima mudança em quase qualquer lugar é suficiente para mudar todo o resto da história." (Richard Dawkins)

RESUMO

Paziani, M. H. **Caracterização funcional dos genes codificadores de proteínas** *ADP-Ribosylation Factor* **no fungo filamentoso patogênico** *Aspergillus fumigatus*. 2016. 94 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Os fungos filamentosos passam por um crescimento polarizado, desde a germinação ao alongamento das hifas, até formar um complexo micélio. A região apical do crescimento polarizado do fungo apresenta dois tipos diferentes de vesículas, entre elas, as microvesículas. As ADP-ribosylation factors (ARFs), são proteínas monoméricas ligadoras de GTP e pertence ao grupo de proteínas da superfamília Ras. Essas proteínas são divididas em cinco famílias: ARF, RAB, RAN, RAS e RHO que formam um conjunto de sub-sistemas que são responsáveis, entre outras funções, pela regulação do transporte de vesículas no interior da célula fúngica, entre outras funções, como transduções de sinais e regulação do tráfego vesicular na região de crescimento apical, o spitzenkörper. São proteínas de ancoramento e de marcação de vesículas, envolvidas no tráfego, catálise e fusão por meio de sinalização de membrana-alvo para as vesículas de transporte transmembrana. As ARF são importantes para o crescimento das hifas, além de participar da montagem de vesículas por meio de endocitoses, do transporte destas vesículas entre as organelas e na exocitose. Adicionalmente, as ARFs sofrem o processo de Nmiristoilação, uma irreversível lipidação proteica em que o miristato do miristoil CoA é covalentemente ligado a uma glicina secundária da proteína alvo, aumentando a sua hidrofobicidade. Além desta regulação, as ARFs são moduladas pela ação das ARF-GAP (GTPase Activating Protein) e ARF-GEFs (Guanine nucleotide Exchange Factor). Neste trabalho foi proposta a deleção de três ARFs preditivamente miristoiladas (arfA, arfB and arlA), além de dupla-deleção com $\Delta gcsA$ (ARF-GAP) e a caracterização genotípica e fenotípica das ADP ribosylation fator no fungo filamentoso patogênico Aspergillus fumigatus. Como caracterização das linhagens deletadas, notou-se que arfA demonstra ser essencial para A. fumigatus, enquanto que o fungo foi capaz de se desenvolver na ausência de arfB, arlA e duplo mutantes com $\Delta gcsA$. Porém, de forma alternada nas linhagens mutantes, houve redução do diâmetro da colônia, desestruturação de conidióforos, polarização dicotômica e redução de corpos lipídicos na região de crescimento apical. Além das alterações da parede celular que implicou em altações na carga de superfície, formação de biofilme e virulência. Testes de sensibilidades, bem como as análises de níveis de expressão gênica frente a a compostos danosos a eucariotos e antifúngicos evidenciaram que as ARFs e GcsA estão envolvidas em reparos a danos frente a diferentes alvos citoplasmáticos. Ainda, a localização das ARFs fusionadas com GFP (Green Flourescence Protein) em A. fumigatus evidenciou que ArfB está nas regiões apicais das hifas e conidióforos, enquanto ArlA está distribuído em todo citoplasma. Portanto as ARFs em A. fumigatus estão envolvidas nos processos básicos do fungo, como: o crescimento, a virulência e a reprodução.

Palavras-chaves: *Aspergillus fumigatus*, pequenas proteínas G, *ADP ribosylation fator*, crescimento apical, endocitose, exocitose, parede celular.

ABSTRACT

Paziani, M. H. Functional characterization of the genes which encodes ADP-Ribosylation Factor protein of the pathogenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. 2016. 94 p. Thesis (Master's degree). School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirao Preto - University of Sao Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

The filamentous fungi undergo polarized growth, from germination to hyphae elongation, to form a mycelial complex. The apical region of the polarized growth of the fungus presents two different types of vesicles, among them, the microvesicles. ADP-ribosylation factors (ARFs) are monomeric GTP-binding proteins and belong to a group of superfamily Ras proteins. These proteins are divided into five families: ARF, RAB, RAN, RAS and RHO that form a set of subsystems that are responsible, over others things, for the regulation of vesicle transport within the fungal cell, among other functions, such as signal transduction and regulation of the vesicular traffic in the apical growth region, the Spitzenkörper. They are anchoring and vesicle marking proteins involved in trafficking, catalysis and fusion by means of target membrane signaling to the transmembrane transport vesicles. ARFs are important for the growth of hyphae, besides participating in vesicle assembly through endocytosis, the transport of these vesicles between the organelles and exocytosis. In addition, the ARFs undergo the Nmyristoylation process, an irreversible protein lipidation in which the myristoyl CoA myristate is covalently linked to a secondary glycine of the target protein, increasing its hydrophobicity. In addition to this regulation, the Arfs are modulated by the action of Arf-GAP (GTPase Activating Protein) and ARF-GEFs (Guanine nucleotide Exchange Factor). In this work, the deletion of three myristoylated ARFs (arfA, arfB and arlA), as well as double-deletion with $\Delta gcsA$ (ARF-GAP) and phenotypic and genotypic characterization of ADP ribosylation fator in the pathogenic fungus Aspergillus fumigatus was proposed. As a characterization of the deleted strains, arfA shown to be essential for A. fumigatus, whereas the fungus was able to develop in the absence of arfB, arlA and double mutants with $\Delta gcsA$. However, in the mutant strains, there was a decrease in colony diameter, deconjugation of conidiophores, dichotomous polarization and reduction of lipid bodies in the apical growth region. In addition, cell wall changes were registered that implied in surface charge elevations, biofilm formation and virulence. In tests of sensitivities, as well as the analysis of levels of gene expression against compounds harmful to eukaryotes and antifungals showed that ARFs and GcsA (Arf-GAP) are involved in damage repair against different cytoplasmic targets. Furthermore, the location of the GFP-fused GFPs (Green Flourescence Protein) in A. fumigatus evidenced that ArfB is in the apical regions of the hyphae and conidiophores, while ArlA is diffuse in every cytoplasm. Therefore, the ARFs in A. fumigatus are involved in the basic processes of the fungus, such as growth, virulence and reproduction.

Key words: *Aspergillus fumigatus*, small G protein, *ADP ribosylation fator*, vesicular transport, apical growth, endocytosis, exocytosis, cell wall.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Esquema de ativação e inativação das pequenas proteínas G. Molecular Biology
of the Cell. 4ª ed. 2002. GAP, GTPase Activating Protein; GEF, Guanine nucleotide exchange
factor; GTP, guanosine triphosphate; GDP, guanosine diphosphate; Pi, phosphate1
Figura 02 - Interação de Arl1p com o complexo Gea2 (ARF-GEF) e Drs2 (flipase).
Interações estimulando a translocação da trans-Golgi Network e o reconhecimento da Imh1
para a promoção do trafego vesicular de Gas1 para o citoplasma em S. cerevisiae (Graham,
2013)
Figura 03 – Esquema do centro de regulação da endocitose e exocitose em fungos
filamentosos. Adaptado de Fisher- Parton <i>et al.</i> (2000)5
Figura 04 - Conidióforo de Aspergillus fumigatus. Adaptado de Alkhayyat et al., 20157
Figura 05 - pRS426. Representação esquemática do vetor pRS426 utilizado no protocolo de
fusão por recombinação homologa in vivo em S. cerevisiae para a construção dos cassetes de
deleção de arfA, arfB e arlA e de fusão com GFP
(http://biovector.axybio.com/uploads/vector/pRS426.png)
Figura 06 - Construção do cassete de deleção. Representação esquemática dos fragmentos
amplificados por PCR para a construção do cassete de deleção e a recombinação homóloga in
vivo. UTR, untranslated region
Figura 07 - Construção dos cassetes arf::GFP. Representação esquemática dos fragmentos
amplificados por PCR para a construção do cassete de fusão arfA::GFP, arfB::GFP e arlA::GFP
e a recombinação homóloga in vivo. UTR, untranslated region
Figura 08 - Teste de sensibilidade por diluição em ágar pela técnica drop out.
Representação do esquema de distribuição das linhagens testadas e as respectivas concentrações
em placa de Petri 150 x 15 mm
Figura 09 - Biossíntese de pirimidinas – Metabolismo de nucleotídeos. O gene pyrG
expressa a enzima orotilato descarboxilase (OMP decarboxylase) que converte OMP (orotilato)
a UMP (uracil monofosfato). Imagem adaptada de (Michels <i>et al.</i> , 2000)
Figura 10 - Alinhamento da sequência de aminoácidos das ARFs de A. fumigatus, A.
nidulans e S. cerevisiae. O quadrado vermelho indica o motivo de miristoilação (Met-Gly-x-
x-x-Ser/Thr). A seta azul indica sitio de ligação do GTP e a seta verde indica sítio de hidrólise
do GTP (informações retiradas de Lee e Shaw, 2008). ArfA*Afu1g11730,
ArfB*AFUA_3G1280 e ArlA*AFUA_2G10980 representa ArfA, ArfB e ArlA de A.
fumigatus. ArfA*AN1126.2, ArfB*AN5020.2 e ArlA*AN5912.2 representa ArfA, ArfB e

 Figura 22 - Conidióforos das linhagens *AarfB*, *AgcsA* e *AarfBAgcsA* em 24 h, 48 h e 72 h de incubação. Microcultivo em meio de cultura YAG e incubação a 37°C. Microscopia de campo claro (aumento: 1000X) corado com azul de lactofenol. Barra de escalas, 10 µm.50 Figura 23 - Conidióforos das linhagens *AarlA*, *AgcsA* e *AarlAAgcsA* em 24 h, 48 h e 72 h de incubação. Microcultico em meio de cultura YAG e incubação a 37°C. Microscopia de campo claro (aumento: 1000X) corado com azul de lactofenol. Barra de escalas, 10 µm.51 Figura 24 – Tubo germinativo dos conídios das linhagens CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$ e mutantes. Conídios das linhagens $\Delta arfB1$, $\Delta arfB2$, $\Delta arlA2$, $\Delta arlA3$, $\Delta gcsA$, $\Delta gcsA\Delta arfB1$, $\Delta gcsA\Delta arfB2$, $\Delta gcsA\Delta arlA2$, $\Delta gcsA\Delta arlA3$ e CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$ de A. fumigatus foram inoculados em meio de cultura YG e incubados a 37°C por 2, 4, 6, e 8 h. Microscopia de campo claro (aumento de Figura 25 - Taxa de emissão do tubo germinativo (%) das linhagens arfB deletadas e duplo mutantes. Conídios das linhagens $\Delta arfB1$, $\Delta arfB2$, arfB::GFP3, arfB::GFP4, $\Delta gcsA70$, $\Delta gcsA\Delta arfB1$, $\Delta gcsA\Delta arfB2$, e CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$ de A. fumigatus foram inoculados em meio de cultura YG e incubados a 37°C por 2, 4, 6, e 8 h. (100 X). Microscopia de campo claro (aumento de 1000 X). Foram contadas 100 células para cada condição em cada réplica

Figura 29 – Teste de sensibilidade com higromicina B pela técnica *drop out*. Efeito do íon tóxico higromicina B (0,1 mg/mL) e a recuperação do mesmo pela adição de KCl (1 mM).Linhagens $\Delta arfB1$, $\Delta arfB2$, $\Delta gcsA70$, $\Delta gcsA\Delta arfB1$, $\Delta gcsA\Delta arfB2$ e a linhagem

selvagem CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$ em meio de cultura YAG a 37°C após 48 h de incubação. Os inóculos foram 5 µL das concentrações 1 x 10⁸, 1 x 10⁷, 1 x 10⁶, 1 x 10⁵ e 1 x 10⁴ conídios/mL. C, controle sem droga; Hig, higromicina B; Hig+KCl, higromicina B mais cloreto de potássio.

Figura 35 - Teste de sensibilidade da linhagem $\Delta arfB$ deletados, duplo mutantes e complementados. Efeito das drogas testadas frente as linhagens $\Delta arfB1$, $\Delta arfB2$, $\Delta gcsA70$, $\Delta gcsA\Delta arfB1$, $\Delta gcsA\Delta arfB2$ e a linhagem selvagem CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$ em meio de cultura YAG a 37°C após 48 h de incubação. Os inóculos foram 5 µL das concentrações 1 x 10⁸, 1 x 10⁷, 1 x 10⁶, 1 x 10⁵ e 1 x 10⁴ conídios/mL. . C, controle; ITR, itraconazol; ANI, anidulafungina; CR, *congo red*; MEN, menadiona; CW, *calcofluor white*; CAS, caspofungina; LOV, lovastatina; FIT, fitoesfingosina; FAR, farnesol; 5FC, 5-flucitosina; MIR, miriocina; BRE, brefeldin A. 62

Figura 40 – Microcopia de fluorescência de GFP. Linhagem controle negativo CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$, *arfB*::GFP1 e *arlA*::GFP1. DIC, Campo claro; GFP (*green fluorescence protein*), campo de fluorescência filtro GFP; MERGE, sobreposição do campo claro e f67 Figura 41 – Avaliação de expressão gênica relativa dos genes *arfA*, *arfB*, *arlA* e *gcsA* em linhagem de *A. fumigatus* por de RT-qPCR. Controle (sem indução de drogas), brefeldin A (30 µg/mL), calcofluor white (75 µg/mL), congo red (150 µg/mL), voriconazol (500 ng/mL), miriocina (30 µg/mL), menadiona (10 µM), farnesol (20 mM) e 5-flucitocina (300 µg/mL). 68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
×	Vezes
°C	Grau Celsius
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrometro
μΜ	Micromolar
А	Adenina
ABI	Applied Biosystem Institute
С	Citosina
Cm	Centímetro
cm ²	Centímetro quadrado
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico (Desoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxirribonucleotídios
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
Fw	Forward
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
G	Guanina
Н	Hora
Kb	Quilo bases
KCl	Cloreto de potássio
L	Litro
М	Metro
М	Molar
m/v	Relação massa-volume

MES	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
Mg	Miligrama
Min	Minuto
mL	Mililitro
Mm	Milímetro
mM	Milimolar
mV	Milivolt
Ν	Número amostral
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
Ng	Nanograma
Nm	Nanômetro
PCR	Reação em cadeia da polimerase (Polimerase Chain Reaction)
Pb	Pares de bases
PBS	Salina tamponada com tampão fosfato (Phosphate buffered saline)
рН	Potencial de hidrogênio iônico
p/v	Razão peso-volume
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RNA	Ácido ribonucleico (Ribonucleic acid)
RNAse	Ribonuclease
RT-qPCR	Transcriptase reversa – PCR quantitativo
Rpm	Rotação por minuto
Rv	Reverse
Т	Timina
UFC	Unidades formadoras de colônias
USP	Universidade de São Paulo

Χ

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Genótipo das linhagens de A. fumigatus utilizadas no trabalho.18
Tabela 02 - Genótipo das demais linhagens utilizadas no trabalho
Tabela 03 - Primers utilizados neste trabalho 24
Tabela 04 - Drogas utilizadas nos testes de sensibilidade por diluição em ágar pela técnica drop
<i>out</i>
Tabela 05 – Combinação de concentrações dos primers para qPCR para arfA, arfB, arlA, gcsA
e <i>gpdA</i> 37
Tabela 06 - Primers utilizados para qPCR dos genes arfA, arfB, arlA e gcsA37
Tabela 07: Análises de similaridades das proteínas ArfA, ArfB e ArlA em A. fumigatus com
seus respectivos ortólogos em A. nidulans e S. cerevisiae

SUMÁRIO

RESUMO	II
ABSTRACT	II
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	IX
LISTA DE TABELAS	XI
1 - Introdução	1
1.1 - ADP Ribosylation Factor - ARF	1
1.2 - Endocitose e exocitose	4
1.3 - O gênero Aspergillus	6
1.3.1 - O fungo patogênico humano Aspergillus fumigatus	8
1.4 - A parede celular em Aspergillus fumigatus	9
1.5 – Mecanismo de ação de compostos químicos que afetam células eucarióticas	10
2 - Objetivos	16
2.1 - Objetivos gerais	16
2.2 - Objetivos específicos	16
3 - Materiais e Métodos	18
3.1 – Análises in silico dos genes codificadores das proteínas ARF em A. fumigatus	
3.1 - Linhagens	
3.1.1 - Demais linhagens utilizadas	19
3.2 - Isolamento do DNA genômico de Aspergillus sp.	19
3.3 - Construção do cassete de deleção $\Delta arf::pyrG$	19
3.4 - Construção do cassete <i>arf</i> ::GFP	21
3.5 - Extração de DNA de levedura	25
3.6 - Eletrotransformação em <i>E. coli</i>	25
3.7 - Extração DNA plasmideal de <i>E. coli</i>	26
3.8 - Transformação em A. <i>fumigatus</i>	26
3.9 - Caracterização da deleção/fusão por PCR-diagnóstico	27
3.10 - Análise fenotípica das linhagens arf deletadas	27
3.10.1 - Análise macromorfológica	27
3.10.2 - Análise micromorfológica	
3.11 - Teste de germinação dos conídios de A. fumigatus	
3.12 - Coloração de conídios germinados com o corante lipofílico FM4-64	

3.13 - Coloração de conídios germinados com o corante Filipin	
3.14 - Microscopia eletrônica de transmissão dos conídios de A. fumigatus	
3.15 - Análise do perfil de sensibilidade a variações de pH e temperatura	
3.16 - Teste de sensibilidade por diluição em ágar pela técnica drop out	
3.17 - Biomassa de Biofilme	
3.18 - Teste de virulência em Galleria mellonella	
3.19 - Remoção do gene pyrG das linhagens arf deletadas	
3.20 - Microscopia de fluorescência para a Green Fluorescence Protein – GFP	
3.21 - Ensaios para a realização de qPCR.	
3.21.1 - Extração de RNA total	
3.21.2 - Quantificação e verificação da qualidade do RNA total	
3.21.3 - Síntese de DNA complementar (cDNA)	
3.22 - PCR quantitativo (qPCR)	
3.23 – Potencial Zeta	
3.24 - Análise estatística	
4 – Resultados	41
4.1 - Análises in silico das proteínas ARFs	41
4.2 - Deleção dos genes arfA, arfB e arlA em A. fumigatus	43
4.3 - Caracterização macromorfológica das linhagens arf deletadas	47
4.4 - Caracterização micromorfológica das linhagens $\Delta arfB$ e $\Delta arlA$	49
4.5 - Teste de germinação dos conídios das linhagens deletadas arfB e arlA	51
4.6 - Microscopia confocal	53
4.6.1 - FM4-64	53
4.6.1.1 - Potencial Zeta	55
4.6.1.2 – Higromicina B	55
4.6.2 - Filipin	57
4.7 - Microscopia Eletrônica de Transmissão	58
4.8 - Análise do perfil de sensibilidade a variações de pH e temperatura	
4.9 - Teste de sensibilidade por diluição em ágar pela técnica drop out	60
4.9.1 - Teste de sensibilidade a compostos químicos que afetam células eucarióti	cas com
linhagens <i>arfB</i> deletados e duplo-mutantes	60
4.9.2 - Teste de sensibilidade a compostos químicos que afetam células eucariótica	as com a
linhagem <i>AarlA</i>	61
4.10 - Biofilme	64

4.11 - Teste de virulência em Galleria mellonella	65
4.12. Localização da proteína ArfB e ArlA em A. fumigatus	66
4.13 - Avaliação da expressão dos genes arfA, arfB, arlA e gcsA por RT-qPCR	67
5 - Discussão	70
6 – Conclusão	78
7 - Referências bibliográficas	80
APÊNDICE - A	92



1 - Introdução

1.1 - ADP Ribosylation Factor - ARF

As *ADP-ribosylation factors* (ARFs) são pequenas proteínas G que apresentam atividade GTPases e pertencem a superfamília Ras, a qual é composta pelas cinco subfamílias ARF, RAB, RAN, RAS e RHO (Wenneberg *et al.*, 2005). Essas proteínas são enzimas de aproximadamente 21 kDa que hidrolisam *Guanosine triphosphate* (GTP) a *Guanosine diphosphate* (GDP) (figura 1), a qual é essencial no controle de importantes processos celulares (Wittinghofer *et al.*, 2011). A função GTPase da ARF é modulada pelas proteínas ARF-*Activating Protein* (GAP) que fica em sua forma GDP ligada, enquanto que a ARF-*Guanine nucleotide Exchange Factor* (GEF) estimula a dissociação de GDP para que haja a ligação da ARF com GTP (Cherfils *et al.*, 2013) (figura 1).



Figura 01 - Esquema de ativação e inativação das pequenas proteínas G. *Molecular Biology of the Cell.* 4^a ed. 2002. GAP, *GTPase Activating Protein*; GEF, *Guanine nucleotide exchange factor*; GTP, *guanosine triphosphate*; GDP, *guanosine diphosphate*; Pi, *phosphate*.

No fungo leveduriforme *Saccharomyces cerevisiae* existem seis ARFs, Arf1p, Arf2p, Arf3p, Arl1, Sar1p e Arl3p. ScArl1 envolvidas no brotamento da levedura, sendo que Arf3p participa intimamente da polarização e processos de endocitoses (Huang *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2005). A deleção de *arf1p* ou *arf2p* mostrou-se viável, enquanto a deleção de ambos os genes em uma única linhagem mostrou-se inviável (Lee *et. al.*, 2008). No fungo filamentoso *Aspergillus nidulans* há relatos de seis ARFs, sendo que, ArfA, ArfB e ArlA são preditamente submetidas a lipidação protéica, ou seja, a partir da catálise de N-miristoiltranferase, estas proteínas são ligadas a ácidos graxos de 14 carbonos. Este processo biológico é conhecido como N-miristoilação (Lee e Shaw, 2007). O mesmo autor aponta, ainda, que ArfA é essencial para *A. nidulans*.

Tsai e colaboradores (2013) reportam que proteinas ARF-*like* em *S. cerevisiae* são importantes para o tráfego de vesículas no complexo de Golgi. Na sua forma ativa, estas proteínas estimulam a formação de vesículas por meio da ativação em cascata das flipases. As flipases, por sua vez, tem função de curvatura de membrana para dar início a formação das vesículas no *trans*-Golgi *Network*. O mesmo autor, ainda, evidencia a importância do complexo Gea2p (ARF-GEFs) e Arl1p (ortólogo de ArlA em *A. fumigatus*) na ativação direta das flipases, além da importância de Arl1p-ativada na modulação espacial e na organização simétrica da *trans*-Golgi *Network*. A formação desse complexo trimérico Gea2p, Arl1p e flipase sinaliza a localização de *trans*-Golgi *Network* para Imh1(figura 2). Imh1 são proteínas que contém um domínio de localização no complexo de Golgi (GRIP) que interage com a Arl1p para localizar a *trans*-Golgi *Network*. Assim, Arl1 está envolvida no transporte vesicular propriamente dito entre o compartimento endossomal e o Golgi (Graham, 2013).

A proteína Arf-*like* também apresentou relações diretas com a regulação de potencial de membrana. A geração e manutenção do potencial de membrana são críticos para todas as células. Esta propriedade permite a absorção de nutrientes, eliminação de resíduos, geração de energia celular, e comunicação celular em organismos multicelulares. Este processo é altamente regulado, permitindo as células responder rapidamente e de modo eficaz às mudanças no meio ambiente que afeta o potencial de membrana. Em *S. cerevisiae*, o potencial de membrana é determinado, principalmente, por efluxo de prótons através da H⁺-ATPase, codificada pelo PMA1 (gene essencial para esta levedura) e o influxo de K⁺ através das proteínas Trk, codificadas pela TRK1 e TRK2 (Serrano, 1996). A proteína Arl1p é um componente importante na regulação da homeostasia de K⁺, portanto, atua intimamente nos processos do potencial de membrana (Munson *et al.*, 2003).

A determinação da carga superficial de células de microrganismos regula as interações em diversas superfícies ambientais. A fim de determinar a carga superficial, pode-se utilizar o potencial Zeta, que se trata de uma técnica de espalhamento de luz eletroforético (Wilson *et al.*, 2001).



Figura 02 - Interação de Arl1p com o complexo Gea2 (ARF-GEF) e Drs2 (flipase). Interações estimulando a translocação da *trans*-Golgi *Network* e o reconhecimento da Imh1 para a promoção do trafego vesicular de Gas1 para o citoplasma em *S. cerevisiae* (Graham, 2013).

Profilinas são proteínas ligadoras de actinas, codificadas em *S. cerevisiae* pelo gene *pfy1*, auxiliam na formação dos cabos de actinas que acompanham a morfogênese, crescimento temporal e espacial da célula em eucariotos. Os genes *las17* e *vrp1* em *S. cerevisiae* codificam proteínas importantes para polarização e brotamento cortical. Na ausência de genes *pfy1*, *las17* e *vrp1* o gene *arf3* foi altamente expresso. O que indica a participação de Arf3 em *S. cerevisiae* nos processos de polarização, brotamento e estruturação por filamentos de actina (Lambert *et al.*, 2007).

Proteínas que apresentam resíduo de glicina na região N-terminal, assim como as ARFs, podem ser submetidas à ação catalítica pela N-miristoiltranferase (NMT), cuja ação biológica é modificar a região N-terminal com uma molécula de miristoil ligada a uma coenzima A (Charron *et al.*, 2009). A lipidação proteica é dada a partir de ligações covalentes entre uma vasta variedade de ácidos graxos em diferentes resíduos animo-terminais, sendo os mais comuns a N – miristoilação e a S – palmitoilação (Rothman, 2006). A N-miristoilação compreende a adição de um miristato, ou seja, ácido graxo de 14 carbonos em resíduo de glicina na região N-terminal, enquanto a S – palmitoilação consiste na adição de um palmitato, ou seja, ácido graxo de 16 carbonos em resíduo de serina na região N-terminal (Hang e Linder, 2011). Em todos os casos, a alterações pós-traducionais. Outra forma de lipidação proteica é na região C – terminal, porém neste caso a ligação do ácido graxo é feita após a tradução completa da proteína. Em ambas as situações, a lipidação proteica é importante para o direcionamento das proteínas submetidas a esta modificação para a membrana ou demais compartimentos lipofílicos, além de promover interações entre proteínas (Rech, 2006). Assim, estudos

desenvolvem estratégias para inibir a ação da NMT em patógenos, a fim de inviabilizar a ação das proteínas que dependem dessa ação catalítica (Tate, 2013).

Em *S. cerevisiae*, Arf1p e Arf2p, redundantes entre si e ortólogos de ArfA de *A. fumigatus*, estão envolvidas na secreção de vesículas. Em *A. nidulans*, ArfA é homólogo a Arf1p and Arf2p em *S. cerevisiae* com 75% de similaridade nas sequências de aminoácidos. Os mesmos autores apontaram que ArfA se localiza no *locus* celulare correspondente ao complexo de Golgi e participa, ainda, na via de exocitose. No fungo filamentoso *A. fumigatus*, a proteína ArfB é ortóloga a Arf3 em *S. cerevisiae*. Na levedura, a referida proteína está envolvida na polarização e na via de endocitoses (Huang *et. al.*, 2003).

1.2 - Endocitose e exocitose

Nos processos de crescimento celular e na diferenciação em eucariotos, o tráfego vesicular está intimamente envolvido na dinâmica da endocitose, exocitose e, subsequente, no preciso crescimento das hifas em fungos filamentosos (Fisher-Parton *et al.*, 2000).

A endocitose é um fenômeno natural, capaz de internalizar macromoléculas do meio extracelular para o citoplasma após estímulos desses ligantes a receptores da membrana plasmática, bem como as proteínas G. É um movimento celular classificado como rápido por levar menos de 30 minutos para ocorrer e não há decréscimo de membrana plasmática durante a formação do endossoma (Karp, 2005). Após a formação do endossoma, este pode se fusionar com outros endossomas e originar um vacúolo, a fim de armazenar substâncias, ou até mesmo se dirigir ao retículo endoplasmático e *Spitzenkörper*. Este último pode ser encontrado na sua forma apical ou satélite, a qual pode haver endo ou exocitose, em fungos filamentosos (Fisher-Parton *et al.*, 2000) (figura 3).

O Spitzenkörper é o centro de controle do crescimento apical em fungos filamentosos formado por aglomerados de vesículas. Em análises de microscopia eletrônica foi possível observar que no centro de controle do crescimento apical há vesículas apicais (79-90 nm) e microvesículas (30-40 nm) que transportam, para a extremidade da hifa, componentes de membrana e parede celular. (Lee e Shaw, 2008). Tais vesículas são revestidas por proteínas e guiadas por estruturas tubulares, como filamentos de actinas, para direcionar, ordenar e otimizar o tráfego (Altan-Bonnet *et al.*, 2004). Assim, as ARFs são consideradas as principais proteínas responsáveis pela regulação de montagem e de transporte de vesículas, além da íntima participação nos processos de endocitose (Graham, 2013). É importante salientar que a desregulação das GTPases em células de mamíferos é associada a inúmeras doenças em

humanos como câncer, doença neurodegenerativa, desordens inflamatórias e desordens genéticas (Mattingly, 2013).

Outros vacúolos ou vesículas se fundem à membrana no momento da exocitose, que compreende a passagem de macromoléculas do meio intra para o extracelular e a fusão dessas vesículas a membrana plasmática, a fim de substituir os lipídios utilizados para a formação do endossoma (Karp, 3ª ed., 2005).



Figura 03 – Esquema do centro de regulação da endocitose e exocitose em fungos filamentosos. Adaptado de Fisher- Parton *et al.* (2000).

Como um processo biológico, a exocitose é crucial para o crescimento celular, comunicação célula-célula, e o estabelecimento do crescimento polar. As mais diversas pequenas proteínas G de fungos filamentosos estão envolvidas no processo de montagem e transporte vesicular, o que implica diretamente na morfogênese e patogenicidade fúngica. Um complexo multiproteico (Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70 e Exo84), além de interações com Rho-GTPases (Rho1, Rho3, bem como Sec4, Rab4 em leveduras e *A. nidulans*) se encontram na face citosólica das vesículas e medeiam a segmentação de vesículas pós-Golgi e na fusão na membrana plasmática para exocitose (Hsu *et al.*, 2004). Portanto, estudos envolvendo a função das proteínas ARFs em *A. fumigatus* são importantes para corroborar com as funções descritas destas em outros organismos.

1.3 - O gênero Aspergillus

O gênero *Aspergillus* abriga aproximadamente, 200 espécies (Hubka *et al.*, 2013) sendo o mais diverso entre os fungos (Galagan *et al.* 2005). Entre as espécies até hoje descritas, menos de 20 podem provocar doenças em humanos (Dagenais e Keller, 2009). Acredita-se que este gênero surgiu há 200 milhões de anos e não possui restrições de crescimento frente a condições adversas do meio. Na natureza, os representantes deste gênero crescem e se reproduzem em substrato sólido e os esporos liberados pela ação dos ventos podem ser provenientes de reprodução assexuada ou sexuada, este último pela anastomose realizada entre conídios ou hifas adjacentes (Roca *et al.* 2003, Roca *et al.* 2005a, Roca *et al.* 2005b). Quando a germinação ocorre em meio líquido, os micélios crescem submersos ou formando micro-colônias, porém Vecht-Lifshitz e colaboradores (1990) apontam que alterações na morfologia entre colônias resultam em variações na produção de enzimas e demais metabólitos.

O desenvolvimento vegetativo de *Aspergillus* sp. é iniciado pela quebra da dormência dos conídios por estímulos do meio ambiente, bem como, a presença de água, ar ou combinações destes com sais inorgânicos, aminoácidos ou açúcares (Osherov e May, 2001). Após, os conídios aumentam de diâmetro duas vezes mais e posteriormente iniciam o crescimento polarizado ou isotropicamente entre 2 e 6 h de incubação a 25°C (Leeuwen *et al.* 2013). Durante a terceira fase, o germinante já tem estabelecido o tubo germinativo e a maquinaria citoplasmática é intensificada na região apical para investir no crescimento da hifa (Harris e Momany 2004). Podem crescer em um largo intervalo de temperaturas (variando de 6°C a 55°C) (Williams e Hallsworth 2009). São caracterizados por apresentarem micélios bem desenvolvidos compostos por hifas septadas e com a presença de um poro central simples, que permite a circulação de organelas citosólicas e moléculas entre as células da hifa. O poro central pode ser fechado pelos corpúsculos de Woronin, que são organelas arredondadas de matrizes densas e cristalinas próximas aos poros (Walther e Wendland, 2003).

Após o crescimento vegetativo, as colônias são estimuladas pelo ar, e inicia-se o processo de desenvolvimento das hastes que são as hifas aéreas (Adams *et al.* 1998). Esta haste se diferencia em conidióforo até chegar na altura máxima, após, inicia-se a reprodução assexual que é o processo da formação e diferenciação das células que compõem o conidióforo (vesícula, fiálides e conídios) (figura 4). Em colônias cujas condições de crescimento são normais, um único conidióforo tem potencial para produzir até 10.000 conídios (Krijgsheld, 2012). Na maioria das espécies de *Aspergillus*, bem como *A. nidulans*, as primeiras hifas se formam nas primeiras 10 h de incubação a 37°C e em meio completo. As hifas aéreas aparecem após 20 h

de incubação, nas mesmas condições. Esta produção de conidióforos inicia do centro da colônia para as bordas (Adams *et al.* 1998). Os mecanismos de regulação da conidiogênese em *A. fumigatus* são similares a *A. niger* e *A. nidulans*. Em análises de *Microarray*, 34 de 100 genes estudados foram altamente expressos a partir do início da produção de hifas aéreas (Bleichrodt *et al.*, 2013).

Os conídios de *Aspergillus* não germinam no conidióforo, pois estas células estão em estado dormente, apenas germinam quando o ambiente oferece condições favoráveis para o seu crescimento. Durante a dormência, os conídios podem sofrer estresse frente a radiação UV, seca e altas temperaturas, pois estas células neste estágio específico, são mais resistentes (Krijgsheld, 2012).

Além da reprodução assexuada, estudos mostram, a partir de análises de sequenciamento, que todas as espécies do gênero *Aspergillus* são capazes de realizar reprodução sexuada (Dyer e Paoletti 2005). *A. nidulans, A. flavus, A. parasiticus, A. nominus* e *A. fumigatus* já foram associados a estágios de reprodução sexuada, porém este último em menos frequência, quando comparado com *A. nidulans* (Krijgsheld, 2012). Espécies de *Aspergillus* podem ser classificadas quanto a reprodução sexuada, como homotálica (podem reproduzir-se sexuadamente por si só, sem a participação de outro micélio da mesma espécie) ou heterotálica (reproduz sexuadamente com a participação obrigatória de outro micélio da mesma espécie) (Horn *et al.*, 2009a, O'Gorman *et al.*, 2009). O resultado da troca de material genético por reprodução sexuada resulta na formação de um corpo de frutificação, cujo tamanho varia entre 125–200 µm chamado cleistotécio. A formação do cleistotécio leva em torno de 96 h e tem potencial para gerar 10.000 ascosporos com variabilidades genéticas dentro de cada corpo de frutificação (Krijgsheld, 2012).



Figura 04 - Conidióforo de Aspergillus fumigatus. Adaptado de Alkhayyat et al., 2015.

1.3.1 - O fungo patogênico humano Aspergillus fumigatus

Aspergillus fumigatus pertence ao filo Ascomycotina, ordem Eurotiales e família Thichocomaceae. Este desempenha um papel importante na natureza, na ciclagem de carbono e nitrogênio a partir da sua capacidade de degradação de biomassas (Verweij et al., 2016). Esta espécie é o agente etiológico mais comum causador de aspergilose humana, seguido de A. flavus, A. terreus, A. niger e A. nidulans. A espécie A. fumigatus é responsável por causar uma grande variedade de doenças em humanos, caracterizado pelo difícil tratamento. Esta característica é decorrente da versatilidade bioquímica do fungo e pelas mudanças genéticas frente a capacidade de gerar mutações espontâneas ou reprodução sexual. Caracterizado por ser saprofítico oportunista, este fungo é capaz de causar Aspergilose Broncopulmonar Alérgica, Aspergiloma e Aspergilose Pulmonar Invasiva (API), entre outros. Em todo o mundo a API representa risco à saúde de pacientes hospitalizados onde o principal grupo de risco são os pacientes imunocomprometidos, transplantados aqueles recebendo ou terapia imunossupressora (Nucci et al., 2005). A API é a forma de infecção mais grave podendo ser fatal a pacientes com a imunidade previamente comprometida, podendo chegar a 90% de morte (Chauhan et al., 2006). Fang et al. (2015) estima que mais de 200.000 pessoas são acometidas por API em todo o mundo por ano.

Este organismo patogênico oportunista é adquirido pelo hospedeiro após a inalação dos conídios, os quais estão distribuídos no meio ambiente e são suficientemente pequenos para alcançar as vias aéreas do hospedeiro. Após a inalação dos conídios pelo hospedeiro, o fungo se estabelece nos alvéolos formando, assim, o micélio (Chauhan et al. 2006). Para indivíduos saudáveis (imunocompetentes) os conídios são eliminados pelo sistema de defesa presente nos pulmões antes de germinar em hifas e estabelecer um foco de infecção no pulmão (Maschmeyer et al., 2007). A partir da ação de fagócitos alveolares, como o macrófago, os conídios são eliminados por produção de espécies reativas de oxigênio. O conhecimento da composição, da arquitetura e dos mecanismos biossintéticos, bem como o perfil da expressão gênica do fungo A. fumigatus são importantes informações para entender a API e assim levar à determinação de novos alvos terapêuticos para o tratamento antifúngico. Atualmente, drogas antifúngicas disponíveis para tais infecções atingem três alvos moleculares preferenciais: ergosterol (azólicos, alilaminas e poliênicos), síntese de DNA (análogos de ácido nucléico) e parede celular (equinocandinas) (Carrilo-Muñoz et al., 2006). O tratamento de infecções fúngicas invasivas continua sendo um grande desafio, devido ao limitado número de drogas antifúngicas como os polienos, tipo de classe antifúngica que tem como exemplo a anfotericina B. Outra classe de antifúngicos importantes são os azoles, que incluem o fluconazol, o itraconazol e o voriconazol (Batista *et al.*, 2013), além das equinocandinas, como exemplo as Caspofungina, Anidulafungina e Micafungina (Bowman *et al.*, 2002). Tais drogas são usadas em terapias para combater aspergiloses, porém tem espectro de ação limitada e alta toxicidade para o hospedeiro, o que impede o aumento da dose. Drogas que visam novos alvos são, portanto, necessários para aumentar as opções de quimioterapia e para prevenir, isoladamente ou em combinação, o aparecimento de resistência às drogas (Carrilo-Muñoz *et al.*, 2006).

1.4 - A parede celular em Aspergillus fumigatus

A correta construção e composição da parede celular é fundamental para a morfogênese e estruturação da célula fúngica. Em fungos patogênicos, a integridade da parede celular auxilia nos processos de invasão e defesa contra o sistema imune hospedeiro (Latge et al., 2014) e passa por uma série de remodelamentos durante o crescimento e desenvolvimento celular (Adams, 2004). Na parede celular pode-se encontrar uma série de proteínas capazes de identificar alterações do meio ambiente. A integridade da parede celular fúngica garante a adesão célula-célula, formação de biofilme, patogenicidade e virulência (Doering, 2009). Nas mais diversas espécies de fungos, as paredes celulares são majoritariamente compostas por glucanas, quitinas, quitosana, mananas, galactomananas e glicoproteínas. Entre as glucanas na parede celular fúngica, destacam-se as β (1,3); β (1,3) com β (1,4); β (1,6) e α (1,3)-glucanas, todas sintetizadas por enzimas glucano-sintases. As quitinas são sintetizadas no citoplasma e, subsequentemente, dão origem a um filamento que transpassa a membrana plasmática e a parede celular (Free, 2013). Há muitas glicoproteínas que participam da formação e estruturação da parede celular fúngica. Como visto em Saccharomyces cerevisiae, Candida albicans, Aspergillus fumigatus, Neurospora crassa and Schizosaccharomyces pombe, tais proteínas ainda desempenham funções relacionadas a vias de sensoriamento, adesão, aquisição de ferro e detoxificação de estresse oxidativo (Free, 2013).

Em *A. fumigatus*, especificamente, encontra-se em maior quantidade na parede celular a $\beta(1,3)$; $\beta(1,3)$ com $\beta(1,4)$ glucanas e quitinas. Este último é encontrado em maior abundância e $\beta(1,3)$ com $\beta(1,4)$ glucanas é tratado como específico para a parede celular em *A. fumigatus*. Ainda nesta espécie, o núcleo central da parede celular é a ramificação $\beta(1,3)$ e $\beta(1,6)$ glucano que está ligada a quitina por intermédio de uma ligação $\beta(1,4)$. Este núcleo central é covalentemente ligado a galactomananas que são estruturas ramificadas compostas de uma manana linear, com várias repetições de uma unidade oligossacarídica de manose e uma cadeia

curta do resíduo β (1,5) galactofuranose. A quitina é um homopolímero de N-acetilglicosamina conjugadas por ligações β (1,4), importante para a formação da parede celular e septos. Além de ser encontrado em maior abundância na parede celular de *A. fumigatus* (Latgé *et al.*, 1994; Latgé *et al.*, 2014).

Em *S. cerevisiae* as pequenas proteínas G Rho1p, Rho2p e Rho5p estão ligadas diretamente à manutenção da integridade da parede celular, sendo a Rho1p o início da cascata de ativação da β (1,3) glucano sintase, formação de citoesqueleto e crescimento polarizado (Levin, 2011). Em *A. fumigatus rho1* é um gene essencial e está intimamente relacionado a reparos de parede celular. As proteínas Rho1 atuam no complexo β (1,3) glucano sintase, no crescimento apical das hifas e, assim como em *Aspergillus niger*, as Rho GTPases são altamente expressas frente a danos na parede celular (Dichtl, 2016).

1.5 – Mecanismo de ação de compostos químicos que afetam células eucarióticas

A anfotericina B é um antibiótico macrocíclico poliênico de atividade antifúngica. Este se liga ao ergosterol na membrana plasmática das células fúngicas, causando um desarranjo e formando poros ou canais que alteram a permeabilidade celular. Os poros ou canais formados permitem o extravasamento do conteúdo intracelular, havendo perda de pequenas moléculas (Goodman e Gilman, 2012).

Os antifúngicos azólicos inibem a ação da enzima microssômica 14- α -esteroldemetilase, enzima do citocromo P450 (CYP). Consequentemente, a biossíntese de ergosterol é comprometida havendo acúmulo de 14- α -metilesteróis, o que causa um desarranjo na membrana plasmática da célula, impedindo o crescimento do fungo. Os azólicos podem ser divididos em duas subclasses: os imidazóis (cetoconazol, miconazol, tioconazol) e os triazóis (fluconazol, itraconazol, voriconazol) (Goodman e Gilman, 2012).

Cerulenina é um antifúngico capaz de inibir síntese de ácidos graxos e biossíntese de esteroides (Parrish *et al.*, 1999).

Fitoesfingosina é um intermediário da biossíntese de esfingolipídios nos fungos com capacidade de inibir um precursor de biossíntese de esfingolipídio no retículo endoplasmático a glucana sintase (Goodman e Gilman 12^a ed., 2012).

Miriocina é uma droga que interfere na biossíntese de esfingolipídeos pois se trata de um inibidor específico da enzima pamitoil transferase responsável pela catalisação das primeiras reações para a síntese do esfingolipídeos (Kobayashi *et al.*, 2005). A terbinafina é uma alilamina sintética, uma classe de antifúngicos com amplo espectro fungicida. Assim como

os azólicos, a terbinafina acomete o ergosterol presente na membrana celular do fungo, inibindo a esqualeno epoxidase, enzima chave na biossíntese do ergosterol fúngico, com a consequente morte da célula fúngica (Goodman e Gilman 12^a ed., 2012).

Fluocitocinas são captadas por permeases seletivas para citosina na membrana da célula fúngica, onde é deaminado a 5-fluorouracil. Uma vez na célula, é convertido a 5-fluorouracil-ribose monofosfato e em seguida convertido a 5-fluorouridina trifosfato e incorporado no ácido ribonucleico (RNA) ou convertido a 5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-monofosfato, um potente inibidor da enzima timidilato sintetase. Por consequência, a síntese de DNA é prejudicada (Goodman e Gilman 12^a ed., 2012).

Brefeldin A é amplamente utilizada para estudos sobre transporte de proteínas uma vez que é um metabólito de fungos que inibe o transporte proteico do retículo endoplasmático para a o complexo de Golgi (Tse *et al.* 2007). Pode causar inibição da secreção de proteínas e a exposição prolongada a essa molécula pode causar apoptose em células cancerosas humanas (Shao *et al.*, 1996). O principal alvo do Brefeldin A são proteínas *ADP-Ribosylation factor* (ARF), relacionada ao tráfego de vesículas, incluindo o transporte de proteínas (Randazzo *et al.*, 1993). A proteína ARF é uma GTPase que está na sua conformação ativa quando ligada a GTP (ARF-GTP) e inativa quando ligada a GDP (ARF-GDP). A ativação de ARF se dá por proteínas GEF, da família Sec7, que catalisa a mudança de GDP para GTP. O complexo ARF-GDP-GEF é o sítio de ligação para a BFA, que forma um complexo quaternário impedindo sua ativação para ARF-GTP que é realizada por ARF-GAP (Mossessova *et al.*, 2003).

A equinocandina é a classe de droga antifúngica que compreende produtos naturais, sendo metabólitos secundários de fungos e formados durante a fermentação. Sua atividade biológica é a inibição do complexo enzimático responsável pela síntese de um polissacarídeo estrutural presente na parede celular fúngica, o $1,3-\beta$ (1,3)-D-glucano. Este mecanismo reduz a integridade estrutural da célula fúngica, conferindo instabilidade osmótica e levando à morte celular. A caspofungina e a anidulafungina são drogas pertencentes a esta classe, aprovadas para uso clínico. Apresentam o mesmo mecanismo de ação, diferindo apenas quanto às propriedades farmacológicas (Goodman e Gilman, 12^a ed. 2012).

Congo Red (Vermelho congo) é um corante diazo que se liga ao polissacarídeo quitina, componente da parede celular fúngica. Essa ligação causa um desarranjo na estrutura da parede celular (Herth, 1980).

Farnesol é uma molécula de *quorum-sensing* (QS) produzida por *Candida albicans* e está também presente em muitos óleos essenciais. Possui propriedade indutora de apoptose ou parada no ciclo celular e devido a isso é estudada com interação de células de mamíferos,

principalmente células cancerígenas. O QS inclui muito efeitos, porém o que desperta interesse nos microbiologistas é a presença deste composto no sobrenadante de culturas onde QS é um processo de comunicação celular entre os microrganismos mediado pela densidade populacional (Melnykovych *et al.*, 1992).

1.6 - Modelo alternativo para análises de virulência Galleria mellonella

Para a análise e identificação de fatores de virulência em microrganismos patogênicos, alguns trabalhos utilizam como modelo alternativo os invertebrados, como a ameba de vida livre *Acanthamoeba castellanii*, o nematoide *Caenorhabditis elegans*, o inseto *Drosophila melanogaster* e larva do inseto lepidóptero *Galleria mellonella* (Mylonakis *et al.*, 2005). Modelos vertebrados como os mamíferos são comumente aplicados na análise de virulência de microrganismos patogênicos, porém são de alto custo, com elevado tempo para de manutenção e geração de resultados (Mylonakis *et al.*, 2005).

O uso de insetos como modelos de infecção fornece uma alternativa valiosa. Comparado com outros hospedeiros não vertebrados, tais como os nemátodos, os insetos têm um sistema relativamente avançado de defesas antimicrobianas e são assim mais suscetíveis a produzir informação relevante no processo de infecção, assim como ocorre com os mamíferos (Ramarão *et al.*, 2012). *G. mellonella* possui um complexo sistema imunológico inato semelhante ao dos mamíferos. As células da hemolinfa são capazes de fagocitar ou encapsular invasores microbianos, e as respostas humorais incluem a produção induzível de lisozima e pequenos peptídeos antibacterianos. Além disso, são encontradas analogias entre as células epiteliais do intestino das larvas de insetos e as células intestinais dos mamíferos (Ramarão *et al.*, 2012).

G. mellonella pertence a Ordem Lepidoptera, cujo ciclo compreende o ovo, a larva, a pupa e o adulto que em média dura 10, 30, 15 e 10 dias a 25° C, respectivamente. Portanto, a fase larval é a mais longa durante o ciclo de vida holometábolo. Importante fase para proporcionar seis instares, a fim de garantir a formação de órgãos e preparação para a pupa (Realpe *et al.*, 2007).

No meio ambiente, este inseto é hospedeiro de colmeias escuras e de baixa ventilação, com o objetivo de se beneficiar dos produtos fornecidos por abelhas, como mel e cera. Anualmente, estima-se que apicultores dos Estados Unidos perdem 5 milhões de dólares

devido a infestação de *G. mellonella* que apresentam rápido desenvolvimento e alta produção de ovos do inseto (*Mid-Atlantic Apiculture Research and Extension Consortium* - MAAREC, 2000). Realpe e colaboradores (2007) relatam que 50 pares (25 machos e 25 fêmeas) de *G. mellonella* incubados a 25°C tem potencial de produzir aproximadamente dez mil ovos e o número de produção de ovos aumentam a partir do aumento da densidade populacional. Podendo, assim, chegar a 60 mil ovos se houver aproximadamente 150 pares de *G. mellonella*. Ainda, os mesmos autores estimam que após a ovipostura, 96,5% dos ovos eclodem e chegam a fase adulta.

Para Mylonakis e colaboradores (2007), o modelo alternativo utilizando o sexto instar da larva de *G. mellonella* é de manutenção relativamente fácil e rápida, reduzindo assim a utilização de animais vertebrados para testes com a mesma finalidade. *G. mellonella* esta sendo utilizada em pesquisas com fungos patogênicos, além de existir a possibilidade de avaliar a eficácia de tratamento com diversos antifúngicos.

O fungo filamentoso *A. fumigatus* é clinicamente importante com a capacidade de causar aspergilose invasiva e altas taxas de mortalidade em pacientes imunocomprometidos. Slater e colaboradores (2011) relatam que a virulência de mutantes de *A. fumigatus* tem sido tradicionalmente avaliada utilizando mamíferos. Porém, o modelo de virulência com larvas do sexto instar de *G. mellonella* mostraram alta similaridade com o perfil de virulência em mamífero. Os autores pontuam, ainda, que a triagem de *A. fumigatus* geneticamente modificados são importantes para reduzir significativamente o número de mamíferos necessários para avaliar as alterações no perfil de virulência.


2 - Objetivos

2.1 - Objetivos gerais

O objetivo do presente trabalho é a caracterização fenotípica e funcional dos genes que codificam as proteínas *ADP-ribosylation factors* (ARF) em *A. fumigatus*.

2.2 - Objetivos específicos

(i) Obter e caracterizar macro e micro-morfologicamente as linhagens *arfA*, *arfB* e *arlA* deletadas de *A. fumigatus*;

(ii) Caracterizar o perfil de virulência das linhagens ARF-deletadas no modelo experimental eucarioto alternativo *Galleria mellonella*;

(iii) Caracterizar o perfil de sensibilidade das linhagens ARF-deletadas na presença de diferentes drogas (antifúngicos, estresse oxidativo, dano a parede e membrana celular fúngica, entre outras);

(iv) Caracterizar o nível de expressão gênica dos genes, *arfA*, *arfB* e *arlA* frente a diferentes classes de drogas antifúngicas;

(v) Localizar as proteínas ArfA, ArfB e ArlA marcadas com GFP na célula de A. fumigatus.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 - Materiais e Métodos

3.1 – Análises in silico dos genes codificadores das proteínas ARF em A. fumigatus

A busca das proteínas ArfA, ArfB e ArlA de *A. fumigatus* foi realizado utilizando o banco de dados para sequências de proteínas "BLASTp search" no *Basic Local Aligment Search Tool/National Center for Biotechnology Information* (BLAST/NCBI) utilizando as sequências das proteínas ortólogas em *S. cerevisiae*, Arf1/Arf2, Arf3 e Arl1. Os alinhamentos das sequências peptídicas ortólogas foram realizados com o software Clustal Omega (EMBL EBI – http://www.ebi.ac.uk./Tools/msa/clustalo/).

3.1 - Linhagens

As linhagens de A. fumigatus utilizadas e construídas neste trabalho estão listadas

na tabela 01.

Linhagem	Genótipo	Organismo	Referência
$CEA17\Delta akuB^{ku80+}$	$\Delta ku 80::pyr$ G	A. fumigatus	Ferreira et al., 2006
CEA17∆akuB ^{ku80-}	$\Delta ku 80::pyrG-$	A. fumigatus	Ferreira et al., 2006
$\Delta arf B1$	∆arfB::pyrG	A. fumigatus	Este trabalho
$\Delta arf B2$	∆arfB::pyrG	A. fumigatus	Este trabalho
$\Delta arf Bpyr G$ -	∆arfB::pyrG-	A. fumigatus	Este trabalho
$\Delta arlA2$	∆arlA::pyrG	A. fumigatus	Este trabalho
$\Delta arlA3$	∆arlA::pyrG	A. fumigatus	Este trabalho
$\Delta arlApyrG$ -	∆arlA::pyrG-	A. fumigatus	Este trabalho
$\Delta gcsA70$	$\Delta gcsA::pyrG$	A. fumigatus	Kress et al., dados não publicados
$\Delta gcsA70 pyrG$ -	$\Delta gcsA::pyrG-$	A. fumigatus	Kress et al., dados não publicados
$\Delta gcsA\Delta arfB1$	$\Delta gcsA::pyrG-\Delta arfB::pyrG$	A. fumigatus	Este trabalho
$\Delta gcsA\Delta arfB2$	$\Delta gcsA::pyrG-\Delta arfB::pyrG$	A. fumigatus	Este trabalho
$\Delta gcsA\Delta arlA2$	$\Delta gcsA::pyrG-\Delta arlA::pyrG$	A. fumigatus	Este trabalho
$\Delta gcsA\Delta arlA3$	$\Delta gcsA::pyrG-\Delta arlA::pyrG$	A. fumigatus	Este trabalho
arfB::GFP3	arfB::GFP	A. fumigatus	Este trabalho
arfB::GFP4	arfB::GFP	A. fumigatus	Este trabalho
arlA::GFP1	arlA::GFP	A. fumigatus	Este trabalho
arlA::GFP2	arlA::GFP	A. fumigatus	Este trabalho
PRX1	prx::GFP	A. fumigatus	Malavazi et al., dados não publicados

 Tabela 01 - Genótipo das linhagens de A. fumigatus utilizadas no trabalho.

Linhagem	Genótipo	Organismo	Referências	
EV924	M.4 Ta his3A200 ura3-52 leu2A1	C. computeria c	Winston et al.,	
Г I 834	lj)s2A202	s. cerevisiae	1995	
	F-mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC)			
	$\Phi 80 dlac Z \Delta M 15 \Delta lac X74 end A1 rec A1$	E coli	$C_{nont} = a_n a_n a_{n-1} a$	
DIII0B	deoR Δ (ara,leu)7697 araD139 galU galK	L. con	Grant <i>et al.</i> , 1990	
	$nupG \ rpsL \lambda$ -			

3.1.1 - Demais linhagens utilizadas

3.2 - Isolamento do DNA genômico de Aspergillus sp.

A extração do DNA genômico de A. fumigatus foi realizada de acordo com modificações do método descrito por Junghans e Metzlaff (1990). Culturas de A. fumigatus crescidas em meio de cultura líquido por 16 h a 37°C foram filtradas em papel de filtro, congeladas em nitrogênio líquido e trituradas em almofariz e pistilo estéril com nitrogênio líquido. Cerca de 500 µL de tampão de extração de DNA genômico foi adicionado ao micélio triturado seguido da adição de igual volume de fenol:clorofórmio 1:1 (v/v). A mistura foi homogeneizada por cerca de 10 min em agitador de tubos e centrifugada por 15 min a 12000 g. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e igual volume de clorofórmio foi adicionado. Após homogeneização, foi centrifugado 5 min a 12000 g. O sobrenadante foi transferido para novo microtubo e o DNA foi precipitado com a adição de igual volume de isopropanol e centrifugado 1 min a 12000 g. O pellet foi lavado com etanol 70% e após a remoção de todo o etanol, o DNA foi eluído em água ultrapura e tratado com 300 ng/ml de RNase por 1 h a 37 °C. A concentração e a pureza do DNA foram determinadas em espectrofotômetro de acordo com Sambrook e Russell (2001) A integridade do material genético foi verificada por fracionamento em gel de agarose 1%.

3.3 - Construção do cassete de deleção Δarf::pyrG

A construção do cassete de deleção dos genes arfA, arfB e arlA foram realizadas segundo protocolo descrito por Malavazi e Goldman (2012). Neste, a construção ocorre pela recombinação homóloga in vivo em S. cerevisiae pela fusão das sequências de DNA de interesse no vetor pRS426. O esquema de construção do cassete de deleção foi exemplificado na figura 6. O DNA genômico da linhagem CEA17∆akuB^{ku80} pyrG+ de A. fumigatus foi utilizado como molde para a amplificação dos fragmentos de aproximadamente 2 Kb das regiões 5' e 3' que flanqueiam a região aberta de leitura dos genes de interesse. A sequência de DNA contendo o marcador genético de auxotrofia (*pyr*G - 1,9 Kb) foi obtido utilizando como molde o plasmídeo pCDA21. As reações de amplificação por PCR foram realizadas em volume final de 20 μ L utilizando a DNA polimerase de alta fidelidade Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific), 1 μ g de DNA genômico ou 200 ng de DNA plasmideal e 0,5 μ L a 20 pmol de cada *primer* (específico para cada construção – tabela 03). As amostras foram submetidas ao ciclo de temperatura 94°C por 1 min, seguido de 35 ciclos de 94°C 30 seg, 56°C 10 seg, 72°C 30 segundos/Kb do fragmento a ser amplificado, finalizando com extensão a 72°C por 10 min.

As sequências de DNA amplificadas apresentam extremidades homólogas entre si e adicionalmente ao vetor pRS426, permitindo assim, a recombinação homóloga in vivo em S. cerevisiae. O plasmídeo pRS426 linearizado com BamHI e EcoRI (figura 5) e as sequências de DNA amplificadas por PCR foram fracionados em eletroforese em gel de agarose a 1% corado com SybrSafe (Invitrogen) e purificados com o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. Para isso, as bandas correspondentes aos fragmentos de interesse e ao plasmídeo digerido foram recortadas do gel com bisturi esterilizado e transferido para microtubos de 1,5 mL. O tampão Membrane Binding Solution foi adicionado em volume correspondente ao peso do fragmento de gel. Tampão e gel foram incubados em banho seco a 60°C até a completa dissolução da agarose. Em seguida transferidos para colunas do kit e centrifugado a 16000 g durante 1 min. As colunas foram transferidas para novos microtubos de 1,5 mL e adicionado em cada coluna 700 µL de Membrane Wash Solution e centrifugado a 13000 g. Este passo foi repetido com 500 µL de Membrane Wash Solution a 13000 g por 5 min seguido de mais uma centrifugação a 13000 g por 1 min. A coluna foi transferida para novo microtubo de 1,5 mL e o DNA foi eluído da coluna com 50 μ L de água ultra pura e centrifugação a 13000 g por 1 min.

A recombinação homóloga em *S. cerevisiae* (cepa FY834) foi realizada da seguinte maneira: uma colônia isolada da levedura em meio de cultura YPD sólido foi inoculada em 10 mL de YPD líquido e incubada a 30°C, 200 rpm por 16 h. Após, 5 mL foram transferidos para 200 mL de YPD líquido e incubados a 30°C, 200 rpm por 4 h. Em seguida a cultura foi centrifugada a 3000 *g* por 7 min e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi lavado com água esterilizada e centrifugado a 3000 *g* por 5 min e ressuspendido em 1 mL de solução TE 1x/LiOAc. Separadamente, 100 µg de DNA de esperma de tilápia (Promega) foi aquecido a 100°C e posteriormente mantido no gelo. Para a fusão dos fragmentos e plasmídeo linearizado,

100 µL da solução TE1x/LiOAc foi misturado a 100 µg do DNA de Tilápia e concentrações equimolares do plasmídeo (digerido com enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RI) e dos fragmentos 5'UTR, 3'UTR e *pyr*G. Após, foram adicionados 600 µL de solução PEG 3350 40% / LiOAc 1x e os tubos foram incubados a 30°C, 200 rpm durante 30 min. Após a incubação, 70 µL de DMSO foram adicionados e uma nova incubação foi realizada a 42°C durante 15 min, seguido de outra incubação em gelo por 2 min. O conteúdo dos tubos foram lavados com 700 µL de água esterilizada e centrifugado a 13000 *g* durante 30 segundos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento plaqueado em meio SC-URA⁻ e incubado a 30°C. Como controle positivo foi feita uma reação utilizando-se o plasmídeo não digerido e, como controle negativo, uma reação sem plasmídeo e fragmentos.

Para comprovar a recombinação dos fragmentos e a correta formação do cassete de deleção, o DNA dos transformantes crescidos em meio de cultura SC-URA⁻ foi extraído e a fusão dos fragmentos por recombinação *in vivo* foi verificada por PCR utilizando os *primers* 1_Fw e 6_Rv para cada respectivo gene (tabela 3). O clone positivo escolhido foi submetido a uma PCR com a enzima Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) a fim de amplificar o cassete de deleção *arfA*, *arfB* e *arlA*. Os *primers* arfA_1 Fw e arfA_6 Rv, arfB_1 Fw e arfB_6 Rv e arlA_1 Fw e arlA_6 Rv foram utilizados, respectivamente (tabela 3). O DNA amplificado foi fracionado em gel de agarose 1%, corado com Sybr Safe[®] (Invitrogen) e as bandas purificadas com o *kit* Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) seguindo protocolo do fabricante.

3.4 - Construção do cassete arf::GFP

As construções dos cassetes dos genes arfA, arfB e arlA fusionadas com o gene GFP foram realizadas segundo protocolo descrito por Malavazi e Goldman (2012) e já descrito no item "Construção do cassete de deleção $\Delta arf::pyrG$ ". Neste, a sequência de DNA contendo o GFP e o marcador auxotrófico *para pyrG* foi amplificado utilizando como molde a linhagem PRX1 de *A. fumigatus* (Malavazi *et al.*, dados não publicados).

A comprovação da recombinação dos fragmentos de DNA pela levedura no plasmídeo pRS426 foi realizada por PCR com a enzima Phusion[®] High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) seguindo o protocolo descrito anteriormente. Os *primer* utilizados foram arfB_1GS Fw e arfB_6 Rv e arlA_1GS Fw e arlA_6 Rv (tabela 3) para as fusões *arfA::GFP*, *arfB::GFP* e *arlA::GFP*, respectivamente.



Figura 05 - pRS426. Representação esquemática do vetor pRS426 utilizado no protocolo de fusão por recombinação homologa *in vivo* em *S. cerevisiae* para a construção dos cassetes de deleção de *arfA*, *arfB* e *arlA* e de fusão com GFP (http://biovector.axybio.com/uploads/vector/pRS426.png).



Figura 06 - Construção do cassete de deleção. Representação esquemática dos fragmentos amplificados por PCR para a construção do cassete de deleção e a recombinação homóloga *in vivo*. UTR, *untranslated region*.



Figura 07 - Construção dos cassetes *arf::GFP*. Representação esquemática dos fragmentos amplificados por PCR para a construção do cassete de fusão arfA::GFP, arfB::GFP e arlA::GFP e a recombinação homóloga *in vivo*. UTR, *untranslated region*.

Primer Sequência (5' - 3') Amplicon arfA_1 Fw GTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGTTCGAAAGATTGCTTGATCG 1.891 pb CGCATCAGTGCCTCCTCTCAGACAGAATtcTGGCGTAAACGAGTCTAAG arfA_2 Rv arfA _3 Fw CCCTTTTCAGGTTCACAACAGAATTCTGTCTGAGAGGAGGACGCACTGATGCG 1.904 pb arfA 4 Fw GGATCTATGGCAGAGATTAAGAATTCGCCTCAAACAATGCTCTTC arfA 5 Fw GAAGAGCATTGTTTGAGGCGAATTCACGAGAGGAAGAAACCCCCG 1.992 pb arfA_6 Rv GCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGCCATGGGGATTGGATTACAGC 152 pb --[5'UTR arfA_7 Fw AGGCACGCTCAAGACATCC arfA_start Fw ATGGGTCTCACCTTCTCGAA 782 pb arfA_stop Rv CTAAGAGTTGTTCGATTTCCT arfA_1GS Fw GTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGTGATTCAAGAGCCAACCCG 1.882 pb TGAAAAGTTCTTCTCCTTTACTCATTCCCCGTGTTCCAGAGTTGTTCGATTTCCTCAA arfA_2G Rv GFP Fw GGAACACGGGGGAATGAGTAAAGGAGAA 2.636 pb pyrG_Rv GATATCGAATTCGCCTCAAAC arfA_5G Fw GTTTGAGGCGAATTCGATATCCGACGAGAGGAAGAAACCC 1.868 pb arfA_6 Rv GCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGCCATGGGGATTGGATTACAGC Primer Sequência (5' - 3') Amplicon arfB_1 Fw GTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGGAAGAGGCTGTTTGGACGGC 1.876 pb arfB_2 Rv CGCATCAGTGCCTCCTCTCAGACAGAATtcGTTGACTAGCGTAAGGCGA arfB 3 Fw TCGCCTTACGCTAGTCAACGAATTCTGTCTGAGAGGAGGCACTGATGCG 1.904 pb arfB_4 Rv TGGACGCGGGACATAAGAAGAATTCGCCTCAAACAATGCTCTTC arfB_5 Fw GAAGAGCATTGTTTGAGGCGAATTCTTCTTATGTCCCGCGTCCA 1.826 pb arfB_6 Rv GCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGCTTGCATGTAGAGTATCAGCC arfB_7 Fw AAGTAAGTACGCTGACATGC 120 pb -- [5'UTR arfB_start Fw ATGGGTGGACAAGTTTCGAA 808 pb arfB_stop Rv TTACTTCTGGGGGCTGAGTC arfB_1GS Fw TGAAAAGTTCTTCTCCTTTACTCATTCCCCGTGTTCCCTTCTGGGGCTGAGTCTTG 1.956 pb arfB 2G Rv GTTTGAGGCGAATTCGATATCTTCTTATGTCCCGCGTCCA GFP Fw GGAACACGGGGAATGAGTAAAGGAGAA 2.636 pb pyrG_Rv GATATCGAATTCGCCTCAAAC arfB_5G Fw GTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGGCAGCTTCCCATGTGAGC 1.824 pb GCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGCTTGCATGTAGAGTATCAGCC arfB_6 Rv Primer Sequência (5' - 3') Amplicon arlA_1 Fw GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGAAACGCAAGAGTACTGAGG 1.817 pb arlA 2 Rv CGCATCAGTGCCTCCTCTCAGACAGAATtcTGTTGTGAACCTGAAAAGGG

Tabela 03 - Primers utilizados neste trabalho

arlA_3 Fw	CCCTTTTCAGGTTCACAACAGAATTCTGTCTGAGAGGAGGCACTGATGCG		
arlA_4 Rv	GGATCTATGGCAGAGATTAAGAATTCGCCTCAAACAATGCTCTTC		
arlA_5 Fw	GAAGAGCATTGTTTGAGGCGAATTCTTAATCTCTGCCATAGATCC	1 755 ph	
arlA_6 Rv	GCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGCTTGACTGCGATCTGGATCC	1.755 pb	
arlA_7 Fw	CAATGTCAACAACGCATGC	152 pb[5'UTR	
arlA_start Fw	ATGGGAGGCTCGCTGTCA	254 ph	
arlA_stop Rv	TTATGCGTTCTCCGCTTGA	054 po	
arlA_1GS Fw	GTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGATGGCTAAAGCGCGATCCCAG	1 906 ph	
arlA_2G Rv	TGAAAAGTTCTTCTCCTTTACTCATTCCCCGTGTTCCTTATGCGTTCTCCGCTTGA	1.900 pb	
GFP_Fw	GGAACACGGGGAATGAGTAAAGGAGAA	2 626 ph	
pyrG_Rv	GATATCGAATTCGCCTCAAAC	2.050 pb	
arlA_5G Fw	GTTTGAGGCGAATTCGATATCTTAATCTCTGCCATAGATCC	1 755 ph	
arlA_6 Rv	GCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGCTTGACTGCGATCTGGATCC	1.755 pb	

3.5 - Extração de DNA de levedura

As leveduras de *S. cerevisiae* foram inoculadas em 10 mL de meio SC-URAlíquido e incubadas a 30°C sob agitação 150 rpm (Shaker Ecotron – Infors HT - Switzerland) durante 48 horas. Após, as leveduras foram coletadas por centrifugação a 2000 *g* e ressuspendidas em 1 mL de tampão de extração de DNA genômico. A extração foi realizada utilizando pérolas de vidro (Sigma Aldrich®) e agitação mecânica durante 10 minutos. O material foi transferido para novo microtubo sem as pérolas de vidro e o mesmo volume de fenol (Sigma Aldrich®) e clorofórmio (JT Baker®) 1:1 (v/v) foi adicionado seguido de agitação mecânica por 10 minutos. O microtubo foi centrifugado a 13000 *g* durante 15 minutos, a fase aquosa (superior) foi transferida para um novo microtubo e, a esta, foram adicionados 540 µL de isopropanol (JT Baker®). O tubo foi homogeneizado suavemente (por inversão) e novamente centrifugado a 13000 *g* por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 300 µL de etanol 70% e centrifugado a 22000 *g* durante 1 minuto. O sobrenadante foi removido e após secagem a temperatura ambiente, o precipitado foi ressuspendido em água ultrapura. O DNA foi tratado com 300 ng/mL de RNase (Pure Link A -InvitrogenTM Thermo Fisher®) a 37°C, durante 1 hora.

3.6 - Eletrotransformação em E. coli

A eletrotransformação foi realizada pela descarga elétrica de 200 kV (Gene PulserXcell – BIO-RAD) em cubetas de eletroporação com células eletrocompetentes de *E. coli* (DH10 α - tabela 2) e 5 µg do DNA total de *S. cerevisiae* contendo o vetor com o cassete de deleção ou de fusão. Em seguida foram adicionados 800 µL de meio de cultura LB líquido e transferido para microtubos para incubação a 37°C, agitação constante de 200 rpm (Shaker Ecotron – Infors HT - Switzerland) por 1 h. Ao término do período de incubação, 100 µL da suspensão foram inoculados na superfície de meio de cultura LB sólido acrescido de 50 µg/mL de ampicilina e incubados a 37°C por 24 h a fim de selecionar células de *E. coli* que conseguiram incorporar o vetor transformado.

As colônias isoladas crescidas no meio LB sólido com ampicilina foram inoculadas em 20 mL de meio LB líquido com 50 μ g/mL de ampicilina e incubados a 37 °C, 150 rpm (Shaker Ecotron – Infors HT – Switzerland) por 16 horas. Após o período de incubação, 700 μ L das células foram aliquotadas em tubos de 1,5 mL acrescidos de glicerol 10% e armazenados em – 80 °C.

3.7 - Extração DNA plasmideal de E. coli e amplificação por PCR convencional

O DNA plasmideal (pDNA) foi extraído da *E. coli* com o *kit* Pure Yield Plasmid Miniprep System (PROMEGA) seguindo as normas do fabricante. As células de *E. coli* com o plasmídeo portando o cassete arf_5'UTR::*pyr*G::arf_3'UTR foram centrifugados a 2500 g por 10 min, o sobrenadante descartado e as células ressuspendidas em 600 μ L de água. O conteúdo foi transferido para um novo microtubo juntamente com 100 μ L de lysis buffer, homogeneizado, e em seguida acrescido de 350 μ L de Neutralization Solution e centrifugado em velocidade máxima por 3 min. O sobrenadante foi transferido para uma minicoluna onde foi centrifugado por 15 segundos. Em seguida, foram adicionados na coluna 200 μ L de Endotoxin Removal Wash e centrifugado em velocidade máxima por 15 segundos. Após descartar o efluente foram adicionados na coluna 400 μ L de Column Wash Solutione e centrifugado por mais 30 segundos. A minicoluna foi transferida para um novo microtubo e adicionada o volume 30 μ L de Elution Buffer seguido de incubação por 1 min em temperatura ambiente. O DNA foi eluído pela centrifugação final de 15 segundos em velocidade máxima.

Realizou-se PCRs convencionais para amplificar os cassetes de deleções dos vetores, utilizando os *primers* arf_1 FW e arf_6 Rv, respectivos a cada gene (Tabela 3) e a enzima Phusion High - Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific), conforme indicado pelo fabricante. Os amplicons de tamanho aproximado a 6 kpb foram removidos do gel de agarose 1%, com auxilio de um bisturi. Após, as amostras foram purificadas com o *kit* Wizard® SV *Gel and PCR Clean-Up System* – Promega, conforme descrito pelo fabricante.

3.8 - Transformação em A. fumigatus

Conídios de *A. fumigatus* da linhagem CEA17(*pyrG*) $\Delta akuB^{ku80}$ (1x10⁷ conídios/mL) foram inoculados em 50 mL de meio de cultivo YG+UU líquido e incubados a 37°C com agitação constante de 180 rpm (Shaker Ecotron – Infors HT - Switzerland) por 16 h. O micélio foi coletado por centrifugação (1500 *g* por 5 min), ressuspenso em solução de protoplastização e incubado a 30°C sob agitação constante de 80 rpm (Shaker Ecotron – Infors HT - Switzerland) e por 2 h para a digestão parcial da parede celular do fungo. Após, o material foi filtrado em lã de vidro esterilizado, diluído com 1 volume da solução STC1700 gelado e incubado por 10 min em banho de gelo. Centrifugado a 1500 *g* durante 10 min a 4°C e lavado duas vezes com a solução STC1700 gelada. Os protoplastos foram ressuspensos em 1 mL da solução STC1700 gelada e alíquotas de 100 – 150 µL foram incubadas durante 20 min em banho de gelo com 5 a 10 µg de DNA (cassete de deleção/fusão). Após este período, foi

adicionado 1 mL da solução PEG 4000, gentilmente homogeneizada e incubada a temperatura ambiente por 20 min. A suspensão de protoplastos foi inoculada em 15 mL de meio de cultura *top Agar* (1% Agar (p/v) contendo estabilizador osmótico e seleção).

Para obter as linhagens arfB::GFP e arlA::GFP foram utilizadas as linhagens $\Delta arfB$::pyrG- e $\Delta arlA$::pyrG-, respectivamente, a fim de haver a recombinação homóloga dos cassetes de fusão no *locus* do gene das respectivas linhagens deletadas.

3.9 - Caracterização da deleção/fusão por PCR-diagnóstico

Os transformantes obtidos em *A. fumigatus*, tanto das deleções gênicas quanto das fusões com GFP, foram purificados por três passagens consecutivas de conídio de colônias isoladas para novo meio de cultura YAG pela técnica de esgotamento e incubação a 37°C por 48 h. O DNA genômico foi extraído a partir de micélio de acordo com Junghans e Metzlaff (1990). Foram realizadas PCRs de verificação da recombinação (PCR-diagnóstico) com a Phusion High - Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific). Para a caracterização por PCR-diagnóstico da integração homóloga no *locus* desejado, foram utilizadas duas amplificações: (i) amplificação com *primers* com homologia à região a montante (*upstream*) ou a jusante (*downstream*) à sequência presente no cassete utilizado na transformação, e (ii) amplificação com os *primers start* e *stop*, a fim de verificar a presença do gene no genoma da linhagem transformada. A não amplificação do gene e a amplificação do cassete no genoma do fungo.

3.10 - Análise fenotípica das linhagens arf deletadas

3.10.1 - Análise macromorfológica

A análise macroscópica foi realizada por meio da observação das características, como o aspecto, a cor, a superfície e o tamanho da colônia gigante em meio de cultura sólido. As linhagens foram inoculadas em placa de Petri de 90 x 15 mm, contendo meio de cultura YAG e incubadas a 37°C por 48 h. Após este período, os conídios foram coletados com auxílio de uma pipeta de Pasteur e água destilada autoclavada e devidamente filtrado com seringa e lã de vidro autoclavada. Em uma placa de Petri de 150 x 15 mm contendo meio YAG, foram inoculados 10 μ L de conídios a 1x10⁶ conídios/mL de cada linhagem no centro de cada placa e incubado a 37°C por 96 h. O diâmetro das colônias foi medido a cada 24 h até completar 96 h de incubação. Foram realizadas três replicas biológicas.

3.10.2 - Análise micromorfológica

A análise micromorfológica foi realizada pelo microcultivo dos conídios das linhagens de *A. fumigatus* sobre uma fina camada (0,5 cm) de meio de cultura YAG sobre uma lâmina esterilizada. Acima do inóculo foi colocada uma lamínula esterilizada e incubado em câmara úmida a 37°C por 24 h ou até a formação das estruturas de reprodução assexual em câmara úmida. Após, a lamínula foi removida e transferida para uma lâmina contendo uma gota de lactofenol azul de algodão. Os conídios, conidióforos e hifas foram observados em microscopia óptica no aparelho Observer Z 1 (Carl Zeiss Jena, Alemanha), aumento de 400X e capturados com a câmera HDCE-X5 e com o auxilio do software ScopImage 9.0.

3.11 - Teste de germinação dos conídios de A. fumigatus

O teste de germinação dos conídios de *A. fumigatus* foi realizado a fim de avaliar o potencial de germinação das linhagens deletadas, duplo mutantes e fusionadas ao GFP em comparação com linhagem selvagem parental CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$.

Os conídios das linhagens testadas foram inoculados em placa de petri 90 x 15 mm na concentração de 1 x 10^7 conídios/mL, contendo 15 mL de meio de cultura YG e 4 lamínulas de vidro esterilizadas, as quais foram ajustadas ao fundo da placa sem haver sobreposição. As linhagens foram incubadas a 37°C e as leituras foram realizadas a cada 2 h, até completar 8 h de incubação. Cada lamínula foi transferida para uma lâmina e observado ao microscópio óptico Observer Z 1 (Carl Zeiss Jena, Alemanha) no aumento de 400X para a contagem de conídios germinados e fotodocumentação por meio de uma câmera (UI-1460LE - IDS) acoplada ao microscópio e o respectivo software Scopelmage (Bioimager).

3.12 - Coloração de conídios germinados com o corante lipofílico FM4-64

Aproximadamente 1×10^7 conídios/mL de cada linhagem de *A. fumigatus* foram inoculados sobre lamínulas esterilizadas embebidas em meio de cultura MM e incubados a 30°C por 16 h. Após este período, os conídios germinados aderidos na lamínula foram incubados por dois minutos com 10 µg/mL de FM4-64 (Molecular Probes - Invitrogen[®]) em meio de cultura MM líquido. Os conídios germinados aderidos na lamínula foram lavados com novo meio de cultura previamente aquecido a 37°C, e o material foi incubado a 37°C por 3 h ao abrigo da luz. Após este período, os germinantes foram visualizados em microscópio confocal (Leica TSC SP8; Laboratório de Microscopia Confocal – LMMC), com objetiva de imersão de óleo

(aumento de 63x) com *laser* 488 a 17% (excitação 470 nm e emissão 550 nm) e zoom 5x. As imagens foram analisadas com o *software* Leica Application Suite – *Advanced Fluorescence Lite* 2.3.0 (LAS-AF Lite, Leica Microsystems, 1997-2010).

3.13 - Coloração de conídios germinados com o corante Filipin

Aproximadamente 1×10^7 conídios/mL de cada linhagem de *A. fumigatus* foram inoculados sobre lamínulas esterilizadas embebidas em meio de cultura MM e incubados a 30°C por 16 h. Após este período, os conídios germinados aderidos na lamínula foram incubados por cinco minutos com 25 µg/mL de marcador de ergosterol Filipin (Molecular Probes - Invitrogen[®]) em meio de cultura MM líquido. Os conídios germinados aderidos na lamínula foram lavados por três vezes com PBS 1X. Após este período, os germinantes foram visualizados em microscópio confocal (Leica TSC SP8; Laboratório de Microscopia Confocal – LMMC), com objetiva de imersão de óleo (aumento de 63x) com *laser* 405 a 2% (excitação 470 nm e emissão 550 nm) e zoom 5x. As imagens foram analizadasanalisadas com o *software* Leica Application Suite – *Advanced Fluorescence Lite* 2.3.0 (LAS-AF Lite, Leica Microsystems, 1997-2010).

3.14 - Microscopia eletrônica de transmissão dos conídios de A. fumigatus

As preparações das amostras foram feitas como descrito previamente por Walker *et al.* (2008), com adaptações. Brevemente, os conídios foram coletados e fixados em tampão PBS 0,1 M contendo glutaraldeído 2,5% (v/v) e incubados a 4°C por 24 h. As amostras foram então encapsuladas em agarose de baixo ponto de fusão 3% (p/v). Após 24 h no processador de tecidos Lynx, foi realizada a fixação secundária com 1% OsO4, contraste com 1% acetado de uranila, desidratação com etanol e infiltração com acetato/Spurr. Uma infiltração adicional foi realizada sob vácuo a 60°C antes da incorporação em cápsula e polimerização a 60°C por 48 h. Foram usados cortes ultrafinos (60 nm) que foram preparados usando uma lâmina de diamante Diatome em um ultramicrótomo Leica UC6 e coradas com acetato de uranilo e citrato de chumbo para análises das imagens obtidas com a câmera AMT UltraVue acoplada ao microscópio eletrônico de transmissão JEM-1400Plus (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-FMRP).

3.15 - Análise do perfil de sensibilidade a variações de pH e temperatura

Uma suspensão de conídios das linhagens deletadas $\Delta arfB1$, $\Delta arlA2$ e selvagem CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$ foi realizada pela semeadura por toda a superfície do meio de cultura YAG em placas de Petri de 90 x 15 mm e incubado por 48 h a 37°C. A partir deste, suspensões de novos conídios foram obtidas e filtradas com lã de vidro esterilizada para obter uma suspensão pura de conídios. Cada suspensão foi ajustada, com o auxílio de câmara de Neubauer, na concentração de 5 x 10⁶ conidios/ mL. Após, 5 µL de cada suspensão foram pipetadas no centro de placas de Petri de 90 x 15 mm contendo cada uma 20 mL de MM e pHs ajustados para 5,5; 6,5; 7,5 e 8,5. Uma placa de cada linhagem e nos diferentes pHs foram incubadas a 28, 37 e 45°C. O diâmetro de cada colônia foi medido a cada 24 h por até 96 h de incubação. Foram realizadas duas réplicas biológicas e cada uma em duplicata.

3.16 - Teste de sensibilidade por diluição em ágar pela técnica drop out

Para a realização do teste de sensibilidade por diluição em ágar foi utilizado placa de Petri 150 x 15 mm contendo 40 mL de meio de cultura MM com pH 6,5. As drogas diluídas no meio de cultura foram anfotericina B (750 ng/mL), anidulafungina (15 ng/mL), *congo red* (100 μ g/mL), *calcofluor white* (75 μ g/mL), caspofungina (25 μ g/mL), cetoconazol (8 μ g/mL), farnesol (2 mM), fitoesfingosina (600 ng/mL), 5-flucitosina (1,5 ng/mL), itraconazol (250 ng/mL), lovastatina (2 μ g/mL), menadiona (4 μ M), miriocina (20 μ g/mL), brefeldin A (40 μ g/mL), terbinafina (25 ng/mL), higromicina B (0,1 mg/mL) e higromicina B-KCl (0,1 mg/mL – 1mM) (tabela 4).

Os conídios das linhagens deletadas, duplo mutantes e fusionado ao GFP, além da linhagem selvagem foram coletados de cultura de 48 horas em meio YAG, filtrados em lã de vidro esterilizada e suas concentrações ajustadas por diluição seriada para as concentrações de 1×10^8 , 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 e 1×10^4 de conídios/mL. 5µL de cada diluição de conídios foram pipetados de forma ordenada sobre o meio de cultura sólido (figura 8). As placas foram incubadas a 37° C com leituras a cada 12 horas e fotodocumentação em 48-72 h.



Figura 08 - Teste de sensibilidade por diluição em ágar pela técnica *drop out*. Representação do esquema de distribuição das linhagens testadas e as respectivas concentrações em placa de Petri 150 x 15 mm.

Tabela 04	- Drogas utilizadas	nos testes de	e sensibilidade	por diluição e	em ágar pela	a técnica d	rop
out.							

Drogas	Alvos	Diluentes	Fabricantes	Concentrações experimentais
Anfotericina B	Lipidios	DMSO	Sigma	350ng/mL, 450ng/mL e 750ng/mL
Anidulafungina	Parede celular	água	Pfizer	10µg/mL, 15µg/mL e 20µg/mL
Brefeldin A	Via de transporte vesicular	ETOH	Sigma	10, 15, 20, 30 e 40 µg/mL
Caspofungina	Parede celular	água	Sigma	15µg/mL, 20µg/mL e 25µg/mL
Congo Red	Parede celular	água	Dinâmica	100 µg/mL
Calcofluor	Parede celular	KOH (0,5%), glicerol (83%) e água	Sigma	75µg/mL
Farnesol	Dano oxidativo	Sem diluição	Sigma	2mM
Fitoesfingosina	Lipidios	ETOH	Sigma	500µg/mL e 600µg/mL
5-flucitocina	Sintese de ácidos nucléicos	água	Sigma	1,5ng/mL
Itraconazol	Lipidios	HCl 0,1 N	Sigma	350 ng/µL
Lovastatina	Parede celular	ETOH	Sigma	4µg/mL e 2µg/mL
Menadiona	Dano oxidativo	ETOH	Sigma	4µM
Miriocina	Lipidios	metanol	Sigma	20µg/mL e 25µg/mL
Terbinafina	Lipidios	DMSO	Sigma	10ng/mL, 25ng/mL, 100ng/mL e 200ng/mL
Higromicina	Dano inespecífico	Sem diluição	Sigma	0,1mg/ml
Higromicina / KCl	Dano inespecífico	Sem diluição	Sigma	0,1mg/ml / 1mM

3.17 - Biomassa de Biofilme

Os conídios das linhagens deletadas, duplo mutantes e fusionado ao GFP, além da linhagem selvagem foram coletados de cultura de 48 h em meio YAG e filtrados em lã de vidro esterilizada e adicionados em meio de cultura RPMI 1640 tamponado na concentração final de 1 x 10⁵ conidios/mL. 200µL foram transferidos para cada poço da placa acrílica de 96 poços e incubadas a 37 °C por 24 h. Após esse período, o sobrenadante de cada poço foi removido por pipetagem e lavado três vezes com PBS 1X autoclavado. Para quantificação dos biofilmes, foi utilizado o método colorimétrico de determinação da biomassa fúngica por coloração com

cristal violeta de acordo com o descrito por Silva *et al.* (2009). Brevemente, o biofilme foi fixado com metanol por 15 minutos e corados com solução de cristal violeta (1%) por 2 min. Os poços foram lavados duas vezes com PBS para a remoção do excesso de corante. O corante incorporado pelo biofilme foi removido pela incubação com ácido acético (33%) por 5 min. O sobrenadante foi transferido para nova placa de 6 poços e a absorbância de cada poço medida em espectrofotômetro de microplacas (Epoch-BioTec), cujo comprimento de onda foi de 570 nm. Todas as placas possuíam sempre uma coluna sem inóculo, utilizados como controle negativo. Foram realizadas três réplicas biológicas e cada réplica em triplicata.

3.18 - Teste de virulência em Galleria mellonella

Para caracterizar o perfil de virulência das linhagens deletadas frente a linhagem selvagem CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$, adotou-se o protocolo segundo Renwick (2006) onde foram utilizadas larvas da espécie *Galleria mellonella*. Neste trabalho as larvas foram mantidas a 28°C no escuro, em recipiente de vidro (30 cm altura x 20 cm largura) com capacidade de 2 L. As larvas foram mantidas com acesso a ração (até alcançarem o sexto instar, cujo peso está entre 200 mg a 250 mg). A ração utilizada é composta de 200 g de cera de abelha, 96 g de leite em pó, 188 g de extrato de levedo, 385 g de fubá, 416 mL de mel, 160 g de soja triturada e 300 mL de água. Os componentes da ração foram misturados no fogo alto e devidamente autoclavado. Após o completo desenvolvimento, as larvas foram privadas da alimentação e separadas em grupos de 10 unidades em placa de Petri de vidro para cada linhagem e PBS, que foi usado como controle da inoculação.

Os conídios das respectivas linhagens a serem analisadas foram coletados com água esterilizada de cultivo de 48 h a 37°C em YAG e filtrados em miracloth esterilizado. 1 x 10^8 conidios foram ressuspendidos em 2 mL de meio de cultura YG acrescido de 5% de soro fetal bovino (Cultlab) e incubado a 37°C por 4 h. Após, 1 mL do meio de cultura com os conidios foi transferido para tubos de 1,5 mL e centrifugado por 2 min a 10000 *g*. O meio de cultura sobrenadante foi descartado e subsequente adicionado 500 µL de PBS 1X.

Para a infecção artificial em larvas de *G. mellonella* foi utilizado micro seringa de Hamilton para cromatografia gasosa modelo 7000.5KH de volume de 10 μ L. Para cada larva inoculou-se no centro da ventosa da última pró-pata direita 5 μ L de conídios na concentração final de 2 x 10⁸ conídio/mL. O mesmo foi feito para o controle com apenas PBS 1X. Entre as infecções, uma rigorosa bateria de lavagem na pipeta de Hamilton foi realizada: 3 vezes com hipoclorito de sódio, etanol 70% e água autoclavada. Todos os passos foram feitos utilizando bico de Bunsen. Após a infecção as larvas foram incubadas em placa de Petri de vidro a 37°C privada de ração e iluminação direta. Durante todo o período experimental e a cada 12 h as larvas foram retiradas da pré-pupa a fim de retardar sua metamorfose. Os dados foram anotados diariamente. Foram realizadas três replicas biológicas do experimento com o n de 10 larvas por condição em cada experimento.

3.19 - Remoção do gene pyrG das linhagens arf deletadas

O gene *pyrG* codifica a enzima orotidina monofosfato descarboxilase (OMP descarboxylase) que participa da biossíntese de pirimidinas (metabolismo de nucleotídeos). Esta descarboxilase converte OMP em uracil monofostato (UMP). Assim, na presença de 5-FOA e UMP, ocorre a formação do metabólito 5-fluoro-UMP, tóxico para a célula (figura 9).



Figura 09 - Biossíntese de pirimidinas – Metabolismo de nucleotídeos. O gene *pyrG* expressa a enzima orotilato descarboxilase (OMP decarboxylase) que converte OMP (orotilato) a UMP (uracil monofosfato). Imagem adaptada de (Michels *et al.*, 2000).

Por este motivo, é desencadeado na célula fúngica um mecanismo de defesa, havendo a expulsão do gene *pyrG* do genoma do organismo. Assim, para a obtenção das linhagens deletadas *pyrG*⁻, realizou-se o cultivo das linhagens cujos genótipos eram $\Delta arfB::pyrG+e \Delta arlA::pyrG+em$ meio de cultura YAG+UU acrescido de 0,75 mg/mL de ácido 5-fluoroorótico (5-fluorouracil-6-carboxílico mono-hidrato de ácido ou 5-FOA - Thermo Fisher Scientific). O inoculo com os conídios foi realizado a partir de uma suspensão de 1 x 10⁷ conídios/mL na superfície do meio de cultura em formato de duas linhas perpendiculares e incubados a 37°C por 72 h. A expulsão do gene $pyrG^+$ (gene com a sua função preservada) do material genético do fungo foi evidenciado pela emissão de setores a partir do inóculo realizado na superfície do meio de cultura. Para evidenciar a inativação do gene pyrG ($pyrG^-$), os conídios da região distal de cada setor foram inoculados ordenadamente em placas de petri contendo YAG e YAG+UU. Os conídios que não foram capazes de formar colônia em meio de cultura YAG e que se desenvolveram em meio YAG+UU foram selecionados para a realização de PCR-diagnóstico a fim de comprovar a ausência do gene pyrG. Os *primers* utilizados na PCRdiagnóstico foram: arfB_3 Fw e arf_4 Rv para a linhagem $\Delta arfB$ e com a linhagem $\Delta arlA pyrG^$ os *primers* arlA_3 Fw e arlA_4 Rv. Como controle da reação foi utilizado o DNA genômico da linhagem $\Delta arfB::pyrG+$ com os *primers* arfB_3 Fw e arfB_4 Rv (tabela 3).

3.20 - Microscopia de fluorescência para a Green Fluorescence Protein - GFP

Cerca de 1x10⁷ conídios/mL de *A. fumigatus* das linhagens *arfB*::GFP3, *arlA*::GFP1 e CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$ foram inoculadas em 10 mL de meio de cultivo MM líquido em placas de petri contendo lamínulas esterilizadas (Knittel Glaser, 22x22 mm) e incubados por 16 h a 30°C e protegido da luz. As lamínulas foram transferidas para lâmina de microscopia com 40 µL de glicerol 40% em PBS 1X, seladas e higienizadas com álcool 70%. Para localizar as proteínas ArfB::GFP e ArlA::GFP nas estruturas de reprodução assexual do fungo (conidióforos), 5 µL de uma suspensão a 2x10⁸ conídios/mL das linhagens *arfB*::GFP3, *arlA*::GFP1 e CEA17 $\Delta akuB^{ku8}$ foram inoculados em microcultivo em MM sólido a 37°C por 24 e 48 h na temperatura ambiente. As visualizações foram realizadas em microscópio de fluorescência Nikon - Eclipse Ti (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP USP) com objetiva de imersão em óleo (aumento de 60x) com CAM-GFP (ex 450/90 nm e em 500/50 nm). O tratamento das imagens foi realizado com o *software* de análise NIS-elements – AR *Advanced Research Fluorescence* no formato 1024x1024, com zoom de 1x. Os processamentos das imagens foram tratados com auxílio do programa Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Incorporated, CA)

3.21 - Ensaios para a realização de qPCR.

3.21.1 - Extração de RNA total

O micélio das linhagens de *A. fumigatus* foi filtrado a vácuo, lavado com água destilada estéril e, imediatamente após, congelado em nitrogênio líquido para evitar a degradação do RNA e liofilizado por 8 h. O RNA foi extraído com o *kit* RNeasy Plant Mini (Qiagen) seguindo as instruções do fabricante. Brevemente, o micélio liofilizado de cada linhagem foi pesado e a massa de 15 a 45 mg foi utilizada para a extração do RNA total de cada amostra. Foi adicionado nitrogênio liquido e quebra mecânica da parede celular do micélio com o auxilio de um bastão. Após, foram adicionados 450 µL de tampão RTL/β-Mercaptoetanol e misturado vigorosamente. O material foi filtrado em coluna QIAshredder e o efluente transferido para novo tubo de microcentrífuga e misturado a 0,5 volumes de etanol para precipitar o RNA. Esta suspensão com o RNA foi transferida para uma nova coluna (RNeasy spin) e lavada com 350 µL de tampão RW1. Neste passo foi realizado o tratamento com DNaseI (Qiagen) de acordo com as normas do fabricante. Após, a coluna foi lavada com tampão RW1 e RPE. O RNA total foi eluído em 20 µL de água ultrapura livre de RNase.

3.21.2 - Quantificação e verificação da qualidade do RNA total

A quantidade do RNA total foi verificada no equipamento Nanophotometer (Implen). A razão das absorbâncias A260/A280 (>2,0) e A260/A230 (>1,7) foram utilizadas como critério para verificar a pureza do material. A qualidade do RNA foi aferida pela observação visual da razão entre as subunidades 18S e 28S do RNA ribossomal em gel de agarose corado com brometo de etídeo. A presença das bandas intactas das subunidades 18S e 28S do RNA ribossomal (a intensidade da primeira banda cerca de duas vezes menor que a segunda) foi usada como critério para verificar a integridade do RNA.

3.21.3 - Síntese de DNA complementar (cDNA)

Para a síntese de cDNA, 1 µg do RNA total extraído de cada linhagem foi tratado com a enzima RQ1 RNase Free DNase (PROMEGA) por 50 min a 37°C seguido da inativação da DNase a 65°C por 10 min. Para a verificação da ausência de contaminação com DNA após o tratamento com a DNase, o volume de 1 µL da reação com a DNase foi diluído dez vezes e 1 µL desta diluição foi utilizado para a qPCR com os *primers* utilizados para amplificar o gene que codifica a β -tubulina (tubC_FW e tubC_REV). As amostras sem detecção de sinal na qPCR

foram utilizadas para a síntese de cDNA. Assim, os 9 μ L restantes da reação com a DNase foram incubados com 1 μ L de 100 nM de oligo dT por 5 min a 70°C. Após resfriamento a 4°C, o volume de 10 μ L de reação do *kit* Improm-II Reverse Transcriptase (PROMEGA) foi adicionado em cada uma das amostras tratadas com o oligo dT. Esta reação foi incubada a 25°C por 5 min, em seguida 42°C por 60 min e 70°C por 15 min. O volume final de 20 μ L de cada reação foi elevado para 45 μ L com água Nuclease-free (PROMEGA).

3.22 - PCR quantitativo (qPCR)

A PCR em tempo real ou PCR quantitativo (qPCR) é um método que permite a quantificação das cópias de DNA ou cDNA geradas a cada ciclo da reação, através de fluoróforos que produzem um aumento no sinal de fluorescência em proporção direta ao número de moléculas do produto gerado pela PCR. Neste trabalho, as reações da qPCR foram realizadas utilizando a tecnologia SYBR® Green no equipamento Step One Plus – Real-Time PCR System (Applied Biosystems) com o Power UpTM SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems). Esta tecnologia para PCR quantitativo se baseia na afinidade do corante fluorescente SYBR® Green por DNA fita dupla (dsDNA). Ao ocorrer a amplificação da sequência alvo, o corante se liga nos sulcos das fitas duplas de DNA emitindo um sinal fluorescente forte, facilmente reconhecido pelo aparelho (VanGuilder *et al.*, 2008). Todas as reações foram realizadas de acordo com instruções do fabricante.

A padronização dos *primers* foi realizada a partir de uma matriz com doze combinações de concentração de *primers* que variou entre 100, 150, 300, 400, 500 e 600 nM de cada *primer*, forward (FW) e reverse (REV) (tabela 5) usando para a reação 100 ng de DNA genômico (gDNA) de uma linhagem selvagem de *A. fumigatus*. A menor concentração dos *prime*rs capaz de amplificar a maior intensidade de fluorescência foi selecionada para dar seguimento na determinação da eficiência desses *primers* através do coeficiente da reta obtido pelos valores de *Quantification cycles* (Cq) de seis diluições seriais de 1:5, partindo de 300 ng de gDNA de *A. fumigatus*. Assim, com os valores de Cq obtidos na qPCR para cada diluição, foi traçado uma reta obtendo-se a curva e a eficiência do *primer* o qual os valores de R² mais próximo possível de 1 (100%) foram considerados ideais. Uma eficiência de 100% significa que todo molde presente na reação se duplica após cada ciclo térmico, entretanto, fatores como o comprimento, a estrutura secundária e o conteúdo do fragmento amplificado, podem influenciar no valor da eficiência, portanto este valor para ser aceitável, deve encontra-se entre a faixa de 90-110 %.

Mix	Primer Forward (nM)	Primer Reverse (nM)
1	100	100
2	100	150
3	100	300
4	150	100
5	150	150
6	150	300
7	300	100
8	300	150
9	300	300
10	400	400
11	500	500
12	600	600

Tabela 05 – Combinação de concentrações dos *primers* para qPCR para *arfA*, *arfB*, *arlA*, *gcsA* e *gpdA*.

A detecção de amplificação na qPCR utilizando-se o reagente Power UpTM SYBR[®] Green Master Mix (Applied Biosystems) foi realizada com as condições de termociclagem que compreenderam uma etapa inicial a 50°C por 2 min, seguido de 10 min a 95°C e 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 min a 60°C. Os *primers* usados no trabalho foram desenhados através do *software Primer* Express 1.5 (Applied Biosystems, EUA). Foram utilizados *primers* construídos especificamente para o gene normalizador *housekeeping gpdA* e dos genes de interesse, *arfA*, *arfB*, *arlA* e gcsA (tabela 6).

Tabela 06 - Primers utilizados para qPCR dos genes arfA, arfB, arlA e gcsA.

"Primer"	Sequência (5' - 3')	
arfA_qPCR Fw	CGTCGTGCTTGGTACATCC	
arfA_qPCR Rv	TCGATTTCCTCAACGCATC	
arfB_qPCR Fw	CACTGCCCGTATGGAAGAA	
arfB_qPCR Rv	TTCGCAAACACAAGCAACA	
arlA_qPCR Fw	GGGAGCTGCGAGATAGGAA	
arlA_qPCR Rv	TTCTCCGCTTGAAGGGTTT	
gcsA_qPCR Fw	AAGCACCTCCGATTCCTGTGA	
gcsA_qPCR Rv	AGAGAAAGTCTGTCGCGCAT	
gpdA_qPCR Fw	AACATCATTCCCAGCTCGAC	
gpdA_qPCR Rv	ACGTTGGAGGGTAGGAACACG	

O cálculo foi realizado conforme descrição do fabricante e se baseia na derivação da fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$. Os valores de Cq encontrados para cada *primer* foram normalizados e

aplicados na fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$, encontrando-se a expressão relativa dos genes. Os experimentos foram realizados com duas réplicas biológicas e em duplicata.

3.23 – Potencial Zeta

Para avaliar o perfil do potencial de superfície das linhagens deletadas $\Delta arfB1$ e $\Delta arlA2$ frente a linhagem selvagem CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$ adotou-se o protocolo de Potencial Zeta, segundo Wilson e colaboradores (2001).

Uma suspensão em solução salina 1X na concentração de 1 x 10^8 conídios/mL das linhagens deletadas $\Delta arfB1$, $\Delta arlA2$ e selvagem CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$ foi realizada a partir de uma semeadura em meio de cultura YAG em placas de Petri de 90 x 15 mm e incubado por 48 h a 37°C. A suspensão em PBS 1X foi transferida para a cubeta de cristal de eletroforese para potencial zeta e todas as leituras foram realizadas no aparelho Zetasizer Nano (Malvern Instruments). O experimento foi realizado a 25 °C em tréplica biológica e para cada réplica foram realizadas 15 leituras de cada linhagem.

3.24 - Análise estatística

Análise estatística para todos os resultados, exceto teste de virulência, foi baseada no método t de *Student* com um intervalo de confiança de 95% com distribuição bicaudal e variação igual para duas amostras. Valores de p inferiores a 0,05 (p < 0,05) foram considerados significativos e o resultado foi considerado estatisticamente diferente.

Para o teste de virulência, adotou-se o método estatístico Log-rank (Mantel-Cox) para avaliar a significância das curvas de sobrevivência. Valores de p inferiores a 0,05 (p < 0,05) foram considerados significativos e o resultado foi considerado estatisticamente diferente.



4 – Resultados

4.1 - Análises in silico das proteínas ARFs

Neste trabalho são estudados três genes, *arfA*, *arfB* e *arlA*, em *A*. *fumigatus* que codificam proteínas com o domínio *ADP Ribosylation Factor*. Estas proteínas são conservadas em outros organismos eucariotos. Aqui é mostrado o alinhamento com as proteínas ARFs ortólogas em *A*. *nidulans* e no fungo leveduriforme *S*. *cerevisiae* (figura 10).

Neste alinhamento é observada a grande similaridade de sequência entre as espécies, bem como entre os três genes, além dos domínios conservados de miristoilação, ligação e hidrólise do GTP.

Como resultado da análise *in silico*, observou-se que as sequências peptídicas de ArfA, ArfB e ArlA em *A. fumigatus* são 98%, 93% e 100% idênticas com as respectivas proteínas ortólogas em *A. nidulans*. Os alinhamentos de ArfA de *A. fumigatus* com os ortólogos de ArfB e ArlA em *A. nidulans* e *S. cerevisiae*, bem como ArfB de *A. fumigatus* com os ortólogos de ArfA e ArlA em *A. nidulans* e *S. cerevisiae* e o alinhamento de ArlA em *A. fumigatus* com os ortólogos de ArfA e ArfA e ArfB em *A. nidulans* e *S. cerevisiae*, apresentam identidades entre 47% e 76% (tabela 7).

Tabela	07: 4	Análises	de	similarid	ades	das	proteínas	ArfA,	ArfB	e ArlA	em A.	fumigatus	com
seus res	specti	vos ortól	ogo	os em A.	nidul	ans	e S. cerev	isiae					

	ArfA A. fumigatus	ArfB A. fumigatus	ArlA A. fumigatus
ArfA A. nidulans	98%	61%	58%
Arf1 S. cerevisiae	76%	56%	58%
Arf2 S. cerevisiae	76%	56%	56%
ArfB A. nidulans	61%	93%	52%
Arf3 S. cerevisiae	55%	61%	47%
ArlA A. nidulans	56%	53%	100%
Arl1 S. cerevisiae	57%	55%	68%

	V V	
ArlA*AFUA_2G10980	mggslsrlwsffwt-kkeirililgldnagkttllyrlkige-vvttiptigfnvesvty	58
Ar1A*AN5912.2	mggslsrlwsffwt-kkeirililgldnagkttllyrlkige-vvttiptigfnvesvty	58
ARL1*S.cerevisiae	mgnifssmfdklwrsnkelrililgldgagkttilyrlqige-vvttkptigfnvetlsy	59
ARF3*S.cerevisiae	mgnsiskvlgklfg-skemkilmlgldkagkttilyklklnk-iktstptvgfnvetvty	58
ArfB*AFUA_3G12080	mggqvskmlgkifg-tkemrilmlgldaagkttilyklkltnqdvttiptvgfnvesvty	59
ArfB*AN5020.2	mggsvskimgkifg-tkemrilmlgldaagkttilyklkltnqdvttiptvgfnvesvty	59
ARF1*S.cerevisiae	mglfasklfsnlfg-nkemrilmvgldgagkttvlyklklge-vittiptigfnvetvqy	58
ARF2*S.cerevisiae	mglyasklfsnlfg-nkemrilmvgldgagkttvlyklklge-vittiptigfnvetvqy	58
ArfA*Afu1g11730	mgltfsklfdrlwg-rkemrilmvgldaagkttilyklklge-ivttiptigfnvetvey	58
ArfA*AN1126.2	<pre>mglaisklfdrlwg-kkemrilmvgldaagkttilyklklge-ivttiptigfnvetvey ** * : :: **::**: ******:**: * *: *: *:</pre>	58
	V	
ArlA*AFUA_2G10980	rnlnfnvwdlggqtsirpywrcyyantaavifvidstdierlgtaadelaamlneeelrd	118
Ar1A*AN5912.2	rnlnfnvwdlggqtsirpywrcyyantaavifvidstdierlgtaadelaamlneeelrd	118
ARL1*S.cerevisiae	knlklnvwdlggqtsirpywrcyyadtaavifvvdstdkdrmstaskelhlmlqeeelqd	119
ARF3*S.cerevisiae	${\tt knvkfnmwdvggqqrlrplwrhyfpattalifvidssarnrmeeakeelysiigekemen$	118
ArfB*AFUA_3G12080	knvkfnvwdvggqdkirplwrhyysgtqglifvvdssdtarmeearselhkiindremkd	119
ArfB*AN5020.2	knvkfnvwdvggqdkirplwrhyysgtqglifvvdssdtarmdearselhkiindremkd	119
ARF1*S.cerevisiae	knisftvwdvggqdrirslwrhyyrntegvifvvdsndrsrigearevmqrmlnedelrn	118
ARF2*S.cerevisiae	knisftvwdvggqdrirslwrhyyrntegvifvidsndrsrigearevmqrmlnedelrn	118
ArfA*Afu1g11730	kniqftvwdvggqdkirplwrhyfqntqgiifvvdsndrdriveareelqrmlnedelrd	118
ArfA*AN1126.2	kniqftvwdvggqdkirplwrhyfqntqgifvvdsndrdriveareelqrmlnedelrd	118
ArlA*AFUA 2G10980	aallvfankqdqpgakgageisealklg-elrdrnwsivacsaidgkgldegmdwlvqtl	177
Ar1A*AN5912.2	aallvfankqdqpgakgageisealklg-elrdrnwsivacsaidgkgldegmdwlvqtl	177
ARL1*S.cerevisiae	aallvfankqdqpgalsasevskelnlv-elkdrswsivassaikgegitegldwlidvi	178
ARF3*S.cerevisiae	vvllvwankqdlkdamkpqevsdfleleknlknqpwcvigsnalsgqglveglswisnnt	178
ArfB*AFUA_3G12080	alllvfankqdvpghlspeevtnalqln-klkdklwyvapsvategtgifeglawlsnnv	178
ArfB*AN5020.2	alllvfankqdvpghlspdevisalklh-slkdktwyvapsvategtgifeglawlsnnv	178
ARF1*S.cerevisiae	aawlvfankqdlpeamsaaeiteklglh-sirnrpwfiqatcatsgeglyeglewlsnsl	177
ARF2*S.cerevisiae	avwlvfankqdlpeamsaaeiteklglh-sirnrpwfiqstcatsgeglyeglewlsnnl	177
ArfA*Afu1g11730	alllvfankqdlpnamspaeitqqlglq-sltrrawyiqstcattgdglyeglewladal	177
ArfA*AN1126.2	alllvfankqdlpnamspaeitqqlglq-sltrrpwyiqstcattgdglyeglewlaetl	177
	. **:**** *:. * * .: : * : * * *: **: *: :	
ArlA*AFUA 2G10980	gaena 182	
Ar1A*AN5912.2	gaena 182	
ARL1*S.cerevisiae	keeql 183	
ARF3*S.cerevisiae	nvpkk 183	
ArfB*AFUA_3G12080	kqpqk 183	
ArfB*AN5020.2	kvqqpqk 185	
ARF1*S.cerevisiae	knst 181	
ARF2*S.cerevisiae	knqs 181	
ArfA*Afu1g11730	rksnns- 183	
ArfA*AN1126.2	rktgrd- 183	

Figura 10 - Alinhamento da sequência de aminoácidos das ARFs de *A. fumigatus*, *A. nidulans* e *S. cerevisiae*. O quadrado vermelho indica o motivo de miristoilação (Met-Gly-x-x-Ser/Thr). A seta azul indica sitio de ligação do GTP e a seta verde indica sítio de hidrólise do GTP (informações retiradas de Lee e Shaw, 2008). ArfA*Afu1g11730, ArfB*AFUA_3G1280 e ArlA*AFUA_2G10980 representa ArfA, ArfB e ArlA de *A. fumigatus*. ArfA*AN1126.2, ArfB*AN5020.2 e ArlA*AN5912.2 representa ArfA, ArfB e ArlA de *A. nidulans*. ARF1**S. cerevisiae* e ARF2**S.cerevisiae* são ortólogos a ArfA de *A. fumigatus*. ARF3**S. cerevisiae* e ARL1**S. cerevisiae* são ortologos a ArfB e ArlA de *A. fumigatus*, respectivamente.

4.2 - Deleção dos genes arfA, arfB e arlA em A. fumigatus

O estudo da função dos genes *arfA*, *arfB* e *arlA* requerem a construção de linhagens deletadas para os referidos genes. Assim, foram construídos os cassetes de deleção arfA5'UTR::pyrG::arfA3'UTR, arfB5'UTR::pyrG::arfB3'UTR e arlA5'UTR::pyrG::arlA3'UTR para serem transformados em uma linhagem selvagem de A. *fumigatus* e recombinar homologamente nos *loci* dos genes *arfA*, *arfB* e *arlA*, respectivamente. As transformações realizadas para a deleção do gene arfA não geraram nenhuma colônia, isto é, nenhum transformante. Assim, inviabilizando a realização da técnica da recuperação do heterocario para comprovar a essencialidade deste gene para a vida de A. fumigatus. Contudo, foi verificado por microscopia de campo claro na placa de transformação gênica, utilizando o cassete arfA5'UTR::pyrG::arfA3'UTR com a linhagem selvagem de A. fumigatus (CEA17 $\Delta akuB^{ku80} pyrG$ -) que os protoplastos recuperados em meio de cultura YAG acrescido de sorbitol apresentaram tubo germinativo em 96 h de incubação a 37°C e estas células germinadas não progrediram no desenvolvimento (figura 11 B e D). Além disso, os protoplastos controle (sem a transformação do cassete arfA5'UTR::pyrG::arfA3'UTR) não apresentaram tubo germinativo no mesmo período de incubação (figura 11 A e C). Assim, possivelmente a presença do cassete de deleção com a marca auxotrófica pyrG permitiu o desenvolvimento do fungo na ausência de uridina e uracila no meio de cultura. Entretanto, a ausência do gene arfA inviabilizou a progressão no desenvolvimento, isto é, desenvolver de tubo germinativo a uma colônia fúngica. Portanto, é sugerido que arfA seja essencial para o desenvolvimento vegetativo e assexual de A. fumigatus.

As transformações para a deleção dos genes *arfB* e *arlA* na linhagem selvagem CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$ *pyrG*⁻ geraram 2 transformantes com recombinação homóloga para cada gene. A recombinação homóloga do cassete no *locus* de cada gene foi confirmada a partir de PCR-diagnóstico. Foi observado que houve a amplificação utilizando o *primer* com homologia a região *upstream* da sequência do cassete de deleção (arfB_7 Fw ou arlA_7) em conjunto com o *primer* com homologia a região 3' do gene *pyrG* (arfB_4 Rv ou arlA_4). Além disso, foi verificado que o respectivo gene estava ausente do genoma da linhagem utilizando os *primers* com homologia a região inicial (arfB_start Fw ou arlA_start Fw) e terminal (arfB_stop Rv ou arlA_stop Rv) de cada gene. Assim, foi observado que dois candidatos $\Delta arfB$ apresentaram uma banda de 3.8 Kb e ausência de banda que representa a amplificação de *arlA* (figura 12). Já os dois candidatos delta *arlA* apresentaram uma banda de 3.7 Kb e ausência de banda que representa a amplificação de *arlA* (figura 13).

Neste trabalho foram obtidas linhagens duplo mutantes das deleções dos genes arfBe arlA com a deleção do gene gcsA. Assim, os cassetes de deleção de arfB e arlA foram transformadas na linhagem $\Delta gcsA70$ ($\Delta gcsA::pyrG^-$) (Kress et al., resultados não publicados). Como resultado, foram obtidas duas linhagens transformantes $\Delta gcsA::pyrG^ \Delta arfB$ e duas linhagens transformantes $\Delta gcsA::pyrG^ \Delta arlA$. Nesta linhagens duplo-mutantes a recombinação homóloga do cassete de deleção no *locus* de cada gene foi verificada por PCRdiagnóstico, utilizando as mesmas combinações de *primers* empregadas para os mutantes simples. Como resultado, foi obervado que houve amplificação do cassete de deleção no tamanho esperado e ausência das amplificações dos genes arfB (figura 14) e arlA (figura 15) em todos os transformantes testados.

Assim, foi observado que a ausência de *arfA* impediu o desenvolvimento de *A*. *fumigatus* enquanto que a ausência de *arfB*, *arlA* e *gcsA* o desenvolvimento deste fungo.



Figura 11 - Protoplastos controle e transformados com cassete de deleção $\Delta arfA$. A. e C. Protoplastos da linhagem selvagem CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$, inoculados em meio de cultura top Agar acrescido de sorbitol após protocolo de transformação B. e D. Protoplastos da linhagem selvagem CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$ após protocolo de transformação com o cassete de deleção $\Delta arfA$. Microscopia de campo claro após 96 h de incubação a 37°C. Seta vermelha, tubo germinativo.



Figura 12 – PCR-diagnóstico para a confirmação da recombinação homóloga e deleção do gene *arfB*. **1.** *primers* arfB_start Fw e arfB_stop Rv para verificar a presença do gene arfB (800 pb); **2.** *primers* arfB_7 Fw e arfB_4 Rv para verificar a presença do cassete de deleção no locus do gene (3900 pb); **a**, linhagem $\Delta arfB1$; **b**, linhagem $\Delta arfB2$; **c**, linhagem CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$ (*), 1 Kb DNA ladder –(Promega). Gel de agarose 1% em TAE 1X corado com SYBR safe (Invitrogen).



Figura 13 - PCR-diagnóstico para a confirmação da recombinação homóloga e deleção do gene *arlA*. **1.** *primers* arlA_start Fw e arlA_stop Rv para verificar a presença do gene arlA (800 pb) ; **2.** *primers* arlA_7 Fw e arlA_4 Rv para verificar a presença do cassete de deleção no locus do gene (4000 pb) **a**, linhagem $\Delta arlA2$; **b**, linhagem $\Delta arlA3$; **c**, linhagem CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$;; (*), 1 Kb DNA ladder –(Promega). Gel de agarose 1% em TAE 1X corado com SYBR safe (Invitrogen).



Figura 14 - PCR-diagnóstico para a confirmação da recombinação homóloga e deleção do gene *arfB* em uma linhagem AgcsA pyrG-. 1. a, linhagens AgcsAarfB1; b, linhagem AgcsAarfB2; c, linhagem CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$; d, linhagem AgcsA70. 1 (a, b, c, d), *primers* arfB_7 Fw e arfB_4 Rv para verificar a presença do cassete de deleção no *locus* do gene *arfB* (3900 pb) . 1 (e, f, g, h), *primers* arfB_start Fw e arfB_stop Rv para verificar a presença do gene *arfB* (800 pb); 2. (a, b, c, d), *primers* gcsA_5 Fw e gcsA_4 Rv para verificar a presença do cassete de deleção no *locus* do gene *gcsA* (3900 pb); 2. (a, b, c, d). *primers* gcsA_start Fw e gcsA_stop Rv para verificar a presença do gene *gcsA* (1300 pb) (*) 1 Kb DNA ladder –(Promega). Gel de agarose 1% em TAE 1X corado com SYBR safe (Invitrogen).



Figura 15 - PCR-diagnóstico para a confirmação da recombinação homóloga e deleção do gene *arlA* em uma linhagem AgcsA. 1. a, linhagens AgcsA arlA2; b, linhagem AgcsA arlA3; c, linhagem CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$; d, linhagem AgcsA70. 1 (a, b, c, d), primers arlA_7 Fw e arlA_4 Rv para verificar a presença do cassete de deleção no *locus* do gene *arlA* (4000 pb); 1 (e, f, g, h), primers arlA_start Fw e arlA_stop Rv para verificar a presença do gene *arlA* (800 pb); 2 (a, b, c, d), primers gcsA_5 Fw e gcsA_4 Rv para verificar a presença do cassete de deleção no *locus* do gene gcsA (3900 pb); 2 (a, b, c, d), primers gcsA_start Fw e gcsA_stop Rv para verificar a presença do gene gcsA (1300 pb) (*) 1 Kb DNA ladder –(Promega). Gel de agarose 1% em TAE 1X corado com SYBR safe (Invitrogen).



Figura 16 – PCR-diagnóstico para confirmar a inserção do cassete de complementação do gene *arfB* fusionado ao GFP. 1. Amplificação da construção *GFP::pyrG* (2,6 Kb), utilizando os *primers* GFP_Fw e pyrG_Rv; a, linhagem arfB::GFP3; b, linhagem arfB::GFP4; c, controle negativo CEA17 Δ akuB^{ku80}; d, controle positivo linhagem prx::GFP. 2. Amplificação do cassete *arfB::GFP* (4,6 Kb), utilizando os *primers* arfB_1GS e pyrG_Rv; a, linhagem arfB::GFP3; b, linhagem arfB::GFP4; c, controle negativo CEA17 Δ akuBku80; (*)1Kb Ladder (Sinapse Inc).



Figura 17 – PCR-diagnóstico para confirmar a inserção do cassete de complementação do gene *arlA* fusionado ao GFP. 1. Amplificação da construção *GFP::pyrG* (2,6 Kb), utilizando os *primers* GFP_Fw e pyrG_Rv;a,. linhagem *arlA*::GFP1; b, linhagem *arlA*::GFP2; c, controle negativo CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$; d, controle positivo linhagem *prx*::GFP. 2. Amplificação do cassete *arlA*::GFP (4,5 Kb), utilizando os *primers* arlA_1GS e pyrG_Rv; a, linhagem *arlA*::GFP1; b, linhagem *arlA*::GFP2; c, controle negativo CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$; (*)1Kb Ladder (Sinapse Inc).

4.3 - Caracterização macromorfológica das linhagens arf deletadas

As linhagens deletadas *arfB* ($\Delta arfB1$, $\Delta arfB2$), *arlA* ($\Delta arlA2$, $\Delta arlA3$), *gcsA* ($\Delta gcsA70$) e duplo mutantes deletadas *gcsA arfB* ($\Delta gcsA\Delta arfB1$, $\Delta gcsA\Delta arfB2$), e *gcsA arlA* ($\Delta gcsA\Delta arlA2$ e $\Delta gcsA\Delta arlA3$) foram submetidas a análise fenotípica macromorfológica. Foi observado que o aspecto, cor e superfície das colônias gigantes de cada linhagem estão preservadas, como também observado para a linhagem selvagem parental CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$ (figura 18 e 19). Nas figuras 20 e 21, o diâmetro das colônias gigantes de cada linhagem que foram medidos a cada 24 h até completar 96 h de incubação. Os diâmetros das colônias das linhagens deletadas *arfB*, *gcsA* e duplo mutantes deletadas *arfB gcsA* foram semelhantes entre si em cada tempo do experimento (figura 19). Entretanto, o diâmetro das colônias gigantes das linhagem selvagem parental CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$ e $\Delta gcsA$ (p < 0,05) (figura 21). Neste trabalho, observou-se que a linhagem $\Delta arlA$ e $\Delta gcsA \Delta arlA$ apresentam redução do diâmetro de crescimento



Figura 18 – Colônia gigante das linhagens $\Delta arfB$, $\Delta gcsA$, CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$ e duplo mutantes $\Delta arfB\Delta gcsA$. 1x10⁶ conídios/mL das linhagens deletadas $\Delta arfB1$, $\Delta arfB2$, $\Delta gcsA$, $\Delta gcsA\Delta arfB1$, $\Delta gcsA\Delta arfB2$ e selvagem CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$, inoculados em meio de cultura YAG e incubados a 37°C por 48 h.



Figura 19 - Diâmetro da colônia gigante das linhagens $\Delta arfB$, $\Delta gcsA$, CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$ e duplo mutantes $\Delta arfB\Delta gcsA$. 1x10⁶ conídios/mL das linhagens deletadas $\Delta arfB1$, $\Delta arfB2$, $\Delta gcsA$, $\Delta gcsA\Delta arfB1$, $\Delta gcsA\Delta arfB2$ e selvagem CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$, inoculados em meio de cultura YAG e incubados a 37°C por 48 h. p > 0,05.



Figura 20 – Colônia gigante das linhagens $\Delta arfB$, $\Delta gcsA$, **CEA17** $\Delta akuB^{ku80}$ e duplo mutantes $\Delta arlA\Delta gcsA$. 1x10⁶ conídios/mL das linhagens deletadas $\Delta arlA2$, $\Delta arlA3$, $\Delta gcsA$, $\Delta gcsA\Delta arlA3$, $\Delta gcsA\Delta arlA4$ e selvagem CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$, inoculados em meio de cultura YAG e incubados a 37°C por 48 h.



Figura 21 - Diâmetro da colônia gigante das linhagens $\Delta arfB$, $\Delta gcsA$, CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$ e duplo mutantes $\Delta arlA\Delta gcsA$. 1x10⁶ conídios/mL das linhagens deletadas $\Delta arlA2$, $\Delta arlA3$, $\Delta gcsA$, $\Delta gcsA\Delta arlA3$, $\Delta gcsA\Delta arlA4$ e selvagem CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$, inoculados em meio de cultura YAG e incubados a 37°C por 48 h. p < 0.05.

4.4 - Caracterização micromorfológica das linhagens ΔarfB e ΔarlA

Para a caracterização micromorfológica das linhagens $\Delta arfB1$, $\Delta arfB2$, $\Delta arlA2$, $\Delta arlA3$, $\Delta gcsA70$, $\Delta gcsA\Delta arfB1$, $\Delta gcsA\Delta arfB2$ e a linhagem selvagem CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$ foi realizado o microcultivo a fim de avaliar estruturas de reprodução assexual do fungo (vesícula, fiálides e conídios) (figura 22). Como resultado foi observado que as linhagens $\Delta arfB$ e $\Delta gcsA70$ não apresentam diferença fenotípica quanto a estrutura do conidióforo, quando comparado com a linhagem selvagem CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$. Foi também avaliada a produção de conídios onde as linhagens $\Delta arfB$ apresentaram cadeias mais longas de conídios em 24 h de desenvolvimento (figura 22). Os duplos mutantes $\Delta gcsA\Delta arfB1$ e $\Delta gcsA\Delta arfB2$ apresentaram desestruturação do conidióforo, bem como redução da quantidade de fiálide e, por conseguinte, de conídios. Neste trabalho observou-se alterações nas estruturas dos conidióforos a partir das deleções de *arfB* e dupla deleções deste gene com *gcsA* (ARF-GAP).



Figura 22 - Conidióforos das linhagens $\Delta arfB$, $\Delta gcsA$ e $\Delta arfB\Delta gcsA$ em 24 h, 48 h e 72 h de incubação. Microcultivo em meio de cultura YAG e incubação a 37°C. Microscopia de campo claro (aumento: 1000X) corado com azul de lactofenol. Barra de escalas, 10 µm.

Como resultado para as linhagens $\Delta arlA$, nota-se majoritariamente conidióforos sem fiálides em 24 h de incubação, o que se assemelha a linhagem selvagem e $\Delta gcsA70$ para este período (figura 23). Em 48 e 72 h de desenvolvimento, nota-se desestruturação no conidióforo, bem como redução na produção de fiálides e, em decorrência disso, além da redução na produção de conídios, comparado com a linhagem selvagem (figura 23). Nas linhagens duplo mutante $\Delta gcsA \Delta arlA2$ e $\Delta gcsA \Delta arlA3$, além da desestruturação do conidióforo e redução de fiálides em todos os conidióforos, houve a presença de conidióforos com o desenvolvimento atípico das fiálides (figura 23). Neste trabalho observou-se alterações nas estruturas dos conidióforos a partir das deleções de *arlA* e dupla deleções deste gene com *gcsA* (ARF-GAP).



Figura 23 - Conidióforos das linhagens $\Delta arlA$, $\Delta gcsA$ e $\Delta arlA \Delta gcsA$ em 24 h, 48 h e 72 h de incubação. Microcultico em meio de cultura YAG e incubação a 37°C. Microscopia de campo claro (aumento: 1000X) corado com azul de lactofenol. Barra de escalas, 10 µm.

4.5 - Teste de germinação dos conídios das linhagens deletadas arfB e arlA

Diante da desestruturação dos conidióforos evidenciados na ausência das ARFs, optou-se por verificar a etapa inicial de desenvolvimento das linhagens deletadas *arfB* ($\Delta arfB1$ e $\Delta arfB2$), *arlA* ($\Delta arlA2$ e $\Delta arlA3$), *gcsA* ($\Delta gcsA70$), *arfB gcsA* ($\Delta gcsA\Delta arfB1$ e $\Delta gcsA\Delta arfB2$), *arlA gcsA* ($\Delta gcsA\Delta arlA2$ e $\Delta gcsA\Delta arlA3$) e os genes *arfB* e *arlA* fusionados ao GFP (*arfB*::GFP3, *arfB*::GFP4, *arlA*::GFP1 e *arlA*::GFP2) foi avaliada a taxa de germinação, isto é, a emissão do tubo germinativo dos conídios de cada linhagem a 37°C e em meio YG (figuras 25 e 26). Como resultado foi observado que em 2, 4, 6 e 8 h de incubação, a linhagem selvagem
apresentou, respectivamente, 0, 20, 77,5 e 91,5% de conídios germinados (figuras 25 e 26). As linhagens deletadas *arfB arlA*, *gcsA*, *arfB gcsA*, *arlA gcsA*, *arfB::GFP* e *arlA::GFP* apresentaram porcentagens semelhantes de conídios germinados (p>0,05) (figuras 25 e 26). Entretanto, os conídios germinantes das linhagens deletada *arlA* ($\Delta arlA2$ e $\Delta arlA3$) e duplomutantes deletados $\Delta gcsA \Delta arlA2$ e $\Delta gcsA \Delta arlA3$, apresentaram em 6 e 8 h de incubação o perfil alterado de emissão de tubo germinativo, semelhante a polarização dicotômica (figura 24). Portanto, neste trabalho as linhagens deletadas não apresentaram alterações no padrão de germinação, porém a linhagem $\Delta arlA$ apresenta polarização docotômica.



Figura 24 – Tubo germinativo dos conídios das linhagens CEA17*AakuB*^{ku80} **e mutantes.** Conídios das linhagens $\Delta arfB1$, $\Delta arfB2$, $\Delta arlA2$, $\Delta arlA3$, $\Delta gcsA$, $\Delta gcsA\Delta arfB1$, $\Delta gcsA\Delta arfB2$, $\Delta gcsA\Delta arlA2$, $\Delta gcsA\Delta arlA3$ e CEA17*AakuB*^{ku80} de *A. fumigatus* foram inoculados em meio de cultura YG e incubados a 37°C por 2, 4, 6, e 8 h. Microscopia de campo claro (aumento de 1000 X). Barra de escalas, 10 µm. Setas pretas, polarização dicotômica.



Figura 25 - Taxa de emissão do tubo germinativo (%) das linhagens *arfB* **deletadas e duplo mutantes.** Conídios das linhagens $\Delta arfB1$, $\Delta arfB2$, arfB::GFP3, arfB::GFP4, $\Delta gcsA70$, $\Delta gcsA\Delta arfB1$, $\Delta gcsA\Delta arfB2$, e CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$ de *A. fumigatus* foram inoculados em meio de cultura YG e incubados a 37°C por 2, 4, 6, e 8 h. (100 X). Microscopia de campo claro (aumento de 1000 X). Foram contadas 100 células para cada condição em cada réplica biológica..



Figura 26 - Taxa de emissão do tubo germinativo (%) das linhagens *arlA* **deletadas e duplo mutantes.** Conídios das linhagens $\Delta arlA2$, $\Delta arlA3$, arlA::GFP1, arlA::GFP2, $\Delta gcsA70$, $\Delta gcsA\Delta arlA2$, $\Delta gcsA\Delta arlA3$, e CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$ de *A. fumigatus* foram inoculados em meio de cultura YG e incubados a 37°C por 2, 4, 6, e 8 h. (100 X). Microscopia de campo claro (aumento de 1000 X). Foram contadas 100 células para cada condição em cada réplica biológica.

4.6 - Microscopia confocal

4.6.1 - FM4-64

O corante anfifílico FM4-64 é utilizado para a investigação de endocitose e tráfego de vesículas em células eucarióticas vivas. Este é um corante seletivo de lipídios que é internalizado por endocitose desde a membrana plasmática até as organelas (Vida e Emr, 1995).

Assim, FM4-64 foi utilizado para investigar a distribuição dos lipídicos na linhagem selvagem CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$ e mutantes $\Delta arfB1$ e $\Delta arlA2$. Foi observado que os germinados da linhagem selvagem parental apresentaram a marcação da membrana plasmática e vacúolos com o corante FM4-64 (figura 27). Observou-se, que na ausência do gene *arlA*, os corpos lipídicos permanecem amplamente distribuídos no citoplasma. Nas linhagens mutantes $\Delta arfB1$ e $\Delta arlA2$ foi observado que não houve a marcação de lipídicos na membrana plasmática (figura 27).



Figura 27 - Microscopia confocal de conídios germinados de *A. fumigatus* **corados com FM4-64.** Visualização de membrana celular e vesículas nas linhagens CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$, $\Delta arfB$ e $\Delta arlA$. DIC-*differential interference contrast microscopy*; FM4-64, corante fluorescente vermelho estirilo lipofílico N- (3-trietilamoniumpropil)-4-(p-dietilaminofenil hexatrienil) piridínio dibrometo; MERGE, sobreposição das imagens DIC e FM4-64.

4.6.1.1 - Potencial Zeta

A fim de analisar o perfil de cargas e potencial de superfície das linhagens deletadas frente a selvagem, adotou-se o protocolo de Potencial Zeta. Pois, o corante lipofílico FM4-64 possui maior afinidade por superfícies mais negativas. Como resultado, observou-se que a linhagem selvagem apresenta média de carga de -25,7 mV. Enquanto que as linhagens *arf*B e *arl*A deletadas apresentam médias de cargas menos negativas, respectivas de -10,6 e -11,9 mV (figura 28). Assim, neste trabalho as linhagens deletadas apresentaram superfície celular menos negativa, comparadas com a linhagem selvagem.



Figura 28 - Potencial Zeta. Linhagens selvagem, arfB e arlA deletadas submetidas à avaliação de carga e

potencial de superfície por meio de potencial zeta (Zetasizer Nano - Malvern Instrumen.

Result quality Good

Zeta Potential (mV): -11,9

4.6.1.2 – Higromicina B

Result quality Good

Zeta Potential (mV): -10,6

A fim de analisar o perfil de influxo de íons nas linhagens deletadas frente a linhagem selvagem, realizou-se teste de sensibilidade *drop out* com íon tóxico higromicina B

sem e com a adição de cloreto de potássio. Como resultado foi observado que as linhagens $\Delta arfB$ e $\Delta arlA$ foram sensíveis a presença do íon tóxico higromicina B (figura 29). Entretanto, quando o cloreto de potássio esta presente ocorre a recuperação do desenvolvimento do microrganismo (figura 29). Portanto, as linhagens $\Delta arfB$ e $\Delta arlA$ apresentaram alterações na regulação do influxo de íons.



Figura 29 – Teste de sensibilidade com higromicina B pela técnica *drop out*. Efeito do íon tóxico higromicina B (0,1 mg/mL) e a recuperação do mesmo pela adição de KCl (1 mM).Linhagens $\Delta arfB1$, $\Delta arfB2$, $\Delta gcsA70$, $\Delta gcsA\Delta arfB1$, $\Delta gcsA\Delta arfB2$ e a linhagem selvagem CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$ em meio de cultura YAG a 37°C após 48 h de incubação. Os inóculos foram 5 µL das concentrações 1 x 10⁸, 1 x 10⁷, 1 x 10⁶, 1 x 10⁵ e 1 x 10⁴ conídios/mL. C, controle sem droga; Hig, higromicina B; Hig+KCl, higromicina B mais cloreto de potássio.

4.6.2 - Filipin

O corante fluorescente Filipin é utilizado para corar domínios de membrana ricos em esteróis. Em *Aspergillus* sp. marca pontos proeminentes nas pontas das hifas e um anel no local dos septos (Pearson *et al.*, 2004). Além disso, filipin é um marcador fluorescente de ergosterol, utilizado para monitorar a polarização do tubo germinativo em fungos filamentosos (Leeuwen *et. al.*, 2008). Foi utilizado o corante Filipin para investigar a distribuição dos esteróis nos germinado das linhagens CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$, $\Delta arfB1$ e $\Delta arlA2$. Na linhagem selvagem CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$ e $\Delta arfB1$ foi observado pontos predominantes nas pontas das hifas, que localiza o centro de controle de crescimento apical (*Spitzenkörper*). Na linhagem $\Delta arlA$ os pontos predominantes na ponta da hifa não estão presentes (figura 30). Portanto é possível indicar que a linhagem $\Delta arlA$ não apresenta acumulo de ergosterol na região de crescimento apical.



Figura 30 - Microscopia confocal de conídios germinados de *A. fumigatus* **corados com Filipin.** Visualização de ergosterol de membrana celular e vesículas nas linhagens CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$, $\Delta arfB$ e $\Delta arlA$. DIC, *differential interference contrast microscopy*; Filipin, corante de ergosterol; MERGE, sobreposição das imagens DIC e Filipin. (*) indica acúmulo de esteróis no centro de controle do crescimento apical.

4.7 - Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para avaliar o aspecto e espessura da parede celular dos conídios em linhagens $\Delta arfB1$ e $\Delta arlA2$ frente a linhagem selvagem CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$ foi realizado microscopia eletrônica de transmissão. A parede dos conídios da linhagem selvagem parental CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$ e as mutantes $\Delta arfB1$ e $\Delta arlA2$ apresentaram a média de 0,20 µm, 0,25 µm e 0,16 µm, respectivamente. Assim, é observado que a parede celular dos conídios de $\Delta arfB1$ estão aumentadas (p<0,05), enquanto para $\Delta arlA2$ a espessura está diminuída (p<0,05) (figuras 31 e 32).



Figura 31 - Microscopia eletrônica de transmissão de conídios das linhagens CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$, $\Delta arfB1$ e $\Delta arlA2$. Aspectos e espessura da parede celular de conídios das linhagens CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$, $\Delta arfB1$ e $\Delta arlA2$ a partir de foto micrografias de microscopia eletrônica de transmissão.



Figura 32 – **Espessura da parede celular de conídios CEA17** $\Delta akuB^{ku80}$, $\Delta arfB1$ e $\Delta arlA2$. Medições da espessura de conídios das linhagens CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$, $\Delta arfB1$ e $\Delta arlA2$ a partir de foto micrografias de microscopia eletrônica de transmissão. O resultado representa a média da espessura de 4 quadrantes de 10 conídios.

4.8 - Análise do perfil de sensibilidade a variações de pH e temperatura

O pH e temperatura são importantes fatores que determinam a capacidade de adaptação, sobrevivência e patogenicidade de um microrganismo. Assim, a linhagem selvagem parental CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$ e as mutantes $\Delta arfB1$ e $\Delta arlA2$ foram inoculadas em meio de cultura com diferentes pHs e em diferentes temperaturas. O diâmetro da colônia da linhagem $\Delta arfB1$ é semelhante a linhagem selvagem na temperatura de 28°C em 24, 48, 72 e 96 h de incubação nos pHs 5,5, 6,5 e 8,5. O mesmo ocorreu em 37°C, excetuando os pHs 5,5 e 8,5, onde a linhagem deletada apresentou redução de diâmetro da colônia de 1,6 cm em 96 h de incubação (p < 0,05) (figura 33). Em 45°C e no pH 5,5 a linhagem $\Delta arfB1$ apresentou um menor diâmetro de colônia em 48 e 96 h, a uma diferença em diâmetro de 1,0 cm e 2,4 cm, respectivamente (p < 0,05). Em 45°C no pH 6,5 notou-se diâmetro de colônia da linhagem $\Delta arfB1$ em 72 e 96 h de 0,8 cm e 1,4 cm (p < 0,05), respectivamente. Ainda em 45°C, porém no pH 8,5 a linhagem deletada $\Delta arfB1$ apresentou diâmetro de colônia reduzido em 0,7 cm, 0,9 cm e 1,2 cm em 48, 72 e 96 h (p < 0,05), respectivamente (figura 33). Neste trabalho, observou-se redução do diâmetro do crescimento da linhagem $\Delta arfB$ nos pHs mais extremos e temperatura mais elevada.



Figura 33 - Linhagem $\Delta arfB$ apresentou reduzido diâmetro da colônia em diferentes temperaturas e pHs em comparação ao selvagem CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$. As linhagens foram inoculadas em meio de cultura MM com os pHs 5,5 (A; D e G) 6,5 (B; E e H) e 8,5 (C; F e I). Todos incubados a 28°C (A; B e C) 37°C (D; E e F) e 45°C (G; H e I). Os diâmetros das colônias foram medidos a cada 24 h e até 96 h de incubação.

Como resultado para a linhagem $\Delta arlA2$ diante dos testes de crescimento da colônia em diferentes temperaturas e pHs, observou-se que houve semelhança quando comparado com a linhagem selvagem CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$ nas condições de temperatura a 28°C e 37°C e em todas as variações de pH. É razoável apontar que houve redução de diâmetro de crescimento da linhagem $\Delta arlA2$ de 0,5 e 0,6 cm a 37°C e pH 6,5 em 72 e 96 h, respectivamente; redução, também, de 0,4 cm e 1,1 cm em 45°C e pH 5,5 em 48 h e 96 h, respectivamente (p < 0,05). O mesmo foi possível observar em 72 h de incubação e no pH 8,5 uma redução de diâmetro de crescimento da linhagem deletada em 0,4 cm ainda em 45°C (p < 0,05) (figura 34). Neste trabalho, observou-se recuperação de fenótipo do diâmetro do crescimento da linhagem $\Delta arlA$ em temperaturas mais baixas e a 37°C nos pHs mais extremos.



Figura 34 - Linhagem $\Delta arlA2$ apresentou reduzido diâmetro da colônia em diferentes temperaturas e pHs em comparação ao selvagem CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$. As linhagens foram inoculadas em meio de cultura MM com os pHs 5,5 (A; D e G) 6,5 (B; E e H) e 8,5 (C; F e I). Todos incubados a 28°C (A; B e C) 37°C (D; E e F) e 45°C (G; H e I). Os diâmetros das colônias foram medidos a cada 24 h e até 96 h de incubação.

4.9 - Teste de sensibilidade por diluição em ágar pela técnica drop out

4.9.1 - Teste de sensibilidade a compostos químicos que afetam células eucarióticas com

linhagens arfB deletados e duplo-mutantes

O perfil de sensibilidade a diferentes drogas foi testado para as linhagens $\Delta arfB1$, $\Delta arfB2$, $\Delta gcsA70$, $\Delta gcsA\Delta arfB1$, $\Delta gcsA\Delta arfB2$ e a linhagem selvagem CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$. sendo esta última controle do experimento. Como resultado, observou-se aumento da sensibilidade das linhagens $\Delta arfB1$ e $\Delta arfB2$, quando comparada à linhagem controle, frente a miriocina (20 µg/mL), 5-flucitosina (1,5 ng/mL) e congo red (100 µg/mL). Notou-se, também, que a mesma linhagem apresenta aumento da resistência frente a farnesol (2 mM) (figura 35). Quanto as linhagens duplo-mutantes $\Delta gcsA\Delta arfB1$ e $\Delta gcsA\Delta arfB2$, ambas apresentaram sensibilidade a *congo red* (100 µg/mL), miriocina (20 µg/mL) e 5-flucitosina (1,5 ng/mL) (figura 35). Estas ainda apresentaram perfil de resistência frente a brefeldin A (40 µg/mL). Não houve alterações visíveis ou detectáveis em todas as linhagens frente a anfotericina B (750 ng/mL), anidulafungina (15 ng/mL), caspofungina (25 µg/mL), calcofluor white (75 µg/mL), fitoesfingosina (600 ng/mL), itraconazol (350 ng/µL), menadiona (4 µM), lovastatina (2 μ g/mL). Excetuando brefeldin A (40 μ g/mL), que para Δ arfB1 o perfil foi inalterado (figura 35). Neste trabalho, as linhagens $\Delta arlA$ e duplo mutantes com $\Delta gcsA$ apresentaram alterações no perfil de sensibilidade e resistência a drogas cujos alvos são os mais diversos componentes celular.

4.9.2 - Teste de sensibilidade a compostos químicos que afetam células eucarióticas com a linhagem *∆arlA*

O perfil de sensibilidade a diferentes drogas foi testado para as linhagens $\Delta arlA2$, $\Delta arlA3$, $\Delta gcsA70$, $\Delta gcsA\Delta arlA2$, $\Delta gcsA\Delta arlA3$, além do CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$ como controle do experimento. Como resultado, observou-se aumento da sensibilidade das linhagens $\Delta arlA2$ e $\Delta arlA3$, quando comparada à linhagem controle, frente a *congo red* (100 µg/mL). Notou-se ainda que estas linhagens apresentam aumento da resistência a farnesol (2 mM), 5-flucitosina (1,5 ng/mL), miriocina (20 µg/mL) e brefeldin A (40 µg/mL). As linhagens $\Delta gcsA\Delta arlA2$ e $\Delta gcsA\Delta arlA3$ apresentaram perfil de sensibilidade a *congo red* (100 µg/mL) e 5-flucitosina (1,5 ng/mL). Ainda nestas linhagens, perfil de resistência a miriocina (20 µg/mL) e brefeldin A (40 µg/mL). Não houve alterações visíveis ou detectáveis em todas as linhagens frente a anfotericina B (750 ng/mL), anidulafungina (15 ng/mL), caspofungina (25 µg/mL), *calcofluor white* (75 µg/mL), fitoesfingosina (600 ng/mL), itraconazol (350 ng/µL), menadiona (4 µM) e lovastatina (2 µg/mL) (figura 36). Neste trabalho, as linhagens $\Delta arlB$ e duplo mutantes com $\Delta gcsA$ apresentaram alterações no perfil de sensibilidade e resistência a drogas cujos alvos são os mais diversos componentes celular.



Figura 35 - Teste de sensibilidade da linhagem $\Delta arfB$ deletados, duplo mutantes e complementados. Efeito das drogas testadas frente as linhagens $\Delta arfB1$, $\Delta arfB2$, $\Delta gcsA70$, $\Delta gcsA\Delta arfB1$, $\Delta gcsA\Delta arfB2$ e a linhagem selvagem CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$ em meio de cultura YAG a 37°C após 48 h de incubação. Os inóculos foram 5 µL das concentrações 1 x 10⁸, 1 x 10⁷, 1 x 10⁶, 1 x 10⁵ e 1 x 10⁴ conídios/mL. . C, controle; ITR, itraconazol; ANI, anidulafungina; CR, *congo red*; MEN, menadiona; CW, *calcofluor white*; CAS, caspofungina; LOV, lovas; fitoesfingosina; FAR, farnesol; 5FC, 5-flucitosina; MIR, miriocia; BRE, brefeldin A.



Figura 36 - Teste de sensibilidade da linhagem *AarlA* **deletados, complementados e duplo mutantes.** Efeito das drogas testadas frente as linhagens $\Delta arlA2$, $\Delta arlA3$, $\Delta gcsA70$, $\Delta gcsA\Delta arlA2$, $\Delta gcsA\Delta arlA3$, além do CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$ em meio de cultura YAG a 37°C após 48 h de incubação. Os inóculos foram 5 uL das concentrações 1 x 10⁸, 1 x 10⁷, 1 x 10⁶, 1 x 10⁵ e 1 x 10⁴ conídios/mL. C, controle; ITR, itraconazol; ANI, anidulafungina; CR, *congo red*; MEN, menadiona; CW, *calcofluor white*; CAS, caspofungina; LOV, lovastatina; FIT, fitoesfingosina; FAR, farnesol; 5FC, 5-flucitosina; MIR, miriocina; BRE, brefeldin A.

4.10 - Biofilme

O impacto da deleção dos genes estudados (*arfB* e *arlA*) e dupla deleção com *gcsA*70 foi observado frente a capacidade de formar biofilme em superfície de polipropileno. Assim, a biomassa do biofilme foi avaliada pelo método colorimétrico com cristal violeta. Como resultado, a linhagem selvagem e a linhagem $\Delta gcsA$ 70 apresentaram médias de absorbância de 1,71 e 1,89, respectivamente. As linhagens $\Delta arfB1$, $\Delta arfB2$, $\Delta gcsA\Delta arfB1$, $\Delta gcsA\Delta arfB2$, *arfB*::GFP3 e *arfB*::GFP4 apresentaram médias de absorbância de 1,58; 1,66; 1,50; 1,35; 1,66 e 1,72, respectivamente (figura 37).



Figura 37 – Análise de formação de biofilme com as linhagens *arfB* deletada, complementados e duplo mutantes. Análise da formação de biofilme a partir de cristal violeta e leitura da absorbância a 570nm frente as linhagens $\Delta arfB1$, $\Delta arfB2$, $\Delta gcsA70$, $\Delta gcsA\Delta arfB1$, $\Delta gcsA\Delta arfB2$, arfB::GFP3 e arfB::GFP4 e controle CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$ em meio de cultura YAG a 37°C após 48 h de incubação.

Quanto as linhagens $\Delta arlA2$, $\Delta arlA3$, $\Delta gcsA\Delta arlA2$, $\Delta gcsA\Delta arlA3$, arlA::GFP1 e arlA::GFP2 apresentaram médias de absorbância de 2,0; 1,90; 1,48; 1,60; 1,87 e 1,61, respectivamente. Portanto, é razoável afirmar que as linhagens $\Delta gcsA70$, $\Delta arlA2$ e $\Delta arlA3$ são altamente formadoras de biofilme (p<0,05), enquanto que as linhagens duplo mutantes tanto para arfB, quanto para arlA apresentaram médias de biomassa abaixo da linhagem selvagem (p<0,05). As demais linhagens apresentam perfil similar ao controle, bem como as linhagens complementadas (figura 38).



Figura 38 – Análise de formação de biofilme com as linhagens *arlA* deletada, complementados e duplo mutantes. Análise da formação de biofilme a partir de cristal violeta e leitura da absorbância a 570nm frente as linhagens $\Delta arlA2$, $\Delta arlA3$, $\Delta gcsA70$, $\Delta gcsA\Delta arlA2$, $\Delta gcsA\Delta arlA3$, arlA::GFP1 e *arlA*::GFP2 e controle CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$ em meio de cultura YAG a 37°C após 48 h de incubação.

4.11 - Teste de virulência em Galleria mellonella

A fim de avaliar o perfil de virulência das linhagens $\Delta arfB$ e $\Delta arlA$ frente à linhagem selvagem CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$ e a o controle negativo (PBS), realizou-se testes a partir de infecção artificial em 10 larvas de sexto instar de G. mellonella por linhagem deletada e PBS. Como resultado observou-se que a linhagem selvagem iniciou as mortes no segundo dia após a infecção e manteve quatro larvas vivas até o final do experimento. A linhagem arfB deletada iniciou as mortes no segundo dia após a inoculação artificial e um total de cinco larvas permaneceram vivas até o término do experimento. A linhagem $\Delta arfB$ iniciou as mortes no segundo dia após a inoculação artificial e um total de cinco larvas permaneceram vivas até o término do experimento. A linhagem *AarlA* também iniciou as mortes larvais no segundo dia, seguido de duas mortes no segundo dia, porém nenhuma larva inoculada com a linhagem $\Delta arlA$ sobreviveu ao experimento de virulência. Todas as outras larvas dos demais inóculos, permaneceram vivas até completar todo o ciclo natural de metamorfoses. Portanto A. fumigatus é um fungo patogênico em modelo experimental de G. mellonella, porém na ausência do gene arlA do fungo, torna-o mais patogênico ao inseto (p < 0.05). Utilizou-se como controle do experimento larvas inoculadas com PBS, as quais se mantiveram vivas, capazes de completar todo o ciclo natural de metamorfoses (p < 0.05) (figura 39) e sem alterações morfológicas, tais como melanização e necrose. O aumento da melanização ou pontos pretos na cutícula do inseto é resultado da clivagem de pro-fenoloxidase em fenoloxidase-ativa. Este último é um processo natural de estresse por insetos, a fim de coibir o crescimendo de patógenos na hemocele. (Borghi et al., 2014). A linhagem $\Delta arf B1$ apresentou uma taxa de mortalidade similar a linhagem selvagem CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$ (p > 0,05). Entretanto, a ausência do gene *arlA* em *A*. *fumigatus* torna o fungo menos susceptivel ao sistema imune do hospedeiro (p < 0,05).



Figura 39 - Taxa de sobrevivência larval frente as linhagens $\Delta arfB1$, $\Delta arlA2$, CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$ e PBS. Larvas de *Galleria mellonella* submetidas a infecção artificial com as linhagens $\Delta arfB1$, $\Delta arlA2$, CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$ e PBS. (n = 10 por linhagem) Leitura de morte e sobrevivência a cada 24 h. O experimento é representativo de 3 réplicas biológicas de fungos e larvas.

4.12. Localização da proteína ArfB e ArlA em A. fumigatus

A localização das proteínas ArfB e ArlA foram realizadas a partir da observação das linhagens *arfB*::GFP3 e *arlA*::GFP1, respectivamente, por meio de microscopia de fluorescência devidamente configurado para a fluorescência GFP. Como controle negativo para fluorescência foi utilizada a linhagem CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$. Como resultado para *arfB*::GFP3, pode-se observar que esta proteína, em 8 h de incubação a 30°C e em YG, se encontra dispersa em todo o tubo germinativo, porém com maior intensidade de fluorescência no centro do conídio germinado. Na reprodução assexuada, após 24 h de crescimento nas mesmas condições, as proteínas se encontram mais concentradas nas extremidades das hifas e em 48 h é possível detectá-las no ápice do conidióforo e nas bordas dos conídios. Para a linhagem *arlA*::GFP1, em 8, 24 e 48 h de incubação a 30°C e em YAG, as proteínas estão dispersas por igual em toda a extensão do germinante, na hifa e no conidióforo, respectivamente (figura 40). Neste trabalho, a proteína ArfB em *A. fumigatus* está localizadas nas regiões apicais da hifa fúngica. Enquanto que a proteína ArlA, no mesmo organismos, está presente de forma difusa em todo o citoplasma.



Figura 40 – Microcopia de fluorescência de GFP. Linhagem controle negativo CEA17∆*akuB*^{ku80}, *arfB*::GFP1 e *arlA*::GFP1. DIC, Campo claro; GFP (*green fluorescence protein*), campo de fluorescência filtro GFP; MERGE, sobreposição do campo claro e f

4.13 - Avaliação da expressão dos genes arfA, arfB, arlA e gcsA por RT-qPCR.

Para avaliar a expressão relativa dos genes *arfA*, *arfB*, *arlA* e *gcsA* frente a diferentes danos à célula por RT-qPCR, a linhagem selvagem CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$ pyrG⁺ foi submetida a diferentes drogas que atuam em diferentes alvos da célula, como a parede celular, membrana celular, lipídios, DNA e outros. Como resultado, o gene *arfA* tem o nível de expressão aumentado quando o fungo foi exposto a menadiona (dano oxidativo), farnesol (dano oxidativo), brefeldin A (via do transporte vesicular) e miriocina (lipídios), com média de expressão relativa de 7, 21, 92 e 8 vezes mais que a expressão controle, respectivamente (figura 41). O gene *arfB* foi mais expresso quando o fungo foi exposto a farnesol (*quorum sensing*), brefeldin A (via do transporte vesicular) e miriocina (esfingolipídios), com média de expressão aumentada quando o fungo foi exposto a menadiona (dano oxidativo), farnesol (*quorum sensing*), brefeldin A (via do transporte vesicular) e miriocina (esfingolipídios), com média de expressão aumentada quando o fungo foi exposto a menadiona (dano oxidativo), farnesol (*quorum sensing*), brefeldin A (via do transporte vesicular) e miriocina (esfingolipídios), com média de expressão aumentada quando o fungo foi exposto a menadiona (dano oxidativo), farnesol (*quorum sensing*), brefeldin A (via do transporte vesicular) e miriocina (esfingolipídios), com média de expressão aumentada quando o fungo foi exposto a menadiona (dano oxidativo), farnesol (*quorum sensing*), brefeldin A (via do transporte vesicular), miriocina (esfingolipídios), *congo red* (parede celular), 5-flucitosina (síntese de ácidos nucléicos),

voriconazol (lipídios) e *calcofluor white* (parede celular), com médias relativas de 26, 29, 149, 8, 9, 11, 5 e 6,4 vezes mais que o controle, respectivamente (figura 41). O gene *gcsA* teve sua expressão aumentada quando o fungo foi exposto à menadiona (dano oxidativo), farnesol (*quorum sensing*), brefeldin A (via do transporte vesicular), miriocina (esfingolipídios), *congo red* (parede celular), 5-flucitosina (síntese de ácidos nucléicos) e voriconazol (ergosterol), com médias relativas de 2, 3, 1.3, 4.4, 2 e 2 vezes mais expressos que o controle (figura 41). Assim como no teste de sensibilidade a compostos químicos que afetam células eucarióticas, houve alteração no perfil de expressão gênica dos genes *arfA*, *arfB*, *arlA* e *gcsA* (ARF-GAP) frente a diversas drogas, cujos alvos são os mais diversos compartimentos celular.



Figura 41 – Avaliação de expressão gênica relativa dos genes *arfA*, *arfB*, *arlA* e *gcsA* em linhagem de *A*. *fumigatus* por de RT-qPCR. Controle (sem indução de drogas), brefeldin A ($30 \mu g/mL$), calcofluor white ($75 \mu g/mL$), congo red ($150 \mu g/mL$), voriconazol (500 ng/mL), miriocina ($30 \mu g/mL$), menadiona ($10 \mu M$), farnesol (20 mM) e 5-flucitocina ($300 \mu g/mL$).



5 - Discussão

As pequenas proteínas G são proteínas GTPase ligadoras de GTP que atuam como interruptores moleculares capazes de ligar e desligar as vias de sinalização intracelular. Entre elas estão as ADP-*Ribosylation Factors* (ARFs) que entre as suas funções observadas em *S. cerevisiae, A. nidulans, Drosophila melanogaster, Caenorhabditis elegans* e em mamíferos estão: montagem e trafego de vesículas citoplasmáticas, endocitoses, montagem de filamentos de actina, fusão e cisão de membranas, bem como maturação de organelas pelo sistema de membranas endossomais (Lambert *et al.*, 2007; Lee e Shaw, 2008; Lemière *et al.*, 2016; Pantazopoulou, 2016).

Foram identificadas em A. fumigatus seis proteínas que apresentam o domínio ARFs, onde três, arfA, arfB e arlA apresentam sítio de miristoilação que é a modificação da proteína pela adição de um ácido graxo (miristato) o qual confere propriedade associativa à membrana, localização subcelular e interação proteína-proteína (Lee e Shaw, 2007). Neste trabalho, os genes arfA, arfB e arlA foram deletados no fungo filamentoso patogênico humano A. fumigatus. Além disso, foram construídas linhagens duplo-mutantes dos genes arfB e arlA com o gene gcsA, que codifica uma proteína com domínio ARF-GTPase-activating protein (GAP) que é uma das proteínas envolvidas na manutenção do equilíbrio das estruturas ARF-GDP/ARF-GTP. Na deleção de arfA em A. fumigatus foi observada a presença de tubo germinativo nos protoplastos transformados com o respectivo cassete de deleção para arfA. Entretanto, esta célula germinada não foi capaz de progredir em seu desenvolvimento até a formação de micélio e colônia (hifas, micélio e conidióforos). Portanto, neste trabalho, foi observado que a ausência de arfA em A. fumigatus possivelmente inviabiliza o desenvolvimento do germinante. Assim, sugere-se que este gene é essencial para a vida de A. fumigatus. O mesmo foi relatado para os genes ortólogos em A. nidulans, arfA (Lee e Shaw, 2008) e em S. cerevisiae, arf1 e arf2 que são parálogos (Stearns et al., 1990).

A deleção dos genes arfB, arlA e gcsA mostraram que estes não são essenciais para *A. fumigatus*. O mesmo ocorre para as linhagens com as duplas deleções com gcsA. A deleção dos genes arl1 ou arl2 em *S. cerevisiae* (ortólogos de arlA em *A. fumigatus*) e a deleção de arf3em *S. cerevisiae* (ortólogo de arfB em *A. fumigatus*) também não inviabilizam o crescimento e desenvolvimento da levedura (Tsai *et al.*, 2013). O mesmo foi reportado por Lee e colaboradores (2008) frente a deleção do gene arfB em *A. nidulans*.

O transporte vesicular que envolve a endocitose e exocitose é fundamental para numerosas atividades nos organismos eucarióticos. Estão envolvidos em processos frente ao crescimento (germinação em fungos) e na diferenciação celular (Gruenberg e Clarque, 1992; Rothman, 1994). Assim, foi observado neste trabalho que a deleção de arfB e gcsA em A. fumigatus não levou a diminuição da germinação e crescimento radial bem como não alterou a morfologia do conidióforo, apresentando somente para $\Delta arf B$ o aumento na produção de conídios. Ainda, a deleção de arlA em A. fumigatus também não levou a alteração da germinação do conídio, entretanto apresenta dicotomia. O crescimento radial nestas linhagens deletadas está diminuído e a morfologia do conidióforo esta alterada. Além disso, as linhagens duplo mutantes $\Delta gcsA \Delta arfB$ e $\Delta gcsA \Delta arlA$ também não apresentam alteração na germinação do conídio. AgesA AarlA apresenta igual desenvolvimento dicotômico a linhagem simples mutantes $\Delta arlA$ e além disso as duas linhagens duplo mutantes apresentam a estrutura da reprodução assexual (conidióforo) alterada. No fungo A. nidulans foi observado que a deleção do gene arfB leva a redução no diâmetro da colônia, além da formação dos múltiplos tubos germinativos (Lee et al., 2008) semelhante ao desenvolvimento dicotômico encontrado para *AarlA* em A. *fumigatus*. Como as ARFs, outras pequenas proteínas G pertencentes, à superfamília Ras apresentam similares alterações. A ausência do gene rasA, codificador de uma GTPase em A. fumigatus, resulta em tubos germinativos aberrantes (Fortwendel et al., 2008). Ainda em A. fumigatus, a ruptura do gene srgA, que codifica a Sec4-GTPase, resulta em desestruturação do conidióforo, redução da produção de conídios, contudo esta ruptura não implica na viabilidade dos conídios e no tempo de germinação (Powers-Fletcher *et al.*, 2013). Todos estes fenótipos alterados são indicativos de aberrações no crescimento polarizado do fungo.

A emissão do tubo germinativo e o crescimento polarizado em fungos filamentosos são regulados por corpúsculos de ponta denominados *Spitzenkorper*. Estes corpúsculos são formados por vesículas que contém moléculas responsáveis pela montagem da membrana plasmática e parede celular no momento do crescimento apical do fungo. A desorganização do crescimento apical, como a dicotomia, é sinalizada pela ausência destes corpúsculos na ponta da hifa (Fischer-Parton *et al.*, 2000). Assim, germinantes da linhagem *arlA* deletada foram submetidas a um marcador de ergosterol, o corante Filipin. Foi observada a ausência de ergosterol na ponta da hifa da linhagem mutante $\Delta arlA$, reforçando assim que a dicotomia presente está ocorrendo possivelmente pela desorganização da formação dos *Spitzenkörper* na linhagem de *A. fumigatus* na ausência da pequena proteína G, ArlA.

Durante o crescimento fúngico, o tráfego das vesículas ao ápice da hifa é altamente dinâmico e organizado o qual envolve a atividade de um complexo de organelas multicomponente específicas que compõem o *Spitzenkörper* (Grove e Bracker, 1970; López-

Franco e Bracker, 1996). Assim, o comportamento dinâmico do Spitzenkörper está intimamente associado ao padrão preciso de crescimento do ápice das hifas (Girbardt, 1957; Bartnicki-Garcia et al., 1995; López-Franco e Bracker, 1996). Para testar este comportamento dinâmico existe o corante estirilo anfifílico FM4-64 que é amplamente utilizado como repórter fluorescente de endocitose e outros componentes da rede de tráfego de vesículas em células animais (Betz et al., 1996) e em levedura de brotamento (Vida e Emr, 1995; Lv et al., 2016). O FM4-64 se adere na camada externa da membrana plasmática e não penetra por difusão facilitada na célula intacta (Illinger e Kuhry, 1994; Betz et al., 1996). Após, ocorre a internalização do corante por endocitose e sua distribuição na célula por transporte vesicular (Fischer-Parton *et al.*, 2000). Neste trabalho, as linhagens $\Delta arf B \in \Delta arl A$ apresentam em A. fumigatus a ausência da marcação da membrana plasmática com corante estirilo anfifílico FM4-64, além de adicionalmente uma reduzida marcação das organelas comumente sinalizadas por este corante (ex. endossomo, vesícula, retículo endoplasmático, complexo de golgi e mitocôndria). Sugerindo assim, a reduzida afinidade do corante pela camada externa da membrana plasmática do fungo bem como consequente diminuição na incorporação do corante. As superfícies dos organismos unicelulares possuem cargas eletrostáticas negativas em virtude de fosforil ionizado e carboxilato ligados nas macromoléculas do envelope celular que são expostos ao meio (Wilson et al., 2001). A alteração na espessura da parede celular nas linhagens simples mutante $\Delta arf B$ e $\Delta arl A$, bem como a alteração no potencial zeta indicam uma possível alteração na composição da parede celular e membrana plasmática que pode justificar esta reduzida afinidade do corante estirilo anfifílico.

Munson e colaboradores (2003) relatam que as pequenas proteínas G da superfamília Ras, mais especificamente a Arl1 em *S. cerevisiae*, ortólogo de ArlA em *A. fumigatus*, são componentes importantes na regulação de bombas de influxo de potássio HAL4 e HAL5. Em *A. fumigatus* todas as linhagens deletadas e as duplo-mutantes apresentaram perfis de sensibilidade frente a higromicina B, porém quando o meio contendo este cátion tóxico foi suplementado com potássio, as linhagens não se sensibilizaram. Isso se justifica pela função das proteínas G da superfamília Ras, assim como Arl1 em *S. cerevisiae*, que são componentes importantes na regulação de bombas de influxo de potássio.

As proteínas que participam do transporte vesicular estão associadas a organelas envolvidas neste processo como o endossomos, vesículas, vacúolos, reticulo endoplasmático, complexo de Golgi e mitocôndrias, sendo que todas estas estão presentes no citosol. Em *A. nidulans*, a proteína ArfA está localizada em compartimentos do sistema secretório (Lee e

Shaw, 2008). Em *S. cerevisiae*, as ARFs (Arf1, Arf2 e ArlA) são conhecidas pelo seu envolvimento na secreção através do complexo de golgi (Lambert *et al.*, 2007). A proteína Arf*like* Arl1 está localizada na membrana *trans*-Golgi e regula a função desta organela em células de mamíferos e leveduras (Behnia *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2005; Lowe *et al.*, 1996; Lu *et al.*, 2001; Setty *et al.*, 2004; Shin *et al.*, 2005; Zahn *et al.*, 2008). Em *A. fumigatus*, as proteínas ArfB e ArlA foram localizadas ao longo de toda hifa, indicando que estão possivelmente presentes nas organelas que participam do transporte vesicular.

O equilíbrio da ativação e inativação das pequenas proteínas G são importantes para a correta polarização, germinação e diferenciação celular. Em leveduras, Arf1p ativo é conhecido por recrutar e ativar numerosas proteínas efetoras (Donaldson e Jackson, 2011) e a ARF-GAP Gcs1 regula negativamente esta proteína pela hidrolise do GTP (Chen et al., 2010; Liu et al., 2005). Fortwendel e colaboradores (2008) apontam que a deleção de rasA em A. fumigatus implica na redução do crescimento radial, além de defeitos na morfogênese das hifas e conidióforos. Em S. cerevisiae a deleção de arf3 (ortólogo a arfB em A. fumigatus) não inviabiliza o desenvolvimento e reprodução da levedura, porém prejudica o processo de endocitoses, uma vez que este gene está intimamente associado a formação de filamentos de actina (Lambert et al., 2007). Filamentos de actina estão intimamente ligados a membrana plasmática e, portanto, garantem estruturação da célula, mobilidade, tráfego de vesículas e de demais componentes citoplasmáticos (Lemière et al., 2016). Foi localizada em A. fumigatus a proteína ArfB ao longo de todo o conidióforo, inclusive nas células conidiogênicas (fiálides) e conídios. Ainda, ArlA está localizada nas células conidiogênicas (fiálides) e conídios. Além disso, a linhagem arlA deletada e duplos mutantes de arfB e arlA com $\Delta gcsA$ apresentam, em A. fumigatus, alterações na morfologia do conidióforo, principalmente alterações nas células conidiogênicas (fiálides). Portanto, ArfB e ArlA estão presentes no desenvolvimento assexual do fungo. Além disso, é enfatizada a importância do equilíbrio de ativação e inativação de arfB e arlA para a correta diferenciação celular do fungo, uma vez que no desequilíbrio ARF-GTP / ARF-GDP, aqui mostrado pela dupla deleção de uma ARF juntamente com uma ARF-GAP, ocorrem alterações morfológicas nos conidióforos do fungo.

A capacidade que o fungo possui de sensoriar e responder aos estímulos externos é vital para o desenvolvimento e sobrevida do microrganismo. As vias de sensoriamento de pH e temperatura, a adesão, germinação/emissão do tubo germinativo, formação de biofilme e invasão do tecido hospedeiro pelas hifas são fatores envolvidos na patogenicidade fúngica (Gow, 2002). Foi observado neste trabalho que temperatura elevada (45°C) e extremos de pH (5,5 e 8,5) foram fatores limitantes para o desenvolvimento das linhagens mutantes, indicando

que, em *A. fumigatus*, os genes *arfB*, *arlA* e *gcsA* são importantes para o sensoriamento e resposta a estas condições. De forma semelhante, a proteína SrgA, que é uma Rab-GTPase pertencente a superfamília Ras, está envolvida nos processos de adaptação térmica, uma vez que na ausência desta, o fungo mutante incubado a 45°C apresenta redução significativa do diâmetro de crescimento da colônia (Powers-Fletcher *et al.*, 2013). Indicando assim que o sensoriamento e resposta a altas temperaturas estão sendo possivelmente controladas com o auxilio de pequenas proteínas G como as ARFs e Rab.

O biofilme é definido como uma comunidade altamente estruturada onde os microrganismos estão associados entre eles e a uma superfície e estão embebidos em uma matriz extracelular produzida pelo próprio microrganismo (Ramage *et al.*, 2012). O biofilme de *Aspergillus* sp. forma-se em superfícies bióticas e abióticas. O processo inicia pelos conídios que colonizam e se aderem ao substrato. Formam o micélio que consiste no biofilme maduro o qual é embebido pela matriz extracelular (Mowat *et al.* 2009; Loussert *et al.*, 2010). Neste trabalho, a ausência de *arlA* em *A. fumigatus* apresentou aumento da biomassa aderida a superfície abiótica, em contrapartida, todas as linhagens duplo-mutantes apresentaram redução da formação de biomassa de biofilme.

Linhagens de *C. albicans* com alta capacidade de formar biofilme apresentam a capacidade de dificultar a resposta imune do hospedeiro, promovendo barreiras contra fagócitos e citosinas. Assim, é sugerido que o biofilme é um dos fatores fundamentais para a facilitar a passagem do patógeno aos tecidos mais profundos do hospedeiro (Borghi *et al.*, 2014). Em teste de virulência, neste trabalho, usando larvas de *G. mellonella* a linhagem $\Delta arlA$ apresentou aumento da virulência, evidenciando que a capacidade aumentada de formar biomassa de biofilme presente em $\Delta arlA$ em *A. fumigatus* contribuiu na capacidade de dificultar a resposta imune do hospedeiro.

Com o intuito de entender a importância das ARFs para *A. fumigatus*, as linhagens deletadas foram testadas frente a drogas que afetam a parede celular fúngica (equinocandinas, *congo red* e *calcofluor white*) e a membrana plasmática/lipídios (anfotericina B, itraconazol, fitoesfingosina, lovastatina, miriocina e farnesol). Além destes, a inibição de *ADP-ribosylation factor* (brefeldin A), síntese de DNA (5-flucitosina), estresse oxidativo (menadiona) e higromicina B, um cátion capaz de inibir a síntese proteica em eucariotos. Neste trabalho, obersou-se que para algumas destas drogas, as linhagens deletadas tiveram alterações na sua sensibilidade, que foram *congo red*, higromicina B, farnesol, miriocina e brefeldin A.

O mecanismo de muitos antifúngicos se dá pela geração de espécies reativas de oxigênio, bem como o farnesol. Esta molécula também é capaz de inibir o crescimento de vários

fungos (Qi *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2014), tais como *A. fumigatus* e *S. cerevisiae* pela inibição das proteínas Ras, as quais estão inseridas na mesma superfamília das proteínas ARF-GTPases, por meio de degradação proteossomal (Baroni *et al.*, 2005). Adicionalmente, neste trabalho, todas as linhagens deletadas e duplo mutantes apresentaram resistência a farnesol, sendo este envolvido em *quorum sensing*. Além da resistência, em análises de PCR *real time* neste trabalho, mostrou que *arfA*, *arfB* e *arlA*, estão altamente expressos quando *A. fumigatus* é induzido com farnesol.

Em *S. cerevisiae*, na ausência do ortólogo ao *arlA* de *A. fumigatus*, *arl1*, a linhagem se mostrou sensível a *congo red* (Huang *et al.*, 2003). Neste trabalho, todas as linhagens *arf* deletadas e as duplo-mutantes em *A. fumigatus* apresentaram perfis de sensibilidade frente a esta droga. Curiosamente, neste trabalho apenas o gene *arlA* foi mais expresso quando *A. fumigatus* foi exposto a congo red. O mesmo foi relatado a partir da deleção do gene *BcMtg2*, o qual codifica Obg-GTPase similar as ARF-GTPases, em *Botrytis cinerea* (Shao *et al.*, 2016).

Em mamíferos, Arf6 e Arf3 em *S. cerevisiae*, ortólogos de ArfB em *A. fumigatus*, atuam intimamente na membrana plasmática como uma das precursoras para a síntese de fosfatidilinositol (Gillingham e Munro, 2007). Foi observado que em *A. fumigatus*, todas as linhagens *arf* deletadas e duplo mutantes apresentaram perfis alterados quando expostos a miriocina. As linhagens *arlA* deletadas e seus respectivos duplo-mutantes foram resistentes, enquanto as linhagens *arfB* deletadas e seus respectivos duplo-mutantes foram sensíveis a esta droga. Em análise por qPCR, os genes estudados neste trabalho foram altamente expressos quando *A. fumigatus* foi induzido com miriocina. Em *S. cerevisiae*, o gene *ScSng*1 codifica a proteína com domínio transmembrana Sng1, que modula a proteína Pkh, que por sua vez é um modulador da cascata de Ypk1/2, cujas funções deste último são a homeostasia de esfingolipídios e assimetria dos fosfolipídios da membrana plasmática. Assim, Sng1 atua indiretamente como regulador da síntese de esfingolipídios (Marqués *et al.*, 2016).

O inibidor intracelular de transporte de proteínas, brefeldin A, mantém as proteínas ARFs na sua forma inativa no complexo de Golgi ou citoplasma, pois é um metabólito fúngico que se liga ao complexo ARF-GDP e bloqueia a atividade da GEF nos estágios iniciais da reação, antes da liberação do nucleotídeo de guanina (Mossessova *et al.*, 2003). Brefeldin A interfere em todas as pequenas proteínas G, pois esta droga atua em todas as ARF-GEFs. Apenas a proteína Arf6 em mamífero (ortólogo a *arfB* em *A. fumigatus*) não interage com brefeldin A (Zeghouf *et al.*, 2005). Neste trabalho, as linhagens $\Delta arlA$, $\Delta gcsA$ e duplo mutantes $\Delta gcsA \Delta arfB$ e $\Delta gcsA \Delta arlA$ apresentaram perfis de resistência a brefeldin A. Assim, foi observado que na inibição das ARF-GEFs por brefeldin A, *A. fumigatus* conseguem se desenvolver na ausência do gene *gcsA*, que é uma ARF-GAP, que apresenta a função catalisadora na conversão ARF-GTP em ARF-GDP (Luo *et al.*, 2016). Portanto, sugere-se que devido a ausência de GcsA o ARF-GDP está diminuído no equilíbrio ARF-GTP/ARF-GDP. Brefeldin A inibe a GEF que se liga a estrutura ARF-GDP (Mossessova *et al.*, 2003) que então está possivelmente em baixa quantidade, influenciando assim na resistência do fungo à presença de Brefeldin A.



6 - Conclusão

Em *A. fumigatus* existem seis genes codificadores de proteínas com o motivo *ADPribosylation fator* (ARF), sendo que *arf*A, *arf*B e *arl*A são preditivamente miristoiladas.

O gene *arf*A demonstra ser essencial para o fungo, enquanto *A. fumigatus* é capaz de se desenvolver na ausência dos genes *arf*B, *arl*A e *gcs*A, sendo que o último codifica uma proteína com o motivo ARF-GTPase-*Activating Protein* (GAP) conhecido por hidrolisar o GTP ligado a ARF. Adicionalmente, as linhagens duplo mutantes $\Delta gcsA \Delta arfB$ e $\Delta gcsA \Delta arlA$ são viáveis.

As características encontradas neste trabalho estão presentes de forma alternada nos mutantes Δarf B, Δarl A, Δgcs A e duplo mutantes Δgcs A Δarf B e Δgcs A Δarl A. Entre elas estão a alteração em crescimento radial de colônia, polarização dicotômica, alteração na diferenciação celular do conidióforo, ausência de ergosterol no ápice da hifa, redução da marcação da membrana plasmática e organelas citoplasmáticas pelo corante FM4-64, alteração de espessura e potencial zeta de parede celular, deficiência em desenvolver em extremos de pH e temperatura, alteração no volume de biomassa de biofilme bem como na virulência do fungo, sensibilidade ou resistência a drogas, principalmente ao inibidor de transporte de proteínas intracelular, brefeldin A.

Estas características encontradas estão ocorrendo em processos básicos da célula em que o transporte vesicular está envolvido. Na ausência de genes que codificam ARFs e em conjunto com a ausência de gene que codifica proteína responsável pela inativação das ARF-GTPases, a ARF-GAP, é evidenciado que o mecanismo de equilíbrio das ARFs é essencial para o desenvolvimento e diferenciação celular do fungo. Mostra-se importante para a correta formação de conidióforos, germinação de conídios, posicionamento dos *Spitzenkörper* no ápice da hifa. Além disso, para a endocitose e distribuição de proteínas no citoplasma e sensoriamento do ambiente externo. Sugere-se que a ausência das ARFs em *A. fumigatus* implica na virulência, pela capacidade de formar biofilme e burlar o sistema imune do hospedeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 - Referências bibliográficas.

Adams, T. H.; Wieser, J. K.; Yu, J. H. Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. **Microbiology and Molecular Biology**, Texas, EUA, v. 62, n. 1, p. 35–54, 1998.

Alastruey-Izquierdo, A.; Mellado, E.; Cuenca-Estrella, M.; Current section and species complex concepts in *Aspergillus*: recommendations for routine daily practice. Academy of Sciences, New York, v. 1, p. 18-24, 2012.

Alberts, B.; Johnson, B.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, M.; Walter, P. **Molecular Biology of the Cell**, 4^a edição, 2002.

Allen, M. J.; Voelker, D. R.; Mason, R. J. Interactions of surfactant proteins A and Dwith *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus fumigatus*. **Infect Immun**, Denver, Colorado v. 69, p. 2037 – 2044, 2004.

Alkhayyat, F.; Kim, S. C.; Yu, J. H. Chapter three – genetic control of asexual development in *Aspergillus fumigatus*. Advances in Applied Microbiology, Madison, EUA, v. 90, p. 93–107, 2015

Altan-Bonnet, N.; Sougrat, R.; Lippincott-Schwartz, J. Molecular basis for Golgi maintenance and biogenesis. **Cell Biol**. Maryland, EUA, v. 6, p. 364 – 372, 2004.

Aranda, F. J. R. Pardey, A. E. B.; Nuñes, J. C. L. Otimización de la cria de *Galleria mellonella* (L.) para la produccíon de namotodos entomopatogenos parasitos de la broca del café. **Cenicafé**, Caldas, Colômbia, v. 50, n. 2, p. 142 – 157, 2012.

Bartnicki-Garcia, S.; Bartnicki, D. D.; Gierz, G.; López-Franco, R.; Bracker, C.E. Evidence that *Spitzenkörper* behavior determines the shape of a fungal hypha – a test of the hyphoid model. **Exp. Mycology**, California, EUA, v. 19, n. 2, p. 153-159, 1995.

Baroni, S. S.; Concelo, R.; Sambo, P.; Luchetti, M.; Paroncini, P.; Orlandini, G.; Diciepoli, G.; Paterno, R.; Santillo, M.; Cuozzo, C.; Cassano, S.; Avvedimento, E. V.; Gabrielli, A. PDGF and Reactive Oxygen Species (ROS) regulate Ras protein levels in primary human fibroblasts via . ERK1/2. **Biological Chemistry**, v.280, n. 43, p. 36474 – 36482.

Batista, M.V, Costa, S.F, Shikanai-Yasuda, M.A, Moss, R.B. Current treatment options for invasive aspergillosis. **Drugs Of Today**, Barcelona, v. 3, n. 49, p.213-226, 2013.

Behnia, R.; Panic, B.; Whyte, J. R.; Munro, S. Targeting of the Arf-like GTPase Arl3p to the Golgi requires N-terminal acetylation and the membrane protein Sys1p. Nat. Cell Biol, Cambridge, Reino Unido, v. 6, p. 5 - 413, 2004.

Bejamin, J. R.; Poon, P. P.; Drystale, J. D.; Wang, X.; Singer, R. A.; Johnston, G. Dysregulated Arl1, a regulator of post-Golgi vesicle tethering, can inhibit endosomal transport and cell proliferation in yeast. **Mbac**. Nova Scotia, Canadá, v. 22, p. 2337 – 2347, 2011.

Betz, W. J.; Mao, F.; Smith, C. B. Imaging exocytosis and endocytosis. **Curr. Opin.** Neurobiol, Denver, EUA, v. 6, n. 3, p. 365 - 371, 1996.

Bhuin, T.; Roy, J. K. Rab11 in Disease Progression. **Int J Mol Cell Med**, Golapbag, India, v. 4, n. 1, 2013.

Bleichrodt, R.; Vinck, A.; Krijgsheld, P.; van Leeuwen M. R.; Dijksterhuis, J.; Wösten, H. A. Cytosolic streaming in vegetative mycelium and aerial structures of *Aspergillus niger*. **Stidies in mycology**, Utrecht, Holanda, v. 74, n. 1, p. 31 - 46, 2013.

Bom, V. L. P.; Castro, P. A.; Winkelströter, L. K.; Marine, M.; Hori, J. I.; Ramalho, L. N. Z.; Reis, T. F.; Goldman, M. H. S.; Brown, N. A.; Rajendran, R.; Remage, G.; Walker, L. A.; Munro, C. A.; Rocha, M. C.; Malavazi, I.; Hagiwara, D. The *Aspergillus fumigatus sitA* phosphatase homologue is important fot adhesion, cell wall integrity, biofilm formation and virulence. **Eukariotic cell**, Ribeirão Preto, Brasil, v. 14, n. 8, p. 728 – 744, 2015.

Borghi, E.; Romagnoli, S.; Fuchs, B. B.; Cirasola, D.; Perdoni, F.; Tosi, D., Braidotti, G. B.; Morace, G.; Mylonakis, E. Correlation between *Candida albicans* biofilm formation and invasion of the invertebrate host *Galleria mellonella*. **Future microbiology**, v. 9, n. 2, p. 163 – 173, 2014.

Bowman, J. C. *et al.* The Antifungal Echinocandin Caspofungin Acetate Kills Growing Cells of *Aspergillus fumigatus* In Vitro. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, Rahway, New Jersey, v. 9, n. 46, p.3001-3012, 2002.

Bowman, S.; Free, S.; The structure and synthesis of the fungal cell wall. **BioEssays**. v. 28, n. 8, p. 799-808, 2006.

Bracker, C. E; Grove, S. N. Continuity between cytoplasmic endomembranes and outer mitochondrial membranes in fungi. **Protoplasma**, Lafayette, EUA, v. 73, n. 1, p. 15 - 34, 1971.

Brennan, M; Thomas, D. Y.; Whiteway, M.; Kavanagh, K. Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. **FEMS Immunol Med Microbiol**, Maynooth, Ireland, v. 34, n. 2, 2002.

Brown, G.D.; Denning, D.W.; Gow, N.A.; Levitz, S.M.; Netea, M.G.; White, T.C. Hidden killers: human fungal infections. **Sci. Transl. Med**, v.4, rv13, 2012.

Carrillo-Muñoz, A. J.; Ezkurra, P. A. Antifungal agents: mode of action in yeast cells. **Quimioter,** Barcelona, v. 19, n. 2, p. 130- 139, 2006.

Charron G., Wilson, J., Hang, H. C. Chemical tools for understanding protein lipidation in eukaryotes. **Curr Opin Chem Biol**, v.13, p.382-391, 2009.

Chauhan, N., Latge, J.P., and Calderone, R. Signalling and oxidant adaptation in *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. **Nat. Rev. Microbiol**. v. 4, p. 435–444, 2006.

Chen, K. Y.; Tsai, P. C.; Hsu, J. W.; Hsu, H. C.; Fang, C. Y.; Chang, L. C.; Tsai, Y. T.; Yu, C. J.; Lee, F. J. Syt1p promotes activation of Arl1p at the late Golgi to recruit Imh1p. **J. Cell Sci**, Taiwan, v. 123, n. 20, p. 3478-3489, 2010.

Costa, R.; Ayscough, K. R. Interactions between Sla1p, Lsb5p and Arf3p in yeast endocytosis. **Biochemical society transactions**, Western Bank, Reino Unido, v. 33, n. 6, p. 1273 – 1275, 2005.

Dagenais, T. R.; Keller, N. P. Pathogenesis of *Lee* in invasive aspergillosis. **Clin Microbiol Rev**, Madison, EUA, v. 22, n. 3, p. 447 – 465, 2009.

Dichtl, K.; Samantaray, S.; Wagener, J. Cell wall integrity signalling in human pathogenic fungi. **Cellular Microbiology**, Reino Unido, v. 18, n. 9, p. 1228 – 1238, 2016.

Doering, T. L. How sweet it is! Cell wall biogenesis and polysaccharide capsule formation in *Cryptococcus neoformans*. **Annual Review of Microbiology**, Missouri, EUA, v. 63, p. 223–247, 2009.

Donaldson, J. G.; Jackson, C. L. ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease. **Nat Rev Mol Cell Biol**, Maryland, USA, v. 12, n. 6, p. 362 – 375, 2011.

Dyer, P. S.; Paoletti, M. Reproduction in *Aspergillus fumigatus*: sexuality in a supposedly asexual species? **Medical Mycology**, Nottinghan, Reino Unido, v. 43, n. 1, p. 7 – 14, 2005.

Fan, Z.; Li, Z.; Xu, Z.; Li, H.; Li, L., Ning, C.; Ma, L.; Xie, X.; Wang, G.; Yu, H. *cspA* influences biofilm formation and drug resistance in pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. **Biomed Res**, China, v. 2015, p. 1 - 9, 2015.

Fang, W.; Robinson, D. A.; Raimi, O. G.; Blair, D. E.; Harrison, J. R.; Lockhart, D. E. A.; Torrie, L. S.; Ruda, G. F.; Wyat, P. G.; Gilbert, I. H.; Aalten, D. M. F. N-Myristoyltransferase Is a Cell Wall Target in Aspergillus fumigatus. **Chemical Biology**, Dundee, Reino Unido, v. 10, p. 1425 – 1434, 2015.

Fanning, S.; Mitchell, A. P. Fungal Biofilms. **Pathogens**, Pensilvania, EUA, v. 8, n. 4, p. 1–4, 2012.

Farrell, K. B.; Grossmann, C.; Di Pietro, S. M. New Regulators of clathrin-mediated endocytosis identified in *Saccharomyces cerevisiae* by systematic quantitative fluorescence microscopy. **Genetics**, v. 201, n. 3, p. 1061 – 1070, 2015.

Ferreira M. E. S., Kress M. R. V. Z., Savoldi M., Goldman M. H. S., Härtl A., Heinekamp T., Brakhage A. A. and Goldman G. H. The $\Delta akuB^{KU80}$ Mutant Deficient for Nonhomologous End Joining Is a Powerful Tool for Analyzing Pathogenicity in *Aspergillus fumigatus*. **Eukaryotic Cell**, Ribeirão Preto, São Paulo, v. 1, n. 5, p.207-2011, 2006.

Fischer-Parton, S.; Parton, R. M.; Hickey, P. C.; Dijksterhuis, J.; Atkinson, H. A.; Read, N. D. Confocal microscopy of FM4-64 as a tool for analysing endocytosis and vesicle trafficking in living fungal hyphae. **Journal of microscopy**, v. 198, n. 3, p. 246 – 259, 2000.

Fortwendel, J. R.; Fuller, K. K.; Stephens, T. J.; Bacon, W. C. Askel, D. S.; Rhodes, J. C. Aspergillus fumigatus RasA Regulates Asexual Development and Cell Wall Integrity. **Eukariotic Cell**, Ohio, EUA, v. 7, n. 9, p. 1530 – 1539, 2008.

Free, S. J. Fungal cell wall organization and biosynthesis. **Advances in genetics**, Nova Iorque, EUA, v. 81, p. 33 – 82, 2013.

Galagan, J. E.; Calvol, S. E.; Cuomo, C.; Ma, L. J.; Wortman, J. R.; Barziglou, S.; Lee, S. I.; Cediltürkmen, M. B.; Spevak, C. C.; Clutterbuck, J.; Kapitonovo, V.; Jurka, J.; Scazzocchio, C.; Farman, M.; Butler, J.; Purcell, S.; Harris, S.; Braus, G. H.; Draht, O. Busch, S.; D'Enfert, C.; Bouchier, C.; Goldman, G. H.; Draht, O.; Pedersen, D, B.; Jones, S. G.; Doonan, J. H.; Yu, J.; Vienken, K.; Pain, A.; Freitag, M.; Selker, E. U.; Archer, D. B.; Peñalva, M. A.; Oakley, B. R.; Momany, M.; Tanaka, T.; Kumagai, T.; Asai, K.; Hynes, M.; Paoletti, M.; Fisher, R.; Miller, B.; Dyer, P.; Sachs, M. S.; Osmani, S. A.; Birren, B. W. Sequencing of *Aspergillus nidu*lans and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. **Nature**, Massachusetts, EUA, v. 438, p.1105 – 1115, 2005.

Georgopapadakou NH. Antifungals targets to protein modification: focus on protein N-myristoyltranferase. **Expert Opin Investig Drugs**, v. 11, p. 1117–1125, 2002.

Girbardt, M. Der Spitzenkörper von *Polystictus versicolor* (L.). **Planta**, Berlin, Alemanha, v. 50, n. 1, p. 47 - 59, 1957.

Gillingham, A. K.; Munro, S. The small G proteins of the Arf family and their regulators. **Cell Dev. Biol**, Reino Unido, v. 23, p. 579 – 611, 2007.

Gock, M. A.; Hocking, A. D.; Pitt, J. I; Poulos, P. G. Influence of temperature, water activity and pH on growth of some xerophilic fungi. **International Journal of Food Microbiology**, North Ryde – Australia, v. 2481, p. 11 - 19, 2003.

Goodman & Gilman, The Pharmacological Basis of Therapeutics, 12^a edição, 2012.

Gow, N. A.; Brown, A. J.; Odds, F. C. Fungal morphogenesis and host invasion. **Curr Opin Microbiol**. Aberdeen, UK, v. 4, p. 366 – 71, 2002.

Graham, T. R. Arl1 gets into the membrane remodeling business with a flippase and ArfGEF. **Cell Biology**, Nashville, EUA, v. 110, n. 8, p. 2691 – 2692, 2013.

Grant, S. G.; Jessee, J.; Bloom, F. R.; Hanahan, D. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into Escherichia coli methylation-restriction mutants. **Proc Natl Acad Sci U S A**, New York, v. 87, n. 12, p. 4645 – 4649, 1990.

Grove, S. N.; Bracker, C. E. Protoplasmic organization of hyphal tips among fungi: vesicles and *Spitzenkörper*. J. Bacteriol, Lafayette, EUA, v. 104, n. 2, p. 989 – 1009, 1970.

Gruenberg, J.; Clague, M. J. Regulation of intracellular membrane transport. **Curr. Opin. Cell Biol**, Heidelberg, Alemanha, v. 4, n. 4, p. 593 - 599, 1992.

Hang, H.C., Linder, M.E. Exploring protein lipidation with chemical biology. **Chem Rev**, Nova Iorque, EUA, v.111, p. 6341-6358, 2011.

Harris, S. D.; Momany, M. Polarity in filamentous fungi: moving beyond the yeast paradigm. **Fungal Genetics and Biology**, Lincoln, EUA, v. 41, n. 4, p. 391–400, 2004.

Herth, W. Calcofluor white and congo red inhibit chitin microfibril assembly of poterioochromonas: evidence for a gap between polymerization and microfibril formation. **J Cell Biol**, Heidelberg, Germany, v. 87, p. 442 - 450, 1980.

Horm, B. W.; Moore, G. G.; Carbone, I. Sexual reproduction in *Aspergillus flavus*. Mycologia, Georgia, v. 101, n. 3, p. 423–429, 2009-a.

Horm, B. W.; Ramirez-Prado, J. H.; Carbone, I. The sexual state of *Aspergillus* parasiticus. **Mycologia**, Georgia, v. 101, n. 2, p. 275–280, 2009-b

Hsu, S. C.; TerBush, D.; Abraham, M.; Guo W. The exocyst complex in polarized exocytosis. **Int Rev Cytol**, Nova Jersey, EUA, v. 233, p. 234 – 365, 2004.

Huang, C.F., Buu, L.M., Yu, W.L., and Lee, F.J. (1999). Characterization of a novel ADP-ribosylation factor-like protein (yARL3) in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem**, China, v.274, p.3819–3827, 1999.

Huang, C. F.; Liu, Y. W.; Lin, C. H.; Lee, F. J. Role for Arf3p in development of polarity, but not endocytosis, in Saccharomyces cerevisiae. **Mol Biol Cell**, Taiwan, China, v. 14, n. 9, p. 3834 – 3847, 2003.

Hubka, V.; Kolarík M.; Kubátová, A.; Peterson, S. W. Taxonomic revision of *Eurotium* and transfer of species to *Aspergillus*. **Mycologia**, Praha, República Checa, v. 105, n. 4, p. 912 – 937, 2013.

Illinger, D.; Kuhry, J. G. The kinetic aspects of intracellular fluorescence labeling with TMA-DPH support the maturation model for endocytosis in L929 cells. **J. Cell Biol**, Strasbourg, França, v. 125, n. 4, p. 783 – 794, 1994.

Junghans, H.; Metzlaff, M.: A simple and rapid method for the preparation of total plant DNA. **Biotechniques**, Halle, Germany, v. 2, n. 8, p.176, 1990.

Karp, G. Biologia celular e molecular. 3ª edição, 2005.

Krijgsheld, P.; Bleichrodt, R.; van Veluw, J. G.; Wang, F.; Müller, W. H.; Dijksterhuis, J.; Wösten, H. A. B. Development in *Aspergillus*. **Studies in mycology**, Utrescht, Holanda, v. 74, p. 1 - 29, 2013.

Lambert, A. A.; Perron, M. P.; Lavoie, E.; Pallotta, D. The *Saccharomyces cerevisiae* Arf3 protein is involved in actin cable and cortical patch formation. **European Microbiological Societies**, Laval Québec, Canada, v. 7, p. 782 – 795, 2007.

Latgé, J. P.; Beauvais, A. Functional duality of the cell wall. **Current opinion in microbiology**, Paris, França, v. 20, p. 111 – 117, 2014.

Latgé, J. P.; Kobayashi, H.; Debeaupuis, J. P.; Diaquin, M.; Sarfati, J.; Wieruszeski, J. M.; Parra, E.; Bouchara, J. P.; Fournet, B. Chemical and immunological characterization of the extracellular galactomannan of *Aspergillus fumigatus*. **Infection and immunity**, Paris, França, v. 84, n. 11, 2014.

Lee, S. C.; Shaw, B. D. A novel interaction between N-myristoylation and the 26S proteasome during cell morphogenesis. **Mol Microbiol**, Texas, USA, v. 63, p. 1039 – 1053, 2007.

Lee, S. O.; Schmidtke, S. N.; Dangott, L. J.; Shaw, B. D. *Aspergillus nidulans* ArfB plays a role in endocytosis and polarized growth. **Eukatytic cell**. Texas, v. 7, n. 8, p.1278-1288, 2008.

Lee, S. O.; Shaw, B. D. Localization and function of ADP ribosylation factor A in *Aspergillus nidulans*. **Research letter**. v. 283, p. 216-222, 2008.

Lee, S. O.; Schimiditke, S. N.; Dangott, L. J.; Shaw, B. D. *Aspergillus nidulans* ArfB plays a role in endocytosis and polarized growth. **Eukariotic Cell**, v. 7, n. 8, p. 1278 – 1288, 2008. Leeuwen, M. R.; Krijgsheld, P.; Bleichrodt, R.; Menke, H.; Stam, H.; Stark, J.; Wösten, H. A. B.; Dijksterhuis, J. Germination of conidia of *Aspergillus niger* is accompanied by major changes in RNA profiles, **Studies in mycology**, v. 74, n. 1, p. 59 – 70, 2013.

Lemière, J.; Valentino, F.; Campilo, C.; Sykes, C. How cellular membrane properties are affected by the actin cytoskeleton. **Biochimie**, Paris, França, v. 30, p. 1 - 8, 2016.

Levin, D. E. Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. **Genetics**, Massachusetts, EUA, v. 189, n. 4, p. 1145 – 1175, 2011.

Liu, Y. W.; Huang, C. F.; Huang, K. B.; Lee, F. J. Role for Gcs1p in regulation of Arl1p at trans-Golgi compartments. **Mol. Biol. Cell**, Taiwan, v. 16, n. 9, 4024-4033, 2005.

López-Franco, R.; Bracker, C. E. Diversity and dynamics of the *Spitzenkörper* in growing hyphal tips of higher fungi. **Protoplasma**, Lafayette, v. 195, n. 1, p. 90 - 111, 1996.

Loussert, C.; Schmitt, S.; Prevost, M. C.; Balloy, V.; Fadel, E.; Philippe, B. Lacroix, C. K.; Latgé, J. P.; Beauvais, A. *In vivo* biofilm composition of *Aspergillus fumigatus*. Cellular microbiology, Paris, França, v. 12, n. 3, p. 405 – 410, 2010.

Loussert, C.; Schmitt, C.; Prevost, M. C.; Balloy, V.; Fadel, E.; Philippe, B. *In vivo* biofilm composition of *Aspergillus fumigatus*. Cell Microbiol, França, v.12, n. 3, p. 405–410, 2010.

Lowe, S. L.; Wong, S. H.; Hong, W. The mammalian ARF-like protein 1 (Arl1) is associated with the Golgi complex. **J. Cell Sci**. v. 109, p. 209-220, 1996.

Lu, L.; Horstmann, H.; Ng, C.; Hong, W. Regulation of Golgi structure and function by ARF-like protein 1 (Arl1). **J. Cell Sci.** v. 114, n. 24, p. 4543-4555, 2001.

Luo, R.; Chen, P. W.; Wagenbach, M.; Jian, X.; Jenkins, L.; Woderman, L.; Randazzo, P. A. Direct Functional Interaction of the kinesin-13 family membrane kinesin-like protein 2A (Kif2A) and Arf GAP with GTP-binding protein-like, ankyrin repeats and PH domains1(AGAP1). **Biological Chemistry**, v. 291, n. 41, p. 21350 – 21362, 2016.

Lv, Y.; Xia, Z.; Wang, W. The dynamic structure of *spitzenkörpers* of *Trichosporon asahii* examined by the fluorescent probe FM4-64. **Braz J Microbiol**, China, v. 47, n. 1, p. 266–269, 2016.

Malavazi, I.; Goldman, G. H. Gene disruption in *Aspergillus fumigatus* using a PCR-based strategy and *in vivo* recombination in yeast. **Springer Science+Business Media**, v. 845, 2012

Marqués, S. G.; Randez, F. G.; Dupont, S.; Garre, E.; Prieto, J.A. Sng1 associates with Nce102 to regulate the yeast Pkh-Ypk signalling module in response to sphingolipid status. **Biochim Biophys Acta**, Valência, Espanha, v. 1836, p. 1319 – 1333, 2016.

Maschmeyer, G., Haas, A., Cornely, O.A. Invasive aspergillosis: epidemiology, diagnosis and management in immunocompromised patients. **Drugs**, Potsdam, Germany, v. 11, n. 67, p.1567-1601, 2007.

Mattingly, R. R. Activated Ras as a Therapeutic Target: Constraints on Directly Targeting Ras Isoforms and Wild-Type versus Mutated Proteins. **Hindaw**, Detroid, USA, v. 2013, p. 2 - 14, 2013.

Maubon, D.; Park, S.; Tanguy, M.; Huerre, M.; Schimitt, C.; Prévost, M.C.; Perlin, D. S.; Latgé, J. P.; Beauvais, A. AGS3, an alpha(1-3)glucan synthase gene family member of Aspergillus fumigatus, modulates mycelium growth in the lung of experimentally infected mice. **Fungal Genet Biol.**, Paris, França, v. 43, n. 5, p. 366 – 375, 2006.

Mayorga ME, Timberlake WE. Isolation and molecular characterization of the *Aspergillus nidulans* wA gene. **Genetics**, v. 126, n. 1, p. 73-79, 1990.

Melnykovych G.; Haug J .S.; Goldner, C. M. Growth inhibition of leukemia cell line CEM-C1 by farnesol: Effects of phosphatidylcholine and diacylglycerol. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Kansas City, v. 186, n. 1, p. 543 – 548, 1992.

Meyer, V.; Wu, B.; Ram, A. F. J. *Aspergillus* as a multi-purpose cell factory: current status and perspectives. **Biotechnology Letters**, Leiden, Holanda, v. 33, n. 3, p. 469–476, 2011.

Mossessova, E.; Corpina, R. A.; Goldberg, J. Crystal **structure** of ARF1*Sec7 complexed with Brefeldin A and its implications for the guanine nucleotide exchange mechanism. **Mol Cell**, New York, USA, v. 12, n. 6, p. 1403 – 1411, 2003.

Mowat, E.; Williams, C.; Jones, B.; McChlery, S.; Ramage, G. The characteristics of *Aspergillus fumigatus* mycetoma development: is this a biofilm? **Medical mycology**, Glasgow, Reino Unido, v. 120, n. 6, 2009.

Munson, A. M. Devon H.; Sherie, L. L.; Gillian L. F.; Vikram R. P.; Anne G. R. Yeast ARL1 encodes a regulator of K+ influx. **Journal of Cell Science**, Washington, EUA, v. 117, p. 2309 – 2320, 2003.

Mylonakis, E.; Moreno, R.; Khouri, J. B. E.; Idnurm, A. *Galleria mellonella* as a Model System To Study *Cryptococcus neoformans* Pathogenesis. **American Society for Microbiology**, Massachusetts, EUA. v. 73, n. 7, p. 3842 – 4850, 2005.

Nie, Z.; Randazzo, A. Arf GAPs and membrane traffic. **Journal Cell Science**, v. 119, p. 1203 – 1211, Bethesda, EUA, 2006.

Nucci M.; Marr, K. A.; Emerging fungal diseases. clinical infectious diseases. **Infectious Diseases Society of America**, Rio de Janeiro, Brasil, v. 41, n. 4, p. 521-526, 2005.

O' Gorman, C. M.; Fuller, H. T.; Dyer, P. S. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. **Nature**, Dublin, Irlanda, v. 457, n. 4, p.471–474, 2009.

Osherov, N.; May, G. S. The molecular mechanisms of conidial germination. **Microbiology** Letters, Houston, EUA, v. 199, p.153–160, 2001.

Panagou, E.Z.; Skandamis, P.N.; Nychas, G.-J.E. Modelling the combined effect of temperature, pH and aw on the growth rate of *Monascus ruber*, a heat-resistant fungus isolated from green table olives. **Journal of Applied Microbiology**, Athens, Greece, v. 94, n. 51, p. 146 – 156, 2003.

Pantazopoulou, A. The Golgi apparatus: insights from filamentous fungi. **Mycologia**, Madrid, Espanha, v. 108, n. 3, p. 603 – 622, 2016.

Pardo, M.; Monteoliva, L.; Pla, J.; Vásquez, P.; Martinez, R.; Molero, G.; Nombela, C.; Gil, C. PSTI and ECM33 encode two yeast cell surface GPI protein important for cell wall integrity. **Microbiology**, Madri, Espanha, v. 15, p. 459 – 472, 2004.

Parrish, N. M.; Kuhajda, F. P.; Heine, H. S.; Bishai, W. R.; Dick, J. D. Antimycobacterial activity of cerulenin and its effects on lipid biosynthesis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Beltmore, USA, v. 43, n. 2, p. 219 – 226, 1999.

Powers-Fletcher, M. V.; Feng, X.; Krishnan, K.; Askew, D. S. Deletion of the sec4 homolog srgA from *Aspergillus fumigatus* is associated with an impaired stress response, attenuated virulence and phenotypic heterogeneity.**Plos one**, Ohio, EUA, v. 8, n. 6, 2013.

Qi, G.F.; Zhu, F. Y.; Du, P.; Yang, X. F.; Qiu, D. W.; Yu, Z. N.; Chen, J. Y. Zhao, X. Y.Lipopeptide induces apoptosis infungal cells by a mitochondria-dependent pathway. **Peptides**, China, v.31, p.1978–1986, 2010.

Randazzo, P. A.; Yang, Y. C.; Rulka, C.; Kahn, R. A. Activation of ADP-ribosylation factor by Golgi membranes. Evidence for a brefeldin A- and protease-sensitive activating factor on Golgi membranes. **J Biol Chem**, Maryland, v.268, n. 13, p. 9555 – 9563, 1993.

Ratcliffe, N. A. Invertebrate immunity — A primer for the non-specialist. **Immunology Letters,** Wales, UK, v. 10, n. 5, p. 253 – 270, 2002.

Rech, M. D. Trafficking and signaling by fatty-acylated and prenylated proteins, **Nature Chemical Biology**, v. 2, p. 584 – 590, 2006.

Ramage, G.; Rajendran, R.; Sherry, L.; Williams, C. Fungal biofilm resistence. **International Journal of Microbiology**, Dalnair Street, Glasgow, v. 2012, p. 1 – 14, 2012.

Ramarao, N.; Leroux, C. N.; Lereclus, D. The Insect *Galleria mellonella* as a Powerful Infection Model to Investigate Bacterial Pathogenesis. **J Vis Exp**, França, v. 70, p. 1 - 7, 2012.
Rementeria1, A.; Molina, N. L.; Ludwig, A.; Vivanco, A. B.; Bikandi, J.; Pontón J.; Garaizar J. Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence, **Rev Iberoam Micol**, Leioa, Spain, v. 22, p. 1 – 23, 2005.

Renwick, J.; Daly, P.; Reeves, E. P.; Kavanagh, K. Susceptibility of larvae of Galleria mellonella to infection by *Aspergillus fumigatus* is dependente upon stage of conidial germination. **Mycopathologia**. ed. 161: 377 – 384, 2006.

Revees, E. P.; Messina, C. G.; Doyle, S.; Kavanagh, K. Correlation between gliotoxin production and virulence of *Aspergillus fumigatus* in *Galleria mellonella*. **Mycopathology**, County Kildare, Ireland, v. 158, n. 1, p. 9 – 79, 2004.

Rhodes, J. C.; Oliver, B. G.; Askew, D. S.; Amlung, T. W. Identification of genes of *Aspergillus fumigatus* up-regulated during growth on endothelial cells. **Med Mycol**, v. 39, p. 253 – 260, 2001.

Roca, M. G.; Arlt, J.; Jeffree, C. E.; Read, N. D. Cell biology of conidial anastomosis tubes in *Neurospora crassa*. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 911–919, 2005-a.

Roca, M. G.; Davide, L. C.; Mendes-Costa, M. C.; Wheals, A. Conidial anastomosis tubes in *Colletotrichum*. **Fungal Genetics & Biology**, Minas Gerais, Brasil, v. 40, n. 2, p.138–145, 2003.

Roca, M. G.; Read, N. D.; Wheals, A. E. Conidial anastomosis tubes in filamentous fungi. **Microbiology Letters**, Minas Gerais, Brasil, v. 249, n. 2, p. 191–198, 2005-b.

Romano, J.; Nimrod, G.; Ben-Tal, N.; Shadkchan, Y.; Baruch, K.; Sharon, H.; Osherov, N. Disruption of the Aspergillus fumigatus ECM33 homologue results in rapid conidial germination, antifungal resistance and hypervirulence. **Microbiology**, Tel-Aviv, Israel, v. 152, p. 1919 – 1928, 2006.

Rothman, J. E. Mechanisms of intracellular protein transport. **Nature**, Nova Iorque, v. 372, p. 55 – 63, 1994.

Salzet, M. Vertebrate innate immunity resembles a mosaic of invertebrate immune responses. **Trends in Immunology**, Lille, France, v. 22, n. 6, p. 285 – 288, 2001.

Sambrook, J; Russel, D. W. Molecular Cloning. **A Laboratory Manual**. ed. 3, v.1 New York: CSH Press, London, 2001.

Sánchez-León, E.; Bowman, B.; Seidel, C.; Fisher, R.; Novisk, P.; Riquelme, M. The Rab GTPase YPT-1 associates with golgi cisternae and *spitzenkörper* microvesicles in *Neurospora crassa*. Baja California, México, v. 95, n. 3, p.472 – 490, 2015.

Shapiro, R. S.; Zaas, A. K.; Betancourt-Quiroz, M.; Perfect, J. R.; Cowen, L. E. The Hsp90 cochaperone Sgt1 governs *Candida albicans* morphogenesis and drug resistance. **PLoS ONE**, Ontário, Canadá, v. 7, n. 9, e.44734, 2012. Shao, R. G.; Shimizu, T.; Pommier Y. Brefeldin A is a potent inducer of apoptosis in human cancer cells independently of p53. **Exp Cell Res**, Bethesda, Maryland, v. 227, n. 2, p. 190 – 196, 1996.

Shao, W.; Zhang, Yu.; Wang, J.; Lv, C.; Chen, C. BcMtg2 is required for multiple stress tolerance, vegetative development and virulence in *Botrytis cinerea*. Scientific Reports, Nanjung, China, v. 6, p. 1 - 10, 2016.

Shin, H. W.; Kobayashi, H.; Kitamura, M.; Waguri, S.; Suganuma, T.; Uchiyama, Y.; Nakayama, K. Roles of ARFRP1 (ADP-ribosylation factor-related protein 1) in post-Golgi membrane trafficking. **J. Cell Sci**, Kyoto, Japão, v. 118, n. 17, p. 4039-4048, 2005.

Silva, S.; Henriques, M.; Martins, A.; Oliveira, R.; Williams, D.; Azevedo, J. Biofilms of non-*Candida albicans Candida* species: quantification, structure and matrix composition. **HealtCare**, Braga, Portugal, v. 47, p. 681 – 689, 2009.

Serrano, R. Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. **Cytol**. Valencia, Espanha, v.165, p. 1-52, 1996.

Setty, S. R., Strochlic, T. I., Tong, A. H., Boone, C. and Burd, C. G. (2004). Golgi targeting of ARF-like GTPase Arl3p requires its Nalpha-acetylation and the integral membrane protein Sys1p. **Nat. Cell Biol**, Philadelphia, v. 6, n. 5, p. 414-419, 2004.

Slater, J. L.; Gregson, L.; Denning, D. W.; Warn, P. A. Pathogenicity of *Aspergillus fumigatus* mutants assessed in *Galleria mellonella* matches that in mice. **Oxford Academy**, Manchester, Reino Unido, v. 49, n. 1, 2011.

Stearns T.; Kahn R.A.; Botstein, D.; Hoyt, M.A. ADP ribosylation factor is an essential protein in *Saccharomyces cerevisiae* and is encoded by two genes. **Mol Cell Biol**, Durhan, v. 10, p. 6690 – 6699, 1990.

Tate, E. W.; Bell, A. S.; Rackham, M. D.; Wright, M. H. N-myristoyltransferase as a potential drug target in malaria and leishmaniasis. **Parasitology**. London, v. 141, n., p. 37 – 49, 2013.

Tao, L.; Yu, J. H. AbaA and WetA govern distinct stages of *Aspergillus fumigatus* development. **Microbiology**, Beijing, China, v. 157, p. 313 – 326, 2011.

Tomiotto-Pellissier, F.; Cataneo, O. H.; Orsini, T. M.; Tomazelli, A. P.; Dalevedo, D. A.; de Oliveira, A. G.; Penagio, L. A.; Costa, I. N.; Conchon-Costa, I.; Pavanelli, W. R.; Almeida, R. S. Galleria mellonella hemocytes: A novel phagocytic assay for Leishmania (Viannia) braziliensis. **Journal Microbiology Methods**, Londrina, Brasil, v. 131, p. 45 – 50, 2016.

Tsai, P. C.; Hsu, J. W.; Liu, Y. W.; Chen, K. Y.; Lee, F. J. S. Arl1p regulates spatial membrane organization at the trans-Golgi network through interaction with Arf-GEF Gea2p and flippase Drs2p. **Cell Biology**, Taiwan, v. 110, n. 8, 2013.

Tse, Y. C.; Lam, S. K.; Jiang, L. Enigmatic Brefeldin A. Plant Signal Behav, Hong Kong, China, v. 2, n. 3, p. 199 – 202, 2007.

VanGuilder, H. D.; Vrana, K. E.; Freeman, W. M. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. **Biotechniques**, Herchey, USA, v. 44, n. 5, p. 619 – 626, 2008.

Vecht-Lifshitz, S. E.; Magdassi, S.; Braun, S. Pellet formation and cellular aggregation in *Streptomyces tendae*. **Biotechnology and Bioengineering**, Jerusalém, Israel, v. 35, n. 9, p. 890–896, 1990.

Verweij, P. E.; Zhang, J.; Debets, A. J. M.; Meis, J. F.; Veerdonk, F. L.; Schoustra, S. E.; Zwaan, J.; Melchers, W. J. G. In-host adaptation and acquired triazole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a dilemma for clinical management. **The Lancet Infectious Diseases**, Nijmegen, Netherlands, v. 16, n.11, p. 251 – 260, 2016.

Vida, T. A.; Emr, S. D. A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. **J. Cell Biol**, La Joilla, EUA, v. 128, n. 5, 779 – 792, 1995.

Wasylnka, J. A; Moore, M. M. Uptake of *Aspergillus fumigatus* conidia by phagocytic and non phagocytic cells invitro: quantitation using strains expressing green fluorescent protein. **Infect Immun**, British Columbia, Canadá, v. 70, p. 3156 – 3163, 2004.

Walther, A., Wendland, J. Septation and cytokinesis in fungi. **Fungal genetics and biology**, Winzerlaer, Alemanha, v. 40, p. 187-196, 2003.

Wang, X.; Wang, Y.; Zhou, Y. Farnesol induces apoptosis-like cell death in the pathogenic fungus *Aspergillus flavus*. **Mycologia**, China, v. 106, n.5, p. 881-888, 2014.

Wennerberg, K.; Rossman, K. L.; Der, C. J.The Ras superfamily at a glance. Journal Cell Sci. v. 118, p. 118 - 843, 2005.

Williams, J. P.; Hallsworth, J. E. Limits of life in hostile environments: no barriers to biosphere function? **Environmental Microbiology**, Belfast, v.11, n.12, p. 3292–3308, 2009.

Wilson, W. W.; Wade, M. M.; Holman, S. C.; Champlin, F. R. Status of methods for assessing bacterial cell surface charge properties based on zeta potential measurements. **Journal of Microbiological Methods**, Mississippi, EUA, v. 43, p. 153 – 164, 2001.

Winston F.; Dollard C.; Ricupero-Hovasse S. L. Construction of a set of convenient *Saccharomyces cerevisiae* strains that are isogenic to S288C. **Yeast**, Chichester, England, v. 11, p. 53–55, 1995.

Wittinghofer, A.; Vetter, I. R. Structure-function relationships of the G domain, a canonical switch motif. **Annu Rev Biochem**, Dortmund, Germany, v. 80, p. 943 – 971, 2011.

Yahara, N. Ueda, T.; Sato, K.; Nakano, A. Multiple roles of Arf1 GTPase in the yeast exocytic and endocytic pathways. **Mol Biol Cell**, Saitama, Japan, v. 12, p, 221 – 238, 2001.

Zahn, C.; Jaschke, A.; Weiske, J.; Hommel, A.; Hesse, D.; Augustin, R.; Lu, L.; Hong, W.; Florian, S.; Scheepers, A. ADP-ribosylation factor-like GTPase ARFRP1 is required for trans-Golgi to plasma membrane trafficking of Ecadherin. **J. Biol. Chem**, Nuthetal, Alemanha, v. 283, n. 40, p. 27179-27188, 2008.

Zeghouf, M.; Gillbert, B.; Zeeh, J. C.; Cherfils, J. Arf, Sec7 and brefeldin A: a model towards the therapeutic inhibition of guanine nucleotide-exchange factors. **Biochemical Society**, France, v. 33, n. 6, p. 1265 – 1268, 2005.

APÊNDICE

APÊNDICE - A

Meios de cultivo

Meio seletivo de levedura (SC URA-)

Base nitrogênio sem aminoácidos	0,7% (p/v)	
Glicose	2% (p/v)	
Leucina; Lisina; Triptofano	0,01% (p/v)	
Histidina	0,005% (p/v)	
Ágar (meio sólido)	2% (p/v)	
Água destilada	q.s.p.	
Solubilizar os componentes em água destilada e esterilizar por meio de autoclave a 120°C		
durante 15 minutos.		

Meio YPD

Peptona	2% (p/v)
Extrato de levedura	1% (p/v)
Glicose	4% (p/v)
Ágar (meio sólido)	2% (p/v)
Água destilada	q.s.p.
Solubilizar os componentes em água destilada, ajustar o pH 6,5 com	NaOH 10 N

Solubilizar os componentes em água destilada, ajustar o pH 6,5 com NaOH 10 N e esterilizar por meio de autoclave a 120°C durante 15 min.

Meio de cultura Luria Bertani (LB)

Cloreto de sódio	0,17 M
Extrato de levedura	1% (p/v)
Triptona	1% (p/v)
Ágar (meio sólido)	2% (p/v)
Água destilada	q.s.p.
Solubilizar os componentes em água destilada e esterilizar por meio de	autoclave a 120°C

durante 15 min.

Meio completo (YG, YG+UU) (Kafer, 1977)

Glicose	2% (p/v)
Extrato de levedura	0,5% (p/v)
Solução de elementos traço	0,1% (v/v)
Ágar (meio sólido)	2% (p/v)
Água destilada	q.s.p.
Solubilizar os componentes em água destilada e esterilizar por	r meio de autoclave a 120°

Solubilizar os componentes em água destilada e esterilizar por meio de autoclave a 120°C durante 15 min. Para a linhagem com genótipo *pyr*G-, adicionar uridina (1,0 g/L) e uracila (1,0 g/L) (YG+UU).

Meio mínimo (MM, MM+UU)

Glicose	1% (p/v)
Solução de sais de Aspergillus sp.	50 mL/L
Solução de elementos traço	0,1% (v/v)
Ágar (meio sólido)	2% (p/v)
Água destilada	q.s.p.
Solubilizar os componentes em água destilada, ajustar o pH 6,5 con	n NaOH 10 N

Solubilizar os componentes em água destilada, ajustar o pH 6,5 com NaOH 10 N e esterilizar por meio de autoclave a 120°C durante 15 min. Para a linhagem com genótipo pyrG-, adicionar uridina (1,0 g/L) e uracila (1,0 g/L) (MM+UU).

Soluções e Tampão

Solução 20x concentrada de sais de Aspergillus sp.

Nitrato de Sódio	3,2 M
Cloreto de Potássio	0,14 M
Dihidrogenofosfato de Potássio	0,2 M
Sulfato de Magnésio Heptahidratado	0,04 M
Água ultrapura	q.s.p.

Solubilizar os componentes em água ultrapura, esterilizar por meio de autoclave a 120°C durante 15 min e utilizar na composição do meio MM.

Solução de elementos traços

Sulfato de Zinco Heptahidratado	75 mM
Ácido Bórico	180 mM
Cloreto de Manganês Tetrahidratado	25 mM
Sulfato de Ferro Heptahidratado	18 mM
Cloreto de Cobalto Pentahidratado	6mM
Sulfato de Cobre Pentahidratado	6 mM
Molibdato de Amônio Tetrahidratado	1 mM
EDTA	140 mM
Água ultrapura	q.s.p.

Solubilizar cada componente por completo antes da adição do próximo conforme a ordem da lista em água destilada. Aquecer até 100 °C e resfriar para 60 °C. Ajustar o pH entre 6,5 e 6,8 com NaOH 10 N, utilizar no preparo dos meios de cultura.

Solução de Protoplastização

Glucanex	.1 % (p/v)
Lisozima	1 % (p/v)
Citrat Buffer pH 5,5	q.s.p.
Solubilizar os componentes em Citrat Buffer e utilizar no protoc	olo de transformação em
A. fumigatus.	

Citrat Buffer

Cloreto de Potássio			150mM
Cloreto de Sódio			580 mM
Citrato de Sódio			50 mM
Água ultrapura			q.s.p.
Solubilizar os componentes er	m água e con	servar sob refrigeração.	

Solução STC1700

Sorbitol	1,2 M
Tris pH 5,5	10 mM
Cloreto de Cálcio	50 mM
Cloreto de Sódio	35 mM
Água ultrapura	q.s.p.
Solubilizar os componentes em água e conservar sob refrigeração.	

Solução PEG4000

Tris Base pH 7,5	10 mM
Cloreto de Cálcio	50 mM
PEG4000	60 % (p/v)
Água ultrapura	q.s.p.
Solubilizar os componentes em água, esterilizar por meio de aut	oclave a 120°C durante
15 min.	

Tampão de Extração

Triton X-100	2% (p/v)
SDS	1% (p/v)
Cloreto de Sódio	1 mM
EDTA	75 mM
Tris-HCl pH 8,0	10 mM
Água ultrapura	q.s.p.
Solubilizar os componentes em água e conservar em temperatura ambiente.	

Tampão Lise

Glicerol	10% (v/v)
Tris-HCl pH 7,5	50 mM
Triton X-100	1% (v/v)
Cloreto de Sódio	150 mM
SDS	0,1% (v/v)
EDTA	5 mM
PMSF	1 mM
Água ultrapura	q.s.p.
Solubilizar os componentes em água conservar sob	refrigeração. O PMSF só deve ser
adicionado no momento de uso.	

Tampão TAE 50x concentrado

Tris base	2 M
Ácido Acético Glacial	5,71% (v/v)
EDTA pH 8,0	0,5 M
Água ultrapura	q.s.p.

Solubilizar os componentes em água e conservar em temperatura ambiente.

Tampão Proteína

Glicina	1,44% (p/v)
Tris base	0,3 % (p/v)
SDS	10% (v/v)
Água ultrapura	q.s.p.
Solubilizar os componentes em água e utilizar na hora.	

Solubilizar os componentes em água e utilizar na hora.

Gel de agarose para eletroforese de DNA

Agarose	1% (p/v)	
TAE 1x	q.s.p.	
Solubilizar a agarose em tampão TAE em forno micro-ondas, após a fusã	o aguardar o	

esfriamento para 50 °C, adicionar SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen), homogeneizar gentilmente, distribuir no suporte e aguardar para polimerização, logo após aplicar as amostras.