UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Caracterização funcional do gene codificador de uma proteína com peptídeo
sinal, *masA*, de *Aspergillus fumigatus*

Tiago Alexandre Cocio

Ribeirão Preto
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Caracterização funcional do gene codificador de uma proteína com peptídeo
sinal, *masA*, de *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

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia no dia 21/06/2016. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Orientado: Tiago Alexandre Cocio
Orientadora: Prof.^a Dr^a Marcia Regina von
Zeska Kress

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.

Cocio, Tiago Alexandre

Caracterização funcional do gene codificador de uma proteína com peptídeo sinal, *masA*, de *Aspergillus fumigatus* 117 p.: il.; 30cm

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

Orientador: von Zeska Kress, Marcia Regina

1. *Aspergillus fumigatus*. 2. Peptídeo Sinal. 3. Quorum sensing 4. Farnesol 5. Biofilme

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Tiago Alexandre Cocio

Título do trabalho: Caracterização funcional do gene codificador de uma proteína com peptídeo sinal, *masA*, de *Aspergillus fumigatus*

Dissertação de Mestrado apresentada 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

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

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicação

Aos meus pais, José Tomas Cocío e Aparecida Márcia Giroti Cocío pelo amor, carinho e orientação. Vocês são fundamentais em todos os momentos e conquistas da minha vida. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Prof^a Dr^a Marcia Regina von Zeska Kress, agradeço por me receber em seu laboratório, pelas críticas construtivas, pelos conselhos pessoais e profissionais, pela paciência que ajudaram na minha evolução como pessoa e como aluno, sei que não fui o aluno perfeito, mas o que eu aprendi com o seu conhecimento e sabedoria vou levar por toda a minha vida - você é um exemplo a ser seguido;

Aos meus queridos e eternos avós Laurindo Giroti, Lídia Caturelli Giroti, Vicente Cocío e Palmira Rinaldi Cocío;

A minha querida irmã Katia Alessandra Cocío Teles pela sua paciência, parceria, conselhos, amizade e companheirismo no momento especial em minha;

Ao meu cunhado Anibal Ferreira Teles Neto pela amizade e companheirismo;

Aos meus tios Luiz Giroti e Sílvia Helena Bertagnoli Giroti pela ajuda durante a minha graduação quando mais precisei. Sem eles este sonho não seria realizado;

Aos meus tios Marlene Giroti Montissani e Ovidio Montissani pela motivação, incentivo e inspiração que me deram durante o meu mestrado e a minha vida;

Aos meus grandes amigos Renato de Carvalho Poch, Elisabete Yamasaki Poch e Lorenzo Yamasaki Poch;

Ao meu grande amigo Antonio Ricardo Tardelli Junior e a família Tardelli;

A minha “cãopanheira” Emily, nos momentos alegres e divertidos durante o processo de seleção do mestrado e tudo o que passamos neste período;

Ao Prof. Dr. Gilberto Úbida Leite Braga do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - FCFRP-USP pela oportunidade de me apresentar o amor a ciência durante a iniciação científica, pela dedicação e incentivo que teve ao longo destes anos;

A Prof^a Dr^a Marcia Eliana da Silva Ferreira do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - FCFRP-USP pela utilização de equipamentos e pela colaboração;

Ao Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - FCFRP-USP pela utilização de equipamentos para análise de expressão gênica;

A Prof^a. Dr^a. Sandra Yasuyo Fukada Alves do Departamento de Física e Química da FCFRP-USP pela utilização de equipamentos para análise de expressão gênica;

Ao Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal - LMMC da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP/USP, Fapesp 2004/08868-0, em especial a técnica Elizabete Rosa Milani e a aluna de pós-doutorado do Prof^o Dr^o Roberto Santana, Laena Pernomian;

Aos técnicos Fernando Grine Martins, Luciano Akira Takami, Luiz Chaím e Luciana Ambrósio pela contribuição, conselhos e amizade para o desenvolvimento deste trabalho;

Um agradecimento especial a Marina Campos Rocha, aluna de doutorado do programa de genética e evolução na Universidade Federal de São Carlos pela ajuda com western blotting;

Aos meus amigos de pós-graduação Ludmilla Tonani Carvalho, Gabriela Braga Rodrigues, Guilherme Brancini, Heliara Maria Spina Canela, Henrique Dantas de Menezes, Julia Gonzales, e Mario Henrique Paziani, por todos os momentos de trabalho e alegria vividos durante esses dois anos;

Aos alunos de iniciação científica, Raquel do Santos Silva e Raphael Festuccia, do laboratório LEGPFF - laboratório de Expressão Gênica e Proteômica de Fungos Filamentosos;

Aos meus “pais da biologia molecular” Profº Drº Everaldo dos Reis Marques e Profª Drª Erika Nascimento pelo todo conhecimento compartilhado comigo desde a graduação até os dias de hoje;

Aos meus professores da graduação, Ana Rosa Crisci, José Jorge Abbud Neto, Jean Zamboni, Lucimara Zuanazi Pinto e Marcelo Nunes Mestriner o meu muito obrigado pela amizade, pelos conhecimentos compartilhados durante a minha formação e o carinho por mim;

Aos meus amigos da graduação: Luciano Tencate, Osmar Cavenaghi, Tathiana Gallo e Tiago Giacomelli obrigado pela amizade e convivência durante este período;

A família Ravagnani Abbud: José Jorge “Abbudera”, Luzia, Stefânia e Yuri, os meus sinceros agradecimentos e amizade nestes anos;

Ao Rikikazu “Seu Miyagi” Yuzo Tsubouchi (in memoriam) e Eduardo Santos pela amizade e ensinamentos nos últimos anos;

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

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

"Seu tempo é limitado, então não o gaste vivendo a vida de outra pessoa. Não fique preso pelos dogmas. O que é viver com os resultados do pensamento de outras pessoas. Não deixe que o barulho da opinião dos outros cale a sua própria voz interior. E mais importante, tenha a coragem de seguir seu coração e intuição. Eles de alguma forma já sabem o que você realmente quer se tornar. Tudo o resto é secundário."

(Steve Jobs - Discurso na universidade de Stanford em 2005)

RESUMO

Cocio, T. A. **Caracterização funcional do gene codificador de uma proteína com peptídeo sinal, *masA*, de *Aspergillus fumigatus***. 2016. 117f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

O gene *MASI/GAS2*, conhecido como “*Magnaporthe Apressoria Specific*”, foi identificado como altamente expresso durante a formação do apressório do fungo filamentosso fito patogênico *Magnaporthe grisea*. Em *Aspergillus fumigatus*, fungo patogênico oportunista, o gene *masA*, ortólogo a *MASI/GAS2* foi identificado como *upregulated* em uma análise transcriptômica exposto a voriconazole e anidulafungina, antifúngicos que afetam a síntese do ergosterol e a parede celular, respectivamente. Em ambos os ortólogos apresentam uma estrutura na região N-terminal da proteína denominada peptídeo sinal o qual neste trabalho foi determinado em uma análise *in silico* a presença de peptídeo sinal na região N-terminal da proteína. Na caracterização fenotípica de uma linhagem *masA* - deletada de *A. fumigatus* não foi identificado alteração estrutural do conidióforo e no seu aspecto macromorfológico. A linhagem *masA*-deletada é resistente a voriconazol e farnesol, drogas que inibem a síntese de ergosterol e a uma molécula *quorum sensing*, respectivamente. Ao avaliar o nível de expressão gênica do *masA* frente a diferentes classes de drogas, foi observado que o gene esta super expresso quando ocorre dano na parede celular, membrana citoplasmática, DNA, inibições na síntese de lipídeos e ácidos graxos e no estresse oxidativo. Na presença de dano na parede celular fúngica causados por anidulafungina, a proteína MasA está localizado na parede celular próximo a ponta da hifa. Adicionalmente, foi capaz de transferir para o meio extra-celular a proteína fusionada a ele, a GFP. Assim, possivelmente MasA participa da via secretória do fungo principalmente em momentos de estresse como o desarranjo da parede celular. A capacidade de secreção natural dos fungos filamentosos tem sido explorada no contexto industrial há décadas. Indicando para este fim, uma possível aplicabilidade para este peptídeo sinal.

Palavras-chave: Peptídeo sinal, *Aspergillus fumigatus*, Quorum sensing, Farnesol, Biofilme, via secretória.

ABSTRACT

Cocio, T. A. Functional characterization of the gene encoding a protein with the signal peptide, *masA*, *Aspergillus fumigatus*. 2016. 117f. **Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.**

The MAS1/GAS2 gene, known as “*Magnaporthe Apressoria Specific*”, was identified as highly expressed during the formation of the appressorium phyto pathogenic filamentous fungus *Magnaporthe grisea*. In *Aspergillus fumigatus*, opportunistic saprophytic fungus, *masA* gene orthologous to MAS1/GAS2 was identified as *upregulated* in a transcriptomic analysis exposed to voriconazole and anidulafungin, antifungals that affect the synthesis of ergosterol and the cell wall, respectively. In both orthologs have a structure at the N-terminus of the protein called signal peptide. During the phenotypic and functional characterization of *masA* gene in *A. fumigatus*, was determined on an *in silico* analysis the presence of signal peptide at the N-terminal region of the protein. In the phenotypic characterization of a strain *masA* – deleted, no structural change of conidiophores and its macromorfologic aspect was not identified. The characterization *masA*-deleted strain is resistant to voriconazol and farnesol drugs which inhibit ergosterol synthesis and a quorum sensing molecule, respectively. When evaluating the level of gene expression *masA* against different class of drugs was observed the super gene is expressed when damage occurs in the cell wall and membrane DNA, the synthesis of lipids and fatty acids, and oxidative stress. In the presence of damage in the fungal cell wall caused by anidulafungin, MasA protein is located near the cell wall and the tip of the hypha and additionally, was able to transfer the protein to the extracellular the protein fused to GFP. Thus, possibly MasA participates in the secretory pathway of the fungus especially in stress of the cell wall. The natural secretion capability of filamentous fungi has been exploited in the industrial context for decades. Indicating for this purpose, a possible applicability for this signal peptide.

Keywords: signal peptide, *Aspergillus fumigatus*, Quorum sensing, Farnesol, Biofilm, secretory pathway.

RESUMEN

Cocio, T. A. Caracterización funcional del gen que codifica una proteína con el péptido señal, *masA*, *Aspergillus fumigatus*. **2016. 117f. Disertación (Maestría). Facultad de Ciencias Farmacéuticas de Ribeirão Preto – Universidad de San Paulo, Ribeirão Preto, 2016.**

El gen MAS1/GAS2, conocido como "*Magnaporthe Apressoria Specific*", se identificó como altamente expresado durante la formación de la appressorium fito patógena hongo filamentoso *Magnaporthe grisea*. En *Aspergillus fumigatus*, hongo saprofita oportunista, se identificó *masA* gen ortólogo de MAS1/GAS2 como *upregulated* en un análisis de transcriptómica expuesto a voriconazol y anidulafungina, antifúngicos que afectan la síntesis de ergosterol y la pared celular, respectivamente. En ambos ortólogos tener una estructura en el extremo N-terminal de la proteína llamada región del péptido señal. Durante la caracterización fenotípica y funcional de gen *masA* de *A. fumigatus* se determinó en un análisis *in silico* de la presencia de péptido señal en la región N-terminal de la proteína. En la caracterización fenotípica de una cepa de *A. fumigatus masA* - deletado ningún cambio estructural de conidióforos y su aspecto macromorfológico no fue identificado. La cepa deletado *masA* caracterización es resistente a voriconazol y farnesol que inhiben la síntesis de ergosterol y una molécula de detección de quórum, respectivamente. Al evaluar el nivel de expresión génica *masA* contra diferentes clases de drogas foi observado el gen súper se expresa cuando se produce daño en la pared celular y la membrana del ADN, la síntesis de lípidos y ácidos grasos, y el estrés oxidativo. En la presencia de daños en la pared celular fúngica causada por anidulafungina, proteína MasA se encuentra cerca de en la pared celular la punta de la hifa y, además, era capaz de transferir al medio extracelular de la proteína fusionada a ella, GFP. Por lo tanto, posiblemente, MasA participa en la vía secretora del hongo sobre todo en momentos de estrés como la ruptura de la pared celular. La capacidad de secreción natural de los hongos filamentosos se ha explotado en el contexto industrial durante décadas. Indicando para este fin, una posible aplicabilidad para este péptido señal.

Palabras-claves: péptido señal, *Aspergillus fumigatus*, *Quorum sensing*, Farnesol, Biofilm, vía secretora.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Conidióforo de *Aspergillus fumigatus*. Adaptado de Alkhayyat *et al.*, 2015. 12
- Figura 2** Clusterização hierárquica dos genes altamente expressos em ensaio de *Microarray* de *A. fumigatus* tratado com anidulafungina (Kress *et al.*, dados não publicados): A barra de cores mostra a razão de Log₂ (Cy5/Cy3) para cada amostra, tendo o Cy3 como valor referência. *chsE*, subunidade do complexo quitina sintase; *agsA*, *agsC*, *fksA*, subunidades do complexo β-1,3-glucano sintase; *mpkA*, mitogen-activated protein kinase A; *masA*, *magnaporthe appressorium suppressed 1*; *hp*, proteína hipotética. 47
- Figura 3** Alinhamento e cladograma das sequências proteicas de MasA de *A. fumigatus* frente aos seus ortólogos: **A.** Mas1 de *M. grisea* (MGR), *F. oxysporum* (FOX), *C. immitis* (CIM), *A. fumigatus* (AFU), *A. flavus* (AFL) e *A. oryzae* (AOR) pela ferramenta Clustal Omega–EMBL/EBI. Linha azul, peptídeo sinal; Quadrado vermelho, sítio de clivagem do peptídeo sinal conservado entre as proteínas (Xue *et al.*, 2002). **B.** Relação filogenética entre as proteínas. Cladograma formado a partir do algoritmo ClustalW2 Phylogeny, formato da árvore Phylip e método de clusterização *Neighbour-joining*. 48
- Figura 4** Análise *in silico* da proteína MasA de *A. fumigatus*. **A.** Análise da sequência peptídica de MasA com a ferramenta BLASTp search-NCBI; DUF, domínio de função desconhecida. **B.** Predição *in silico* de peptídeo sinal utilizando software SignalP 3.0, método de predição “neural network – NN” de MasA (*A. fumigatus*) e **C.** MAS1 (*M. grisea*); **D.** método de predição “hidden Markov models – HMM” de MasA (*A. fumigatus*) e **E.** MAS1 (*M. grisea*); **F.** Predição *in silico* de peptídeo sinal utilizando PHOBIUS - “hidden Markov models – HMM de MasA (*A. fumigatus*) e **G.** MAS1 (*M. grisea*). 49
- Figura 5** Predição *in silico* de peptídeo sinal utilizando PHOBIUS – diferenciação de resíduos de aminoácidos: **A.** Representação estrutural do peptídeo sinal (adaptado de von Heijne, 1990); **B.** Sequencia dos resíduos de aminoácidos da região N-terminal das proteínas MasA de *A. fumigatus* e MAS1 de *M. grisea* mostrando a diferença no peptídeo sinal quanto ao número de resíduos de aminoácidos no N – região carregada positivamente (++) (azul), h – região (vermelho), C-região (verde), sítio de clivagem (azul escuro) e proteína madura (laranja). 50
- Figura 6** Confirmação da deleção de *masA* em *A. fumigatus*: **A.** Representação gráfica do cassete de deleção do gene *masA* e integração homóloga no locus do gene; **B.** Southern Blot das linhagens candidatas *masA* deletado; **C.** PCR das linhagens candidatas *masA* deletado amplificação de 5'UTR::pyrG **D.** Expressão relativa de *masA* das linhagens *masA* deletado ($\Delta masA_1$ a $_9$) em relação a linhagem selvagem (wt). 52

- Figura 7** **Construção do cassete *masA5'UTRmasAORF::GFP::pyrG::masA3'UTR* por recombinação *in vivo* em *S. cerevisiae*:** **A.** Representação gráfica do cassete de construção *masA5'UTRmasAORF::GFP::pyrG::masA3'UTR*. **B.** Verificação em linhagens transformantes de *S. cerevisiae* da fusão dos fragmentos para a construção do cassete *masA5'UTRmasAORF::GFP::pyrG::masA3'UTR*. 54
- Figura 8** **Verificação de integração do cassetes *masA5'UTRmasAORF::GFP::pyrG::masA3'UTR* no genoma de *A. fumigatus*:** **A.** Verificação por PCR da integração do cassete *masA5'UTR::masAORF::GFP::pyrG::masA3'UTR* na região do gene *masA* das linhagens CEA17 $\DeltaakuB^{ku80} pyrG^-$ (primers *masA5'RS_F* e *PYRG_rev* amplifica 4,8 Kb – figura 7A) e **B.** *AmasA-3 pyrG^-* (primers *MASAAFU_1* e *MASAAFU_6* amplifica 7,8 Kb - figura 7A). M, 1 Kb DNA ladder; Kb, kilobase. *, utilizado para metodologia *western blot* com anticorpo anti-GFP; **, utilizado para microscopia confocal, ensaio de virulência em *G. mellonella* e biofilme. 55
- Figura 9** **Caracterização macromorfológica das linhagens mutantes deletadas *masA* frente a linhagem selvagem CEA17 $\DeltaakuB^{ku80} pyrG^+$:** **A.** Colônia gigante das linhagens – I: CEA17 $\DeltaakuB^{ku80} pyrG^+$, II: *AmasA_3* e III: *AmasA_9*; **B.** Diâmetro das colônias gigantes das linhagens CEA17 $\DeltaakuB^{ku80} pyrG^+$, *AmasA_3* e *AmasA_9*. Não apresenta diferença significativa quanto ao diâmetro das colônias ($p>0,05$). 56
- Figura 10** **Estrutura de reprodução assexual (conidióforos) de *A. fumigatus*:** Microcultivo de CEA17 $\DeltaakuB^{ku80} pyrG^+$, *AmasA_3* e *AmasA_9* incubados por 24 horas e 48 horas. Microscopia de campo claro em microscópio em aumento de 1000x. wt, linhagem selvagem CEA17 $\DeltaakuB^{ku80} pyrG^+$; Barra de escalas, 10 μ m. 57
- Figura 11** **Determinação das dimensões dos conídios das linhagens mutantes *AmasA_3* e *AmasA_9*:** Análise microscópica de conídios mostra que não existem diferenças estatísticas significantes no diâmetro e formato entre as linhagens *AmasA_3* e *AmasA_9* com a linhagem selvagem ($p>0,05$). $\Delta ku80$, linhagem selvagem CEA17. 59
- Figura 12** **Taxa de polarização de conídios das linhagens *AmasA_3* e *AmasA_9*:** As linhagens mutantes apresentaram taxa de polarização significativa em 8 horas de desenvolvimento significativa em relação a linhagem CEA17 $\DeltaakuB^{ku80} pyrG^+$, *($p<0,05$). CEA17 $\DeltaakuB^{ku80} pyrG^+$, linhagem selvagem e controle do experimento. 59
- Figura 13** **Agrupamento (*clumping*) de conídios de *A. fumigatus* com e sem a presença de Farnesol **A.**** wt, linhagem selvagem (CEA17 $\DeltaakuB^{ku80} pyrG^+$); *AmasA_3* e *AmasA_9*, linhagens *masA* deletado. Microscopia de campo claro, em aumento de 100x. Barra de escalas 10 μ m. Setas pretas, indicam agrupamentos com mais de 11 conídios. **B.** Representação gráfica dos

agrupamentos de conídios. $\Delta ku80$, linhagem selvagem (CEA17 $\Delta akuB^{ku80} pyrG+$); $\Delta masA_3$ e $\Delta masA_9$, linhagens *masA* deletado. *, alteração estatística significativa ($p < 0,05$).

61

Figura 14 **Análise da resposta ao estresse oxidativo causada por 10% e 15% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂):** I - CEA17 $\Delta akuB^{ku80} pyrG+$, II - $\Delta masA_3$ e III - $\Delta masA_9$ nas concentrações de **A.** 10% e **B.** 5% não apresentaram diferenças fenotípicas quanto a resposta ao estresse oxidativo. Não foi observada diferença estatística, ($p > 0,05$).

62

Figura 15 **Teste de susceptibilidade em ágar com drogas que afetam a parede celular, membrana celular, síntese de DNA e síntese lipídica:** Linhagens CEA17 $\Delta akuB^{ku80} pyrG+$, $\Delta masA_3$ e $\Delta masA_9$ foram inoculadas na superfície do meio de cultura pela técnica *drop out* a partir de uma suspensão 1×10^8 conídios/mL seguida de 4 diluições seriadas 1:10. C-, sem indução com droga; ANI, Anidulafungina (10 µg/mL); CAS, Caspofungina (15 µg/mL); CW, Calcofluor White (75 µg/mL); CR, Congo Red (75 µg/mL); MIR, Miriocina (25 µg/mL); VOR, Voriconazol (350 ng/mL); AMB, Amfotericina B (350 ng/mL); CER, Cerulenina (2,5 µg/mL); FIT, Fitoesfingosina (100 µg/mL); FAR, Farnesol (2 mM); MEN, Menadiona (10 µM) e 5 – FC, 5 – Flucitosina (500 ng/mL).

63

Figura 16 **Tolerância a diferentes pH e temperaturas:** Conídios da linhagem selvagem CEA17 $\Delta akuB^{ku80} pyrG+$ ($\Delta ku80$ linha em azul) e *masA* deletado ($\Delta masA_3$ linha em laranja) foram incubados em diferentes pHs (5,5, 6,5, 7,5 e 8,5) e temperaturas (28, 37 e 45°C). O diâmetro da colônia foi medido a cada 24 horas até completar 96 horas de incubação. *, diferença estatística entre as linhagens a 45 °C, pH 8,5 e 96 horas de desenvolvimento ($p < 0,05$).

65

Figura 17 **Formação de Biofilme na presença de Anidulafungina e de Farnesol:** *, diferença estatística significativa ($p < 0,05$). wt, linhagem selvagem CEA17 $\Delta akuB^{ku80} pyrG+$; C, Controle Negativo; FAR, Farnesol (300 µM); ANI, Anidulafungina (16 ng/mL).

67

Figura 18 **Caracterização do perfil de virulência do gene *masA*:** **A.** Modelo murino imunossuprimido - PBS (tampão salina), wt (CEA17 $\Delta akuB^{ku80} pyrG+$) e $\Delta masA_1$ (n = 10 por linhagem) com leitura a cada 24 horas. Uma réplica biológica. **B.** Larvas de *G. mellonella* submetidas a infecção artificial com as linhagens $\Delta masA_3::pyrG$, $\Delta masA_3 masA::GFP::pyrG$ e CEA17 $\Delta akuB^{ku80} pyrG+$ (n = 20 por linhagem) com leitura a cada 24 horas. Três réplicas biológicas. Não foram observadas diferenças estatísticas ($p > 0,05$). PBS, tampão salina fosfato; wt, linhagem selvagem CEA17 $\Delta akuB^{ku80} pyrG+$; Time (days), dias; Survival, taxa de sobrevivência.

68

Figura 19 **Análise da expressão gênica relativa por qPCR do gene *masA* em linhagem selvagem de *A. fumigatus*.** Os valores foram normalizados com o gene *housekeeping gpdA*. A razão *masA/gpdA* para o tratamento sem droga (C-) foi determinado como valor para o qual foram normalizados todos os níveis de transcrição. O micélio da linhagem selvagem CEA17 $\Delta akuB^{ku80} pyrG+$ foi

tratado por uma hora com drogas que atuam na **A. Parede celular:** (ANI, Anidulafungina (1 µg/mL); CAS, Caspofungina (16 µg/mL); CW, Calcofluor White (75 µg/mL); CR, Congo Red (150 µg/mL); **B. Membrana celular:** AMB, Amfotericina B (1 µg/mL); VOR, Voriconazol (500 ng/mL); **C. Lipídios:** CER, Cerulenina (10 µg/mL); FIT, Fitoesfingosina (50 µg/mL); MIR, Miriocina (30 µg/mL); FAR, Farnesol (2 mM); **D. Estresse oxidativo:** MEN, Menadiona (10 µM) e **E. Dano ao DNA:** 5 – FC, 5 – Flucitosina (300 µg/mL). As barras de erro se referem ao desvio padrão da duplicata de uma réplica biológica que foi representativa do resultado encontrado em três réplicas biológicas. Todos os resultados da expressão genica relativa apresentaram significância estatística ($p < 0,05$).

70

Figura 20 Western blotting MasA::GFP com anticorpo anti-GFP: **A.** Proteínas extraídas do micélio linhagens MasA::GFP que foram induzidos ou não com anidulafungina foram marcadas com anti-GFP. A razão anti-GFP/anti-γ tubulina é referente ao sinal em 50 kDa; **B.** Proteínas extraídas do meio de cultura oriunda do crescimento das linhagens MasA::GFP que foram induzidos ou não com anidulafungina. C+, GFPPYRG; C-, linhagem selvagem (CEA17ΔakuB^{ku80} pyrG+); 1 a 5, MasA::GFP; 1+ a 5+, MasA::GFP tratado com anidulafungina (1 µg/mL) por duas horas; GFP, *green fluorescent protein*; SDS-PAGE CBB, sodium dodecil sulfato *polyacrylamide gel electrophoresis* Coomassie Brilliant Blue, kDa, kilodaltons.

72

Figura 21 Microscopia confocal de uma linhagem MasA::GFP de *A. fumigatus*: **A.** Linhagem selvagem CEA17ΔakuB^{ku80} pyrG+, **B.** ΔmasA_3 masA::GFP sem indução de Anidulafungina, e **C.** ΔmasA_3 masA::GFP com indução de Anidulafungina (1 µg/ml). Imagens capturas no equipamento Leica TSC SP5, com objetiva de imersão em água (63x), laser a 458 a 8% (excitação 470 nm e emissão 550 nm). O software de análise utilizado foi Leica Application Suite – Advanced Fluorescence Lite 2.3.0 (LAS – AF Lite). Barra de escalas, 10 µm.

73

Figura Complementar 1 Via de integridade da parede celular. GEF, *guanine nucleotide exchange factor*; GTPase, *guanosina trifosfatase*; MAPK, *mitogen activated protein kinases*; RE, *retículo endoplasmático*; CG, *complexo de golgi*. Adaptado de Malavazi *et al.*, 2014.

115

Figura Complementar 2 Via biossintética do mevalonato e ergosterol. CoA, *coenzima A*; HMG-CoA, *3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A*; VOR, *voriconazol*; AMB, *anfotericina B*. Adaptado de Onyewu *et al.*, 2003.

116

Figura Complementar 3 Via biossintética dos esfingolipídios. Adaptado de Fornarotto *et al.*, 2005.

117

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
×	Veze
°C	Grau Celsius
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrometro
μM	Micromolar
5-FOA	Ácido 5-fluoroorótico
CaCl ₂	Cloreto de calcio
CH ₃ COOH	Ácido Acético Glacial
CH ₃ OH	Metanol
cm	Centímetros
CoCl ₂ .5H ₂ O	Cloreto de Cobalto pentaidratado
Cu(SO ₄).5H ₂ O	Sulfato de Cobre pentaidratado
DMSO	Dimetilsulfóxido ou Sulfóxido de dimetilo
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FeSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato Ferroso Heptaidratado
g	Grama
g	Gravidade
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₃ BO ₃	Ácido Bórico

HEPES	N-(2-hidroxietyl) piperazina-N'-etanosulfônico
KCl	Cloreto de potássio
kDa	Unidade de massa atômica
KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotássico
L	Litro
LiOAc	Acetato de Litio
M	Molar
m/v	Relação massa-volume
MES	2-(N-morfolino) etanosulfônico
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de Magnésio Heptahidratado
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MnCl ₂ .4H ₂ O	Cloreto de Manganês Tetraidratado
N	Normal
Na ₂ HPO ₄	Sulfato de sódio
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	Citrato de Sódio
NaCl	Cloreto de sódio

NaH ₂ PO ₄	Fosfato Monossódico
NaNO ₃	Nitrato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
ng	Nanogramas
nm	Nanometro
p/v	Peso / volume
PBS	Salina tamponada com tampão fosfato (Phosphate buffered saline)
PEG	Polietileno Glicol
pH	Potencial de hidrogênio iônico
rpm	Rotações por minuto
SSC	Tampão Citrato de Sódio
STC 1700	Sorbitol, Tris e Cloreto de Cálcio
TAE	Tris Acetato EDTA
TBST	Solução salina tamponada com Tris
TE	Tris - EDTA
TEMED	Tetrametil etileno diamina
UMP	Urácil monofostato
v/v	Volume / volume
γ	Gama
ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de Zinco Heptaidratado
β	Beta

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Linhagens de <i>Aspergillus fumigatus</i>	16
Tabela 2 - Linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
Tabela 3 - Linhagem de <i>Escherichia coli</i>	17
Tabela 4 - Vetores utilizados neste trabalho.....	17
Tabela 5 - Drogas utilizadas neste trabalho.....	17
Tabela 6 - <i>Primers</i> construção do cassete de deleção <i>masA5'UTR::pyrG::masA3'UTR</i>	21
Tabela 7 : <i>Primers</i> para construção do cassete <i>masA5'UTRmasA ORF::GFP::pyrG::masA3'UTR</i>	24
Tabela 8 : <i>Primers</i> utilizados para análise de expressão do gene <i>masA</i>	40
Tabela 9 : Predição <i>in silico</i> de peptídeo sinal (SignalP3.0).....	46

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
RESUMEN.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	viii
LISTA DE TABELAS.....	xi
SUMÁRIO	xii
1 – Introdução	1
1.1 – A proteína <i>Magnaporthe Apressoria Specific</i> (MAS) 1.....	1
1.2 – Peptídeo sinal e via secretória	2
1.3 - <i>Quorum sensing</i> e Farnesol	5
1.4 – A parede celular fúngica em <i>Aspergillus</i> sp.	7
1.5 – O fungo oportunista humano <i>Aspergillus fumigatus</i>	9
2 – Objetivo geral.....	14
3 – Materiais e Métodos	16
3.1 – Linhagens e Vetores.....	16
3.2 – Soluções estoque de drogas	17
3.3 – PROTOCOLOS ADOTADOS	18
3.3.1 – Análise <i>in silico</i> do gene <i>masA</i>	18
3.3.2 – Preparo dos esporos e suspensões de conídios	19
3.3.3 – Extração do DNA genômico de <i>Aspergillus</i> sp.....	19
3.3.4 – Construção do cassete de deleção <i>masA5'UTR::pyrG::masA3'UTR</i>	20
3.3.5 – Obtenção de uma linhagem $\Delta masA::pyrG^-$	22
3.3.6 – Construção do cassete para obter linhagem MasA::GFP em <i>A. fumigatus</i>	23
3.3.7 – Extração DNA genômico de levedura	25
3.3.8 – Eletrotransformação em <i>E. coli</i>	25
3.3.9 – Extração de DNA plasmidial de <i>E. coli</i>	26
3.3.10 – Transformação em <i>A. fumigatus</i>	27
3.3.11 – <i>Southern Blotting</i>	28

3.3.12 – Caracterização da deleção/construção/complementação por PCR.....	29
3.3.13 – Análises fenotípicas dos mutantes	30
3.3.14 – Teste de sensibilidade frente as variações ocasionados por estresse oxidativo, variação de pH e temperatura e resposta a exposição a diferentes drogas e antifúngicos.	32
3.3.15 – <i>Western blotting</i>	34
3.3.16 – Microscopia de fluorescência	36
3.3.17 – PCR quantitativo.....	37
3.3.18 – Ensaio de virulência.....	40
3.3.19 - Análise estatística.....	42
4 – Resultados	44
4.1 – Análise <i>in silico</i> da proteína MasA de <i>Aspergillus fumigatus</i>	44
4.2 – Deleção do gene <i>masA</i> de <i>A. fumigatus</i>	50
4.3 – Obtenção de uma linhagem $\Delta masA pyrG^-$	53
4.4 – Construção do cassete para obter linhagem MasA::GFP em <i>A. fumigatus</i>	53
4.5 – Caracterização fenotípica das linhagens <i>masA</i> deletado e <i>masA</i> complementado	55
4.5.1 – Características macromorfológicas	56
4.5.2 – Característica Micromorfológica do conidióforo	57
4.5.3 – Determinação do diâmetro dos conídios.....	58
4.5.4 – Teste de polarização dos conídios	58
4.5.5 – Observação de agrupamento (<i>clumping</i>) dos conídios.....	60
4.6 – Teste de sensibilidade frente as variações ocasionados por estresse oxidativo, variação de pH e temperatura e resposta a exposição a diferentes drogas e antifúngicos.	62
4.6.1 – Estresse oxidativo com peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	62
4.6.2 – Drogas que afetam parede e membrana celular, lipídios, estresse oxidativo e dano ao DNA	63
4.7 – Tolerância a pH e temperatura	64
4.8 – Formação de biofilme com e sem a presença de Farnesol e Anidulafungina	66
4.9 – Caracterização do perfil de virulência do gene <i>masA</i>	67
4.9.1 – Virulência em modelo alternativo <i>G. mellonella</i>	67
4.9.2 – Virulência da linhagem $\Delta masA_1$ em modelo murino imunossuprimido	68

4.10 – Avaliação de expressão do gene <i>masA</i> frente a drogas que afetam parede e membrana celular, lipídios, estresse oxidativo e dano ao DNA	69
4.11 – Identificação da proteína MasA em micélio e meio de cultura por <i>western blotting</i>	70
4.12 – Localização da proteína MasA::por microscopia de fluorescência	72
5 – Discussão	75
6 - Conclusão	85
7- Referência Bibliográfica	87
8 – Apêndice.....	103
8.1 – Meio de cultura	103
8.1.1 – Meio de cultura para <i>A. fumigatus</i>	103
8.2.2 – Meios de Cultura para <i>S. cerevisiae</i>	105
8.2.3 – Meio de cultura para <i>E. coli</i>	106
8.3- Soluções.....	106
8.3.1 – Soluções para ensaios de recombinação <i>in vivo</i> em <i>S. cerevisiae</i>	106
8.3.2 – Soluções para transformação em <i>A. fumigatus</i>	108
8.3.3 – Soluções para ensaios com DNA.....	109
8.3.4 – Soluções para ensaios com proteínas	110
8.3.5 – Soluções para <i>Southern Blotting</i>	112
8.3.6 – Soluções para <i>Western Blotting</i>	113

1. INTRODUÇÃO

“A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada, ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro”

Albert Einstein - Físico

1 – Introdução

1.1 – A proteína *Magnaporthe Apressoria Specific* (MAS) 1

O gene *MAS1*, também denominado *GAS2*, é oriundo da expressão ‘*Magnaporthe Apressoria Specific*’ e foi identificado como altamente expresso durante a formação do apressório do fungo filamentoso fito patogênico *Magnaporthe grisea* (Xue *et al.*, 2002). Neste fungo, Irie *et al.* (2003) identificou alta expressão do gene *MAS1/GAS2* na formação do apressório induzido com adenosina 3’5’ -monofosfato (AMP) cíclico. Genes ortólogos putativos a *MAS1/GAS2* de *M. grisea* foram identificados em outros fungos filamentosos patogênicos como *Neurospora crassa*, *Aspergillus fumigatus* e *Metarhizium anisopliae*. Além disso, não foram encontrados ortólogos no fungo filamentoso não patogênico *Aspergillus nidulans* e nas leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* e *Candida albicans*. Mostrando assim, que a proteína *MAS1/GAS2* é conservada entre fungos patogênicos e restritos aos fungos filamentosos (Xue *et al.*, 2002, Grell *et al.*, 2003). Esta proteína é conservada e apresenta um peptídeo sinal na região N-terminal da proteína, possivelmente para a função na via secretória (Justesen *et al.*, 1996).

Foi observado que *MAS1/GAS2* está abaixo da proteína *PMK1* na via da MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*), que por sua vez é responsável pela regulação de várias atividades celulares, inclusive na formação do apressório (Xue *et al.*, 2002 e Park *et al.*, 2002). Na via da PMK-MAPK, a expressão de *MAS1/GAS2* está reprimido em mutante *PMK1* e em contrapartida, este gene está altamente expresso em mutante *MAS1/GAS2* de *M. oryzae* (Jin *et al.*, 2013). Além disso, a via de sinalização *Pkc1*, que está *upstream* a *PMK1*, gera resistência a farnesol em *S. cerevisiae* (Fairn *et al.*, 2007). O gene *gEgh16H1* do fungo filamentoso fito patogênico e biotrófico obrigatório *Blumeria graminis* é o ortólogo de *MAS1/GAS2*. Este gene foi encontrado altamente expresso em estudos de interação entre fungo e planta na fase da germinação dos conídios e, portanto, possivelmente associado com o

desenvolvimento do tubo germinativo e crescimento da hifa. É também sugerido que a proteína possa ser secretada na parede celular da hifa e/ou secretada pela hifa na superfície da planta (Justesen *et al.*, 1996). A deleção do *MAS1/GAS2* no genoma de *M. grisea* não causou alterações no crescimento vegetativo, desenvolvimento assexual e sexual do fungo. Contudo, houve uma redução na capacidade de penetração do apressório e desenvolvimento da lesão indicando uma possível função como fator de virulência (Xue *et al.*, 2002). Em ensaios de localização celular, a proteína *MAS1/GAS2* fusionada a *green fluorescent protein* - *GFP* (*GAS2::GFP*) e foi observada no citoplasma do apressório de *M. grisea* (Xue *et al.*, 2002).

Em *A. fumigatus* este gene foi identificado como altamente expresso em uma análise transcriptômica do fungo exposto a Voriconazole (da Silva Ferreira *et al.*, 2006) e anidulafungina (von Zeska Kress *et al.*, dados não publicados) que são antifúngicos que afetam a síntese do ergosterol e a parede celular, respectivamente. Este gene foi identificado como altamente expresso em linhagem mutante para o gene *brlA* (Twumasi-Boateng *et al.*, 2009) que codifica uma proteína altamente requerida na conidiogênese de *A. nidulans* (Adams *et al.*, 1988). Além disso, a expressão de *masA* está reprimida em mutante para o fator de transcrição *stuA* (Twumasi-Boateng *et al.*, 2009), que está envolvido em um complexo controle genético e morfológico do conidióforo de *A. nidulans* (Miller *et al.*, 1991).

1.2 – Peptídeo sinal e via secretória

Peptídeo sinal ou sequência sinalizadora foi postulado pela primeira vez em 1970 por Günter Blobel e colaboradores. É constituído de uma sequência de aminoácidos que está localizada na região N-terminal da pré-proteína. O peptídeo sinal apresenta uma variação quanto à composição de aminoácidos e o seu tamanho que pode ter entre 15 a 25 de resíduos de aminoácidos. A estrutura está dividida em três domínios distintos: (1) região amino-terminal ou N-região com carga positiva que pode ser composta de 1 a 6 aminoácidos, (2)

região central hidrofóbica ou h-região que pode ser composta de 7 a 15 aminoácidos e (3) região carboxi-terminal ou C-região com carga polar que pode ser composta de 3 a 7 aminoácidos (Von Heijne e Abrahmsén, 1989 e Von Heijne, 1990). A C-região é um importante local de reconhecimento da enzima peptidase - sinal que realiza a clivagem e consequente maturação da pré-proteína (De Bona *et al.*, 2012 e Messina *et al.*, 2012). Alterações particulares no padrão de carga na N-região e C-região apresentam pouco efeito, enquanto que o encurtamento da H-região pode causar consequências severas na importação da proteína (Nilsson *et al.*, 2015). Além disso, a presença de grande carga positiva na C-região também foi prejudicial no direcionamento de proteína (Fujita *et al.*, 2011).

Proteínas solúveis que carregam em sua região N-terminal um peptídeo sinal são normalmente endereçadas ao retículo endoplasmático (RE) (Schatz e Robberstein, 1996). O reconhecimento deste peptídeo sinal ocorre durante a importação co-traducional ou pós-traducional da proteína (Johnson *et al.*, 2013b). Em leveduras, a escolha da rota de transporte é influenciada pela hidrofobicidade do sinal alvo onde a mesma favorece a importação co-traducional da proteína ao RE (Ng *et al.*, 1996). A entrada da proteína no RE é desencadeada pelo peptídeo sinal diretamente após o aparecimento da cadeia peptídica nascente no local de saída do ribossomo. Estes peptídeos são reconhecidos por partículas de reconhecimento de sinal (*signal recognition particle* – SRP) e diretamente guiados ao lúmen do RE (Nakaia *et al.*, 2000). Existe também a importação pós-traducional de proteína ao RE o qual é independente da SRP e devido à ligação de várias chaperonas da família HSP70, a proteína permanece em estado desdobrado o qual facilita a interação com receptores de membrana no RE que em seguida é transferido para a organela (Hachiya *et al.*, 1993).

Ao entrar no RE, as proteínas secretórias iniciam sua jornada ao meio externo. No RE as proteínas são dobradas e podem sofrer modificações como glicosilação, formação de pontes dissulfeto, fosforilação, sumoilação e montagem de subunidades. Em seguida, as proteínas saem do RE em vesículas de transporte em direção ao complexo de golgi onde

novas modificações podem ocorrer como a glicosilação e processamento de peptídeos. Posteriormente, são direcionadas em vesículas secretórias à membrana plasmática e finalmente secretadas no meio extracelular. Em alguns casos a proteína não atinge o espaço extracelular. Estas são enviadas a compartimentos intracelulares como vacúolos para se tornarem proteínas residentes ou sofrerem a degradação proteolítica (Conesa *et al.*, 2001).

A via secretória de proteínas tem sido estudada em diversos microrganismos, inclusive fungos. Fungos filamentosos como *Aspergillus* spp., *Trichoderma* spp. e *Penicillium* spp. são extraordinários microrganismos capazes de secretar grande quantidade de proteínas. Esta propriedade vem sendo explorada pela indústria de alimentos onde compostos secretados por fungos já são utilizados há décadas (Canesa *et al.*, 2001). Em vários aspectos, as vias secretórias de proteínas de leveduras e fungos filamentosos são similares ao sistema de secreção de proteínas em células de mamíferos. Entretanto, para fungos filamentosos, que são constituídos de hifas tubulares multicelulares que são compostos por compartimentos cilíndricos divididos por septos perfurados, a secreção de proteínas é concentrada na região apical da hifa (Archer e Peberdy, 1997). Gordon e colaboradores (2000) mostraram em *A. niger* que a proteína utilizada como repórter de secreção, glucoamilase, fusionada a *Green Fluorescent Protein* (GFP), foi predominante encontrada nas pontas das hifas. Em *A. oryzae* a chaperona RE-residente BipAp, fusionada a GFP foi visualizada em alta concentração na ponta da hifa, sugerindo que a exigência de chaperonas moleculares é mais urgente na região apical (Maruyama *et al.*, 2006). O complexo de golgi foi localizado por microscopia eletrônica e de fluorescência na região apical dos fungos filamentosos *Pisolithus tinctorius* (Cole *et al.*, 2000) e *A. oryzae* (Kuratsu *et al.*, 2007), respectivamente. Este acúmulo apical do complexo de golgi é consistente com a presença de RE e evidencia a importância na predominante secreção nas pontas das hifas (Shoji *et al.*, 2008).

1.3 - *Quorum sensing* e Farnesol

Quorum sensing (QS) é a habilidade de comunicação microbiana, dependente da densidade celular, que regula inúmeros comportamentos do microrganismo como a morfogênese fúngica, limitação populacional das células, controle da competição por nutrientes, formação de biofilme e a secreção de fatores de virulência, especialmente para a disseminação e o estabelecimento de colônias em locais distantes (Ramage *et al.*, 2005; Henriques *et al.*, 2007). Os microrganismos possuem esta capacidade de comunicação e coordenação celular através da secreção de moléculas sinalizadoras denominadas moléculas *quorum sensing* (MQS) que são acumuladas durante o desenvolvimento do microrganismo até que seja ultrapassado um determinado limiar onde uma resposta regulatória é desencadeada que conduz à expressão ou repressão coordenada de genes alvo dependentes de QS (Wongsuk *et al.*, 2016; Ramage *et al.*, 2009).

A existência do mecanismo QS em fungos foi primeiramente descrito com a descoberta de uma MQS denominada farnesol. Este é um álcool sesquiterpeno (15 carbonos) acíclico gerado pela defosforilação do pirofosfato de farnesil, um intermediário de via metabólica que origina esteróis (*e.g.* ergosterol) e outros compostos isoprenóides de mevalonato (Edwards e Ericsson 1999) em células de mamíferos e fungos. Farnesol é reconhecido como importante membro das vias de sinalização lipídica de fungos patogênicos (Rhome e Del Poeta, 2009). A biossíntese do ergosterol parece ser afetada por farnesol, como foi evidenciado por microscopia de fluorescência onde lipídios foram observados com aspecto aglomerado em comparação com o aspecto uniformemente distribuído observado no fungo não tratado com farnesol (Martin e Konopka, 2004).

Quanto à parede celular fúngica, primeira superfície de contato fúngico com o meio extracelular, foi observado em *A. fumigatus* que o farnesol afeta a sinalização que mantém a organização da parede celular, principalmente para os mutantes de parede celular (Dichtl *et*

al., 2010). Uma via muito importante envolvida na integridade de parede celular fúngica é a via da *Protein Kinase C / Mitogen Activated Protein Kinases* (PKC/MAPK) (Ronen *et al.*, 2007). Além disso, esta via está envolvida no crescimento polarizado, morfogênese (Donen *et al.*, 2007; Teepe *et al.*, 2007), utilização de açúcares (Reyes *et al.*, 2006), estresse osmótico e oxidativo (Davenport *et al.*, 1995; Han e Prade, 2002; Kawasaki *et al.*, 2002; Furukawa *et al.*, 2005), desenvolvimento sexual e viabilidade dos esporos (Kawasaki *et al.*, 2002; Ichinomiya *et al.*, 2007) e produção de penicilina (Herrmann *et al.*, 2006). A via PKC/MAPK é requerida na transdução da resposta a presença do farnesol em células de mamíferos, *S. cerevisiae*, *C. albicans* e *A. nidulans* (Voziyan *et al.*, 1995; Yang e Kazanietz, 2003; Taylor *et al.*, 2005; Fairn *et al.*, 2007; Uppuluri *et al.*, 2007; Savoldi *et al.*, 2008; Román *et al.*, 2009). A expressão constitutiva de Pkc1 leva a resistência de *S. cerevisiae* frente à presença de farnesol, possivelmente pela atividade na regulação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) na cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria (Fairn *et al.*, 2007). Resistência atribuída a farnesol devido a Pkc1 foi observado no ortólogo mutante PkcA em *A. nidulans* chamado *calC2* (Savoldi *et al.*, 2008, Colabardini *et al.*, 2010). Além disso, após a exposição ao farnesol PkcA::GFP não foi localizada na mitocôndria e sim distribuído no citoplasma (Savoldi *et al.*, 2008). MpkA esta *upstream* a PkcA, que quando deletado em *A. nidulans* causa a resistência do fungo a farnesol (Colabardini *et al.*, 2010). Já em *A. fumigatus*, a ausência de *mpkA* leva a sensibilidade a esta droga (Dichtl *et al.*, 2010).

O farnesol exógeno é capaz de controlar a filamentação do fungo oportunista polimórfico *C. albicans* (Hornby *et al.*, 2001) através da modulação da via de sinalização PKA dependente de AMP cíclico (Davis-Hanna *et al.*, 2008). Além disso, farnesol é capaz de inibir a formação de biofilme de *C. albicans* de uma maneira tempo-dependente, onde a inibição ocorre preferencialmente nos momentos iniciais da formação do biofilme (Ramage *et al.*, 2002) o qual é uma possível explicação da não influência do farnesol em células já na fase micelial de desenvolvimento (Mosel *et al.*, 2005). Várias espécies fúngicas são afetadas pelo

farnesol como a inibição da morfogênese do fungo patogênico dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* (Derengowski *et al.*, 2009) e a alteração do crescimento de *Cryptococcus neoformans* (Cordeiro *et al.*, 2012) e *Penicillium expansum* (Liu *et al.*, 2009). Para o fungo leveduriforme *Saccharomyces cerevisiae*, o farnesol exibe um efeito inibitório no crescimento, causado pela geração mitocondrial de espécies EROs (Machida *et al.*, 1998). O farnesol desencadeia hiperpolarização do potencial transmembrana da mitocôndria em levedura e um correspondente aumento da sua atividade ATP-hidrólise (Machida e Tanaka, 1999). Adicionalmente, em *A. nidulans* foi atribuído ao farnesol a indução de fragmentação mitocondrial, condensação nuclear e outros sinais de apoptose (Semighini *et al.*, 2006; Savoldi *et al.*, 2008). A capacidade do farnesol em produzir EROs e sinais apoptóticos também foi mostrado em *C. albicans*, *Fusarium graminearum* e em macrófagos de camundongos (Semighini *et al.*, 2008; Abe *et al.*, 2009; Shirtliff *et al.*, 2009).

1.4 – A parede celular fúngica em *Aspergillus* sp.

A parede celular é uma estrutura essencial para o crescimento, sobrevivência e desenvolvimento morfológico de uma célula fúngica (Latgé *et al.*, 2014; Orlean *et al.*, 2012; Latgé *et al.*, 2007). É uma estrutura rígida considerada um exoesqueleto destes organismos o qual responde rapidamente a estímulos que a célula fúngica possa vir a sofrer (Valiente *et al.*, 2015; Lew, 2011; Brand e Gow, 2009). É a primeira estrutura que entra em contato com as diferentes variações do meio em que o microrganismo se desenvolve e possui um papel importante contra a deficiência de nutrientes e alterações na regulação osmótica, pH e temperatura (Malavazi *et al.*, 2014; Sanchez-Leon *et al.*, 2011; Harris *et al.*, 2005). Variações importantes são determinadas em diferentes ambientes em que o organismo fúngico se desenvolve, sendo este um ambiente externo como o solo ou ambiente interno, como o de um hospedeiro mamífero. Este atua no mecanismo de regulação de acúmulo de substâncias

efetoras durante a infecção no hospedeiro, resistência à resposta imunológica do hospedeiro e também contra substâncias que inibem a sua síntese (Malavazi *et al.*, 2014; Beauvais *et al.*, 2014; Jones *et al.*, 2006; El Gueddari *et al.*, 2002). Trata-se de uma rede tridimensional polissacarídica, que é uma proteção física que atua como um filtro e um reservatório de moléculas como antígenos e enzimas que ativamente atuam durante uma infecção fúngica sendo importante para a resistência à fagocitose (Sales – Campos *et al.*, 2013; Philippe *et al.*, 2003).

Em *A. fumigatus*, 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 α -manana linear com várias repetições de uma unidade oligossacarídica de manose e uma cadeia curta do resíduo $\beta(1,5)$ galactofuranose (Latgé *et al.*, 2014; Beauvais *et al.*, 2014; Hartland *et al.*, 1996; Latgé *et al.*, 1994). Em *A. fumigatus* foram encontradas 8 quitina sintases, *chsA* a *chsG* e *csmB*. As classes IV a VI são diretamente responsáveis pela síntese da quitina da parede celular. As galactomananas são componentes essenciais da parede celular de *A. fumigatus* e se ligam covalentemente a outros polissacarídeos. A síntese da $\alpha(1,3)$ glucano é atribuída a três genes, *agsA*, *agsB* e *agsC*. Todas as três proteínas são expressas durante o desenvolvimento vegetativo e nenhuma delas é essencial para *A. fumigatus* (Beauvais *et al.*, 2004). O complexo glucano sintase é composto de duas proteínas: (i) a putativa subunidade catalítica Fks1, uma grande molécula polipeptídica (>200 kDa) com 16 domínios transmembrânicos e (ii) a subunidade regulatória Rho1, uma GTPase de pequeno tamanho molecular o qual estimula a atividade da $\beta(1,3)$ glucano sintase na sua forma prenilada (Beauvais *et al.*, 2001).

1.5 – O fungo oportunista humano *Aspergillus fumigatus*

Em toda a história de estudo do gênero *Aspergillus*, foram identificadas aproximadamente 200 espécies (Bennett *et al.*, 2009). Em uma publicação de 1727, intitulada *Nova Plantarum*, o padre Antônio Micheli, além de identificar 1400 novas espécies de plantas, identificou 900 espécies de fungos e entre elas está o gênero *Aspergillus*. Fungos deste gênero receberam esta nomenclatura devido à associação do conidióforo (estrutura responsável pela produção de conídios) com o “*Aspergillum*”, instrumento em formato de pincel com furos para aspersão de água benta em cerimônias religiosas (Bennett *et al.*, 2009).

O fungo filamentoso patogênico humano saprofítico e oportunista *A. fumigatus* é uma das principais espécies dentro do gênero *Aspergillus* (Bennett *et al.*, 2009; Latgé *et al.*, 1999). Este fungo apresenta uma distribuição ampla na natureza, onde desempenha o papel de decompositor de matéria orgânica em seu habitat natural submetendo a funções importantes como no processo de fixação do nitrogênio e de carbono (Latgé *et al.*, 1999; Debeaupuis *et al.*, 1997; Mullins *et al.*, 1976) e considerado uma espécie termófila com a capacidade de se desenvolver em temperaturas altas de 55 °C até 70 °C (Latgé *et al.*, 1999; Samson *et al.*, 1999). Esta é uma habilidade essencial para se desenvolver em matéria orgânica em decomposição e para infectar hospedeiros mamíferos. Portanto, os genes relacionados com a tolerância térmica podem também contribuir para a virulência deste fungo filamentoso (Bhabhra *et al.*, 2005).

Suas características micro morfológicas são bem definidas onde o desenvolvimento vegetativo é caracterizado por hifa hialina e septada e a reprodução assexual por conidióforos compostos por célula pé, vesícula, fiálides e conídios com coloração verde – acinzentada com o diâmetro entre 2,5 a 3 µm (Pitt *et al.*, 1994).

Aspergillus sp. inicia seu desenvolvimento de uma forma dependente de nutrientes. Na presença de fonte de carbono, nitrogênio, oligoelementos e água os conídios entram no

período inicial de expansão isotrópica dependente do suporte nutricional (Latgé, 2001). A emissão do tubo germinativo e posterior formação da hifa ocorre de forma polarizada por extensão apical e ramificação para formar uma rede de células interligadas, conhecidos como micélio. Esta fase vegetativa representa a forma mais simples de crescimento fúngico e requer a expansão da membrana plasmática, biossíntese da parede celular e os corpúsculos apicais *Spitzenkörper* como o centro de fornecimento de vesícula. Além disso, múltiplos ciclos de divisão nuclear ocorrem até que as hifas atinjam um determinado tamanho de célula (Steinberg *et al.*, 2007; Harris *et al.*, 2009; Wolkow *et al.*, 1996). Em um tamanho e número de ciclos de divisão nuclear limite é desencadeada a formação do primeiro septo, localizada na base da germinação dos conídios ou esporos. Septos são estruturas formadas de quitina, perpendiculares às paredes internas das hifas com a função de delimitar as células fúngicas além de aumentar a rigidez e para suportar a pressão de turgor (Harris, 2001; Mouriño-Pérez, 2013). Este septo apresenta um pequeno poro que permite a intercomunicação entre as células fúngicas dentro da mesma hifa. Os corpúsculos de Woronin controlam a passagem do citoplasma, organelas e núcleo através deste septo (Collinge e Markham, 1985; Mouriño-Pérez, 2013). Após um período definido de crescimento vegetativo, a qual varia de 16 a 20 horas, as células das hifas chegam a uma fase de competência para o desenvolvimento. Eles passam a responder aos estímulos externos que resultam na indução do desenvolvimento sexual ou assexual (Axelrod *et al.*, 1973; Adams *et al.*, 1998; Mah *et al.*, 2006).

O desenvolvimento assexual ocorre a partir do desenvolvimento vegetativo do fungo, predominantemente quando exposto ao ar na presença de luz e concentrações normais de dióxido de carbono (Adams *et al.*, 1998; Mah *et al.*, 2006;). Inicialmente ocorre a projeção da hifa aérea que alonga gerando uma célula pé de paredes espessas para formar uma haste de conidióforo asséptica (Mims *et al.*, 1988). Após, a ponta da haste começa a intumescer formando uma vesícula o qual contém inúmeros núcleos. A partir da vesícula brotam as metulas que são uninucleadas (Clutterbuck *et al.*, 1969b; Oliver *et al.*, 1972). A partir da

metula brotam as fiálides que são células mitóticas altamente ativas que produzem longas cadeias de conídios uninucleados que exibem a pigmentação verde escuro característica resultante de produtos de genes específicos dos conídios, com função de proteção contra a radiação ultravioleta (Figura 1) (Mayorga e Timberlake, 1990).

Além de sua importância natural, *A. fumigatus* é responsável por importantes infecções em humanos como a Aspergilose Broncopulmonar Alérgica, Aspergiloma e a Aspergilose Pulmonar Invasiva (API) (Chabi, *et al.*, 2015; Sugui *et al.*, 2014; Tekaia, *et al.* 2005; Latgé *et al.*, 1999). A API é a forma mais grave de infecção em humanos e esta principalmente associada a pacientes com a resposta imunológica comprometida. O organismo fúngico é adquirido pelo hospedeiro após a inalação dos conídios assexuais do fungo, os quais estão distribuídos no meio ambiente e são suficientemente pequenos para alcançar as vias aéreas do hospedeiro. Para indivíduos saudáveis (imunocompetentes) os conídios são eliminados pelo sistema de defesa presente nos pulmões. Contudo, quando o sistema imune está comprometido causado por câncer, AIDS, transplantes ou terapia imunossupressora, o conídio pode germinar em hifas e estabelecer um foco de infecção no pulmão (Chabi, *et al.*, 2015; Nucci *et al.*, 2005; Maschmeyer *et al.*, 2007). A crescente população neste grupo de risco ao longo das últimas três décadas esta refletida no aumento no número de pacientes com infecção fúngica invasiva (Pfaller *et al.*, 2007).

Uma vez dentro do hospedeiro humano, os conídios de *A. fumigatus* encontram um ambiente hostil no qual sua capacidade de sobrevivência e colonização dependerá de sua habilidade intrínseca para se adaptar as constantes fontes de estresse. Diversas oportunidades de investigação de vias metabólicas e classes de genes, e de elucidação dos seus principais mecanismos biológicos foram abertas com a disponibilização do genoma de *A. fumigatus* (Nierman *et al.*, 2005). O conhecimento da composição, da arquitetura e do mecanismo biossintético bem como o perfil da expressão gênica do *A. fumigatus* são importantes informações para entender a API e assim levar à determinação de novos alvos terapêuticos

para o tratamento antifúngico. A parede da célula fúngica de *A. fumigatus* representa o primeiro ponto de contato com o hospedeiro e desempenha um papel importante no processo de infecção (Latgé *et al.*, 2014; Malavazi *et al.*, 2014 e Beauvais *et al.*, 2014).

Figura 1: Conidióforo de *Aspergillus fumigatus*.

Adaptado de Alkhayyat *et al.*, 2015.

2. OBJETIVOS

“Você tem que encontrar algo que você ame o suficiente para ser capaz de aceitar riscos, pular sobre os obstáculos e avançar sobre os muros que serão sempre colocados na sua frente. Se você não tem este tipo de sentimento por aquilo que está fazendo, você parará no primeiro grande obstáculo.”

George Lucas – Cineasta e criador da série STAR WARS

2 – Objetivo geral

- ✓ Caracterização fenotípica e funcional do gene *masA* de *A. fumigatus*.

2.1 – Objetivos específicos

- ✓ Caracterização *in silico* do gene *masA* de *A. fumigatus*;
- ✓ Caracterização macro e micro-morfológica de uma linhagem *masA* - deletada de *A. fumigatus* e de uma linhagem complementada $\Delta masA - masA+$;
- ✓ Caracterização do perfil de sensibilidade da linhagem *masA*-deletada na presença de diferentes drogas (antifúngicos, stress oxidativo, dano a parede e membrana celular fungica, entre outras);
- ✓ Caracterização do nível de expressão gênica do gene *masA* frente a diferentes classes de drogas antifúngicas;
- ✓ Caracterização do gene *masA* na formação de biofilme na presença de farnesol;
- ✓ Caracterização do perfil de virulência do gene *masA* e tolerância a pH e temperatura;
- ✓ Localização celular da proteína MasA em *A. fumigatus*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

“Sempre passar o que você aprendeu”

Mestre Yoda - Personagem do filme “Star Wars - O Império Contra-Ataca”

3 – Materiais e Métodos

3.1 – Linhagens e Vetores

As linhagens de *Aspergillus fumigatus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Escherichia coli* utilizadas neste trabalho estão descritas nas tabelas 1, 2 e 3 respectivamente. Os vetores estão descritos na tabela 4.

Tabela 1: Linhagens de *Aspergillus fumigatus*

LINHAGEM	GENÓTIPO	REFERÊNCIA
CEA17 ΔkuB^{ku80}	$\Delta ku80::pyrG+$	Ferreira <i>et al.</i> , 2006
CEA17 ΔkuB^{ku80} pyrG -	$\Delta ku80::pyrG-$	Ferreira <i>et al.</i> , 2006
prx1	$\Delta ku80::pyrG-$ prx1::GFP::pyrG	Malavazi <i>et al.</i> , dados não publicados
TACMK - 1	$\Delta masA_1::pyrG$	ESTE TRABALHO
TACMK - 2	$\Delta masA_3::pyrG$	ESTE TRABALHO
TACMK - 3	$\Delta masA_9::pyrG$	ESTE TRABALHO
TACMK - 4	$\Delta masA masA::GFP::pyrG$	ESTE TRABALHO
TACMK - 5	$\Delta ku80::pyrG-$ masA::GFP::pyrG	ESTE TRABALHO

Tabela 2: Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*

LINHAGEM	GENÓTIPO	REFERÊNCIA
FGSC 9721	MAT α ura3-52 leu-2 Δ 1 trp1- Δ 63 his3- Δ 200 lys2- Δ 202	Winston <i>et al.</i> , 1995

Tabela 3: Linhagem de *Escherichia coli*

LINHAGEM	GENÓTIPO	REFERÊNCIA
DH10B	$\Phi 80dlacZ\Delta M15 \Delta lacX74 endA1 recA1 deoR$ $\Delta(ara,leu)7697 araD139 galU galK nupG rpsL \lambda-$	Grant <i>et al.</i> , 1990

Tabela 4: Vetores utilizados neste trabalho

VETOR	GENÓTIPO	REFERÊNCIA
pRS426		Christianson <i>et al.</i> , 1992
pCDA21		Chaveroche <i>et al.</i> , 2000
p $\Delta masA$	$pRS426 masA5'UTR::pyrG::masA3'UTR$	ESTE TRABALHO
$masA::GFP$	$pRS426$ $masA5'UTRmasAORF::GFP::pyrG::masA3'UTR$	ESTE TRABALHO

3.2 – Soluções estoque de drogas

As soluções estoque de drogas estão descritas na tabela 5.

Tabela 5: Drogas utilizadas neste trabalho

Drogas	Fabricante	Mecanismo de ação	Diluyente	Solução estoque
5 - Flucitosina	Sigma Aldrich® (F7129)	Inibidor da enzima timidilato sintetase	Água estéril	20 mg/mL
Anfotericina B	Sigma Aldrich® (A2411)	Altera permeabilidade membrana celular	DMSO	10 mg/mL
Anidulafungina	Pfizer®	Inibe 1,3- β -D-glucano síntase	Água estéril	10 mg/mL
Caspofungina	Pfizer®	Inibe 1,3- β -D-glucano sintase	Água estéril	10 mg/mL
Calcofluor white	Sigma Aldrich® (F3543)	Altera a montagem das microfibrilas da parede celular	KOH 0,5%, glicerol 83% e água estéril	10 mg/mL

<i>Cerulenina</i>	Sigma Aldrich® (C2389)	Inibe a biossíntese de ácidos graxos	Acetona	20 mg/mL
<i>Congo Red</i>	Sigma Aldrich® (C6277)	Altera a montagem das microfibrilas da parede celular	Água estéril	10 mg/mL
<i>Farnesol</i>	Sigma Aldrich® (277541)	Molécula de <i>quorum-sensing</i> (QS)	Aparência líquida	3,79 mol/L
<i>Fitoesfingosina</i>		Atividade pró apoptótica	Etanol 70%	1,5 mg/mL
	Sigma Aldrich® (M5625)			
<i>Menadiona</i>		Estresse Oxidativo	Etanol	80 mM
	Sigma Aldrich® (M1177)	Inibe a enzima palmitoil transferase	Metanol	5 mg/mL
<i>Miriocina</i>				
<i>Voriconazol</i>	Sigma Aldrich® (32483)	Inibe a biossíntese do ergosterol (14 α -demetilase)	Metanol	5 mg/mL

3.3 – PROTOCOLOS ADOTADOS

3.3.1 – Análise *in silico* do gene *masA*

O gene *masA* de *A. fumigatus* foi identificado em experimento de hibridização *microarray* tratada com diferentes concentrações de anidulafungina (von Zeska Kress *et al.*, dados não publicados). A busca por sequências ortólogas a MasA foi realizada no banco de dados de sequências de proteínas “BLASTp search” no *Basic Local Alignment Search Tool/National Center for Biotechnology Information* (BLAST/NCBI) utilizando a sequência peptídica da proteína MasA (AFUA_8G00610) e MAS1 de *M. grisea* (AAF74764). Os alinhamentos das sequências ortólogas foram realizados com o software Clustal Omega (EMBL EBI - <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

A identificação de peptídeo sinal foi realizada com os *softwares* SignalP 3.0 (Bendsten *et al.*, 2004 - <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/>) e PHOBIUS (Käll *et al.*, 2007 - <http://phobius.sbc.su.se/>).

3.3.2 – Obtenção de conídios de *Aspergillus* sp.

Os conídios das linhagens de *A. fumigatus* utilizadas neste trabalho (*item 3.1* – tabela 1) foram previamente inoculados em meio de cultura completo, YAG, e incubados a 37°C no período de 48 horas de desenvolvimento. Após, os conídios foram coletados com auxílio de água esterilizada e de uma pipeta pasteur para o desprendimento mecânico dos conídios e a sua coleta. Os conídios foram filtrados em lã de vidro esterilizado (Sigma Aldrich®). Após este processo de filtragem, os conídios foram armazenados a 4°C. Para a realização dos experimentos propostos neste trabalho, foi necessário uma contagem dos conídios utilizando a câmara de Neubauer® partindo de uma suspensão de 1:100, assim ajustando a concentração necessária para cada experimento.

3.3.3 – Extração do DNA genômico de *Aspergillus* sp.

A extração do DNA genômico (gDNA) das linhagens de *A. fumigatus* utilizadas neste estudo foi realizada de acordo com modificações do método descrito por Junghans e Metzlaff (1990). 2×10^7 conídios de *A. fumigatus* foram inoculados em meio de cultura líquido (YG) e incubados a 37°C por 16 horas a 180 rpm (Shaker Ecotron – Infors HT - Switzerland) para a produção do micélio que foi coletado por filtração, congelado em nitrogênio líquido e triturados com auxílio de almofariz e pistilo estéril. Para cada 40 mg de micélio triturado foi acrescentado 500 µL de tampão de extração. Foi acrescentado volume igual de fenol (Sigma Aldrich®) e clorofórmio (JT Baker®) 1:1 (v/v) e a mistura foi homogeneizada vigorosamente por cerca de 10 minutos em agitador de tubos (Vortex Mixer – Labnet Internacional) para

precipitar as proteínas e quebrar as membranas e paredes das células. Para sedimentar as proteínas precipitadas e resíduos celulares, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 16000 g (Eppendorf, Alemanha). A fase aquosa foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL (Axygen Scientific, EUA) e foi adicionado o mesmo volume de clorofórmio para retirada de resíduo de fenol e/ou clorofórmio. As amostras foram centrifugadas novamente a 16000 g por 5 minutos, e a fase aquosa superior foi transferida novamente para um micro tubo onde foi acrescentado 0,54 volumes de isopropanol (JT Barker, EUA) e leve agitação para a precipitação do DNA. O sedimento foi lavado com etanol 70% e centrifugado novamente a 16000 g por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e o resíduo de etanol evaporado na temperatura ambiente por 30 minutos. O sedimento foi suspenso em água estéril (Nuclease Free Water - Promega®) e estocado a 4°C. O RNA foi eliminado de cada amostra pelo tratamento com 300 ng/mL de RNase (Pure Link A - Invitrogen™ Thermo Fisher®). A concentração e a pureza do DNA genômico foram quantificados por espectrofotômetro (Implen® - Alemanha) no comprimento de onda de 260 nm e a sua qualidade foi observada em eletroforese de gel de ágarose a 1%. A concentração de cada amostra foi ajustada para 500 ng/μL.

3.3.4 – Construção do cassete de deleção *masA5'UTR::pyrG::masA3'UTR*

A construção do cassete de deleção do gene *masA* foi realizada pelo método descrito por Kuwayama *et al.* (2002). Para a construção do cassete de deleção, o DNA genômico da linhagem selvagem CEA17(*pyrG*+) Δ *akuB*^{ku80} de *A. fumigatus* foi utilizado como molde para a amplificação de fragmentos de aproximadamente 2 kilobases (Kb) das regiões 5' e 3' UTR (*untranslated region*) que flanqueiam a região aberta de leitura (ORF) do gene *masA*. Para a amplificação do marcador auxotrófico *pyrG*, foi utilizado o vetor pCDA21 (Tabela 4), onde estão as regiões promotora, gene e terminadora que são de aproximadamente 1,9 Kb. Para a amplificação dos fragmentos em questão, por PCR, foi utilizada a DNA polimerase de alta

fidelidade Phusion High-Fidelity DNA Polymerase™ (Thermo Scientific®) e os *primers* estão listados na tabela 6. Cada produto da PCR foi fracionado em eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v) e purificados com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean Up System (Promega®). A concentração e a pureza dos produtos da PCR foram quantificadas por espectrofotômetro (Implen® - Alemanha) no comprimento de onda de 260 nm. O cassete de deleção foi construído por PCR de fusão com quantidades equimolares de cada fragmento e os *primers* MASAAFU1 e MASAAFU6 (Tabela 6). A fusão foi possível uma vez que as extremidades de cada fragmento são coesivas entre si. A fusão do cassete de deleção foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1% e purificada com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean Up System (Promega®) e quantificada por espectrofotômetro (Implen® - Alemanha) no comprimento de onda de 260 nm para a transformação em *A. fumigatus*.

Tabela 06: *Primers* utilizados para construção do cassete de deleção *masA5'UTR::pyrG::masA3'UTR*.

Nome do gene/região	Primer	Sequência (5'→3')	Temperatura Anelamento (°C)	Amplicon (pb)
<i>masA</i> 5'UTR	MASAAFU_1	ATTCCCTGGACTCTTAAGG	58	2063
	MASAAFU_2	CGCATCAGTGCCTCCTCTCAGACA GAATGAGATGCTGACTGGTGAAG		
<i>pyrG</i>	MASAAFU_3	CTTACCAGTCAGCATCTCATTCT GTCTGAGAGGAGGCACTGATGCG	58	2000
	MASAAFU_4	GTCCATCTCACGTCATCAATGA ATTGCGCTCAAACAATGCTCTTC		
<i>masA</i> 3'UTR	MASAAFU_5	GAAGAGCATTGTTTGAGGCGAA TTCATTGATGACGTGAGATGGAC	58	2113
	MASAAFU_6	AGACACGAACCAGTCACC		

3.3.5 – Obtenção de uma linhagem $\Delta masA::pyrG^-$

A obtenção de uma linhagem $\Delta masA::pyrG^-$, foi realizado de acordo com da Silva Ferreira *et al.*, 2006, pela incubação de uma linhagem $\Delta masA::pyrG^+$ na presença de ácido 5-fluoroorótico (5-FOA). O gene *pyrG* codifica a enzima orotidina monofosfato (OMP) descarboxilase 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 à formação do metabólito 5-fluoro-UMP, tóxico para a célula. Por este motivo, é desencadeado na célula fúngica um mecanismo de defesa, havendo a expulsão do gene *pyrG* do genoma do organismo.

Assim, os conídios das linhagens $\Delta masA_3$ e $\Delta masA_9$ foram inoculados em forma de cruz em uma placa de petri contendo meio de cultura YAG+UU acrescido de 5-FOA (0,55, 0,75 e/ou 1 ug/ml) e incubado a 37°C por 96 horas ou até o surgimento de crescimento em forma de setores (da Silva Ferreira *et al.*, 2006). Os setores são locais no desenvolvimento do fungo onde ele demonstra maior crescimento, devido a algum fator que facilite o mesmo. Neste caso, devido à expulsão do gene *pyrG* do genoma do fungo provocado pela toxicidade do metabólito 5-fluoro-UMP formado pela presença do 5-FOA adicionado ao meio de cultura e do UMP oriundo do da biossíntese da pirimidina promovido pelo gene *pyrG* funcional. Os esporos das bordas de cada setor foram inoculados ordenadamente em meio de cultura YAG e YAG+UU para testar seu crescimento na ausência e presença de UU. Os candidatos que não cresceram no meio de cultura YAG e cresceram em YAG+UU foram considerados candidatos que expulsaram o gene *pyrG*⁺ (gene funcional) do genoma do fungo e, portanto, não são capazes de crescer na ausência de suplementação do meio de cultura com uridina e uracila (UU).

3.3.6 – Construção do cassete para obter linhagem MasA::GFP em *A. fumigatus*

A construção do cassete *masA*5'UTR*masA*ORF::GFP::pyrG::*masA*3'UTR foi realizada conforme Malavazi e Goldman (2012). O DNA genômico da linhagem CEA17(pyrG+) Δ *akuB*^{ku80} de *A. fumigatus* foi utilizado como molde para a amplificação das regiões 5' e 3' UTR (*untranslated region*) que flanqueiam a região aberta de leitura (ORF) do gene *masA*. Além disso, foi amplificado o gene *masA* (ORF) sem os três ácidos nucleicos que codificam o códon de parada (*stop codon*). A sequência *gfp*::*pyrG* foi amplificada a partir da linhagem prx1::GFP de *A. fumigatus* (Malavazi *et al.*, dados não publicados) (Tabela 1). Todas as PCRs foram realizadas utilizando a DNA polimerase de alta fidelidade Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) e os *primers* estão descritos na tabela 8.

As extremidades dos fragmentos amplificados apresentam extremidades homólogas, para que ocorra a recombinação homóloga entre si e com o vetor pRS426 previamente linearizado com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RI (Promega®).

O vetor linearizado por restrição enzimática e o produto das PCR foram fracionados por 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. A recombinação homóloga em *S. cerevisiae* (cepa FY834) para a construção dos cassetes foi realizada a partir de uma colônia isolada da levedura crescida em meio YPD sólido inoculada em 10 mL de YPD líquido e incubada a 30°C, 200 rpm (Shaker Ecotron – Infors HT - Switzerland) por 16 horas. Após a incubação, 5 mL foram adicionados em 200 mL de YPD líquido e incubados a 30°C, 200 rpm (Shaker Ecotron – Infors HT - Switzerland) por 4 horas. Após o tempo de incubação, a cultura foi centrifugada a 3000 g durante 7 minutos e o sobrenadante foi descartado. Foi realizada uma lavagem com água estéril e centrifugação a 3000 g por 5 minutos. O precipitado foi ressuspensionado em 1 mL de solução

TE 1X/LiOAc (acetato de lítio) e 100 µl dessa suspensão foram adicionados a 100 µg de DNA de espermatozoides de tilápia (Promega) previamente aquecido a 100°C e posteriormente mantido no gelo e a concentrações equimolares do plasmídeo (digerido com enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RI – Promega) e dos fragmentos *masA*5'UTR::*masA*ORF, *GFP*::*pyrG* ou *masA*3'UTR. Foram adicionados 600 µl de solução PEG 3350 40% / LiOAc 1X e os tubos foram incubados a 30°C, 200 rpm (Shaker Ecotron – Infors HT - Switzerland) durante 30 minutos. Após a incubação, 70 µl de DMSO foram adicionados e uma nova incubação foi realizada a 42°C durante 15 minutos, seguido de outra incubação em gelo por 2 minutos. Os conteúdos dos tubos foram lavados com 700 µl de água estéril e centrifugados a 18800 g durante 30 segundos. O sobrenadante foi descartado e as células plaqueadas em meio SC-URA⁻ e incubado a 30°C. Como controle positivo foi feita uma reação utilizando o vetor não digerido com *Bam*HI e *Eco*RI e, como controle negativo a reação sem vetor e fragmentos.

Tabela 07: Primers utilizados para construção do cassete *masA*5'UTR*masA* ORF::*GFP*::*pyrG*::*masA* 3'UTR

Nome do gene/região	Primer	Sequência (5'→3')	Temperatura Anelamento (°C)	Amplicon (pb)
5' UTR ORF <i>masA</i>	<i>masA</i> 5'RS_F	GTAACGCCAGGGTTTTC CAGTCACG	58	2153
	<i>masA</i> GFP_R	TGAAAAGTTCTTCTCCTT TACTCATTC		
<i>GFP</i> :: <i>pyrG</i>	Spacer_GFP_FW	GGAACACGGGGAATGAG TAAAGGAGA	56	2628
	<i>pyrG</i> _Afu_REV	GATATCGAATTCGCCTCA AAC		
<i>masA</i> 3'UTR	<i>masA</i> 3'pyrG_F	GTTTGAGGCGAATTCGAT ATCGAGATG	58	2026
	<i>masA</i> 3'RS_R	GCGGATAACAATTTCACA CAGGAAAC		

3.3.7 – Extração de DNA genômico de levedura

A extração de leveduras foi realizada de acordo com Malavazi e Goldman (2012). As leveduras foram inoculadas em 10 mL de meio SC-URA⁻ líquido e incubada 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 ressuspensas 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 micro tubo foi centrifugado a 22000 g durante 15 minutos, a fase aquosa (superior) foi transferida para um novo micro tubo e, a esta, foram adicionados 540 µL de isopropanol (JT Baker®). O tubo foi homogeneizado suavemente (por inversão) e novamente centrifugado a 22000 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 novamente removido e, após secagem a temperatura ambiente, o precipitado foi ressuspensado em água ultrapura. O DNA foi tratado com 300 ng/ml de RNase (Pure Link A - Invitrogen™ Thermo Fisher®) a 37°C, durante 1 hora.

3.3.8 – Eletrotransformação em *E. coli*

A eletrotransformação em *E. coli* foi realizada de acordo com a adaptação de Chassy e Flickinger, 1987, onde 5 µg do DNA total de *S. cerevisiae*, onde as amostras passaram previamente por um processo de diálise utilizando membrana de nitrocelulose com poros de 0,025 µm com 25 mm de diâmetro (Merck - Milipore®) para a retirada de impurezas, como sais. O volume de 10 µL do DNA total foi adicionado em uma cubeta de eletroporação estéril

(Gene Pulser® Cuvette - *E. coli* Pulser® Cuvette) com 50 µL de células eletrocompetentes de *E. coli* DH10B (Tabela 3). O material foi submetido a descarga elétrica de 200 kV no equipamento Gene PulserXcell (BIO-RAD) seguido da adição de 800 µL de meio de cultura LB líquido. O meio de cultura com as células foi transferido para micro tubo estéril e incubado sob agitação constante de 200 rpm (Shaker Ecotron – Infors HT - Switzerland) a 37°C por 1 hora. Ao término do período de incubação, 100 µL da suspensão foi inoculado na superfície de meio de cultura LB sólido acrescido de 50 µg/mL de ampicilina e incubados a 37°C por 24 horas a fim de selecionar células de *E. coli* que incorporaram o vetor que apresenta o gene de resistência a ampicilina. As colônias foram retiradas da placa com auxílio de um palito roliço de madeira estéril e inoculadas em 20 mL de meio LB líquido com 50 µg/mL de ampicilina e incubado a 37 °C por 24 horas em agitador orbital a 150 rpm (Shaker Ecotron – Infors HT – Switzerland). Após o período de incubação, 700 µL das células foram aliqüotadas em tubos de 1,5 mL acrescidos de glicerol 100 % e armazenados em – 80 °C.

3.3.9 – Extração de DNA plasmidial de *E. coli*

O DNA plasmidial (pDNA) foi extraído de *E. coli* com o kit Pure Yield Plasmid Miniprep System (PROMEGA) seguindo as normas do fabricante. As células de *E. coli* com os vetores portando o cassete *masA5'UTRmasAORF::GFP::pyrG::mas3'UTR* foi centrifugado a 2500 g por 10 minutos, o sobrenadante descartado e as células ressuspendidas em 600 µL de água. O conteúdo foi transferido para um novo microtubo juntamente com 100 µL de Lysis Buffer, homogeneizado, e em seguida acrescido de 350 µL de Neutralization Solution e centrifugado em velocidade máxima por 3 minutos. Com o auxílio de uma pipeta todo o conteúdo do sobrenadante foi transferido para uma mini coluna onde foi centrifugado por 15 segundos na velocidade máxima. Em seguida, foram adicionados 200 µL de Endotoxin Removal Wash e centrifugado em velocidade máxima por 15 segundos. Após, o efluente foi

descartado e foram adicionados 400 µL de Column Wash Solution e centrifugado por mais 30 segundos. A mini coluna foi transferida para um novo micro tubo e adicionada o volume 30 µL de Elution Buffer seguido de incubação por 1 minuto em temperatura ambiente. O DNA foi eluído pela centrifugação final de 15 segundos em velocidade máxima.

3.3.10 – Transformação em *A. fumigatus*

De acordo com Osmani e May (1987), cerca de 10^7 conídios de *A. fumigatus* da linhagem CEA17(pyrG-) $\DeltaakuB^{ku80}$, foi inoculado em 50 mL de meio de cultivo YG+UU líquido e incubados com agitação constante de 180 rpm (Shaker Ecotron – Infors HT - Switzerland) por 16 horas a 37°C. O micélio foi coletado por centrifugação 1500 g por 5 minutos, ressuspenso em solução de protoplastização e incubado por 2 horas a 30°C sob agitação constante de 80 rpm (Shaker Ecotron – Infors HT - Switzerland) para a digestão parcial da parede celular do fungo. Após este tempo, o material foi filtrado em lã de vidro estéril (Sigma Aldrich®) e diluído com 1 volume da solução STC1700 gelado e incubado por 10 minutos em banho de gelo. Centrifugado a 1500 g durante 10 minutos e lavado duas vezes com a solução STC1700 refrigerada a 4°C. Os protoplastos foram ressuspenso em 1 mL da solução STC1700 gelada e alíquotas de 100 – 150 µl foram incubadas com 5 a 10 µg de DNA plasmidial contendo o cassete *masA5'UTRmasAORF::GFP::pyrG::masA3'UTR* e incubado durante 20 minutos em banho de gelo. Após este período, foi adicionado 1 ml da solução PEG 4000, e gentilmente homogeneizada e incubada a temperatura ambiente por 20 minutos. A suspensão de protoplastos foi diluída em pelo menos 15 volumes de meio de cultura Top Agar (1% Agar (p/v)) contendo estabilizador osmótico e seleção (meio de cultura YAG mais 1 M Sorbitol) e incubado a 37°C por 72 horas ou até o aparecimento de transformantes. Os transformantes foram purificados pelo método de esgotamento com três passagens dos

respectivos conídios em meio de cultura YAG. Ao final, os conídios foram coletados e incorporados em glicerol 30% estéril e armazenados em freezer -80°C.

3.3.11 – Southern Blotting

3.3.11.1 – Southern Blotting Alcalino

O DNA genômico da linhagem selvagem e transformantes foram submetidos à restrição enzimática com a endonuclease de restrição *EcoRI*. O produto da restrição enzimática foi fracionado em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X. Para a transferência do DNA genômico fracionado do gel de agarose para uma membrana de nylon (Hybond-N+ Nylon – GE Healthcare), o gel de agarose com o DNA genômico fracionado foi depurinizado com ácido clorídrico fumegante (HCl) 0,25 N por 15 minutos. Após este tratamento o gel foi colocado sobre papel Whatman 3MM previamente embebido em Hidróxido de Sódio (NaOH) 0,4 M. Sobre o gel foram colocados a membrana de nylon e 3 papéis Whatman 3MM do tamanho exato do gel que foram previamente umedecidos em NaOH 0,4 M. O papel Whatman 3MM abaixo do gel estava conectado a um reservatório contendo NaOH 0,4 M. Acima desse bloco foram colocadas várias folhas de papel absorvente e um peso de aproximadamente 0,5 Kg (400 cm³/Kg) para ativar a transferência do material genético para a membrana de nylon por capilaridade. Um parafilme foi colocado entre as bordas do gel e do papel Whatman 3MM para evitar contato entre o reservatório de NaOH 0,4 M e os papéis acima do gel. Após aproximadamente 5 horas de transferência, o sistema foi desmontado e o filtro de nylon foi lavado em SSC 2X. Para fixar o DNA na membrana de nylon ele foi mantido por 2 horas a 80°C.

3.3.11.2 – Marcação da sonda

Como sonda foi utilizada a região 5'UTR do gene *masA* amplificada por PCR utilizando os *primers* MASAAFU_1 e MASAAFU_2 (Tabela 6). A sonda foi marcada com o kit *Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System* (GE Healthcare) segundo o protocolo recomendado pelo fabricante.

3.3.11.3 – Hibridização de ácidos nucleicos

A membrana de nylon com o DNA genômico fracionado foi pré-hibridizada a 55°C com o tampão de hibridização *AlkPhos* por 1 hora em forno de hibridização. A sonda foi marcada com o kit *AlkPhos Direct Labelling and Detection System* como descrito no item anterior, sendo acrescentada à solução de hibridização. A membrana foi incubada com a sonda a 55°C por aproximadamente 16 horas em forno de hibridização, sendo então lavadas duas vezes com tampão de lavagem primário a 55°C por 10 minutos cada e em seguida duas vezes com tampão de lavagem secundário na temperatura ambiente por 5 minutos cada. Após, a ativação do sinal químio-luminescente foi realizada com o kit “CDP Star” (GE Healthcare) e a detecção do sinal pela exposição ao filme de auto-radiografia Hyperfilm ECL High Performance Chemoluminescence Film (Amersham Pharmacia Biotech). A revelação foi realizada com revelador e fixador Kodak.

3.3.12 – Caracterização da deleção/construção/complementação por PCR

O DNA genômico de cada transformante foi extraído de acordo com Junghans e Metzlauff (1990). As PCRs foram realizadas com a enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase™ (Thermo Scientific®).

Para a caracterização por PCR da integração homologa no *locus* desejado foi utilizado *primers* com homologia a região anterior (*upstream*) ou posterior (*downstream*) a sequência presente no cassete utilizado na transformação. Para a caracterização da deleção do gene *masA* foi utilizado o *primer* MASAAFU_7 E MASAAFU_4 e os *primers* que amplificam o gene *masA*, MASAAFU_start e MASAAFU_stop (Figura 6 e Tabela 6). Para a caracterização da recombinação homologa do gene *masA* o cassete *masA::GFP* foram utilizados os *primers* masA5'RS_F e masA3'RS_R respectivamente (Figura 7 e Tabela 7).

3.3.13 – Análises fenotípicas dos mutantes

3.3.13.1 – Análises macroscópicas

Aproximadamente 10^6 conídios das linhagens de *A. fumigatus* foram inoculados no centro da placa de petri de 90x15 mm em meio de cultura YAG e incubado a 37°C por até 92 horas. Foram observadas as características macro morfológicas (aspecto, cor e superfície) e tamanho da colônia gigante de cada linhagem. A cada 24 horas foi mensurado a diâmetro da colônia em centímetros. Experimento realizado com três réplicas biológicas.

3.3.13.2 – Análise microscópica do conidióforo

O micro cultivo das linhagens de *A. fumigatus* foi realizado sobre uma fina camada de meio de cultura YG sólido sobre uma lâmina estéril. Acima do inóculo foi colocada uma lamínula estéril (Knittel Glaser, 22x22 mm) e após incubação a 37°C por 24 horas em câmara úmida. Os conídios, conidióforos e hifas foram observados em microscopia óptica no microscópio Observer Z 1 (Carl Zeiss Jena, Alemanha) com objetiva de 100x. A foto documentação foi realizada por meio de uma câmera acoplada ao microscópio e o respectivo software Scopelimage 9.0. Experimento realizado com três réplicas biológicas.

3.3.13.3 - Análise microscópica dos conídios

Os conídios de *A. fumigatus* suspensos em água destilada esterilizada foram observados em microscopia óptica no microscópio Observer Z 1 (Carl Zeiss Jena, Alemanha) com objetivas de 100x. A fotodocumentação dos conídios foi realizada em microscopia de campo claro em microscópio óptico Observer Z 1 e a utilização do software ScopelImage 9.0. O diâmetro de cada conídio foi medido utilizando o programa de processamento de imagem Java de domínio público ImageJ 1.50i (Abramoff *et al.*, 2004). O experimento foi realizado com três réplicas biológicas com o número de 20 conídios em cada experimento.

3.3.13.4 – Análise de polarização dos conídios

O teste de polarização dos conídios de *A. fumigatus* foi realizado a fim de avaliar o potencial de germinação da linhagem $\Delta masA$ em comparação com linhagem selvagem CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$.

No ensaio de polarização de conídios, cerca de 10^6 conídios de cada linhagem foram inoculados em meio de cultura YG líquido utilizando-se placas de petri 35 x 10 mm com 4 lamínulas estéreis (Knittel Glaser, 22x22 mm) e incubados durante os tempos de 2, 4, 6 e 8 horas a 37°C. Em cada ensaio de polarização foram contados 100 conídios para cada amostra. Foi considerada polarização o conídio que apresenta a projeção do tubo germinativo em sua superfície. Observação em microscopia de campo claro em microscópio óptico Observer Z 1. A fotodocumentação foi realizada por meio de uma câmera acoplada ao microscópio e o respectivo software ScopelImage 9.0. Experimento realizado com três réplicas biológicas.

3.3.13.5 – Teste de formação de Biofilme

O ensaio de formação de biofilme foi realizado de acordo com o método descrito por Li *et al.* (2012). Brevemente, em uma placa para cultura de células de 96 poços de fundo chato adicionou-se 150 µL de meio de cultura YG líquido contendo 10^6 conídios das linhagens CEA17 Δ akuB^{ku80} e Δ masA_3, onde foram submetidas à germinação sem e com a presença de 300 µM de Farnesol e 16 ng/mL de Anidulafungina, incubado a 37°C por 8 horas. Após as 8 horas de desenvolvimento, o meio de cultura foi removido e cada poço foi lavado três vezes com 200 µL de tampão PBS 1X. Após a lavagem, foi adicionado em cada poço 150 µL de corante violeta 0,5% (p/v) e incubados por 5 minutos à temperatura ambiente. O corante foi removido e cada poço foi lavado duas vezes com tampão PBS 1X, com incubações de 2 minutos em cada lavagem para retirar o excesso de corante. As células aderidas na parede de cada poço foram descoradas incubando cada poço da placa por 5 minutos à temperatura ambiente com 200 µL de etanol 95%. Foi transferido de cada poço 150 µL do sobrenadante para uma nova placa de 96 poços e a absorbância de cada poço foi lida no comprimento de onda de 570 nm em leitor de placas (680XR - Bio Rad). O experimento foi realizado com duas réplicas biológicas.

3.3.14 – Teste de sensibilidade

3.3.14.1 – Teste de sensibilidade por difusão em agar

Em uma placa de petri de 90 x 15 mm, foi adicionado 10 ml de meio de cultura MM sólido. Após a solidificação, 2×10^7 conídios das linhagens CEA17 Δ akuB^{ku80}, Δ masA_3 e Δ masA_9 foram inoculados sobre o meio de cultura solidificado, pelo método *pour plate* em 10 ml meio de cultura (MM) semi-sólido (água 1% (p/v)). No centro da placa, fez-se um corte em circunferência de 10 mm de diâmetro, onde foi aplicado 150 µL/mL de peróxido de

hidrogênio (10 e 15%) a fim de se difundir pelo meio de cultura. As placas de petri foram incubadas por 24 horas a 37°C (Valiante *et al.*, 2008). Após o crescimento, foi medido o diâmetro do halo de inibição causado pelo peróxido de hidrogênio. O experimento foi realizado com três réplicas biológica.

3.3.14.2 – Teste de sensibilidade em ágar utilizando a técnica *drop out*

O teste de susceptibilidade a diferentes drogas foi realizado pela incorporação das drogas em meio de cultura mínimo (MM) contendo 2% de ágar. Conídios das linhagens CEA17 Δ *akuB*^{ku80}, Δ *masA_3* e Δ *masA_9* de *A. fumigatus* foram inoculados por *drop out*. 5 μ L de cinco diluições seriadas 1:10 partindo de 1×10^8 foram inoculados na superfície do meio de cultura. Esta técnica tem por objetivo observar o grau de formação de colônia entre linhagens parentais e mutantes na placa controle e placas que contém droga (Ram e Klis, 2006). A determinação da melhor concentração para cada droga ou substância testada foi determinada pela observação da alteração no grau de formação de colônia entre a linhagem parental e as mutantes. As concentrações determinadas para cada droga foram Anidulafungina 10 μ g/mL, Caspofungina 15 μ g/mL, Congo Red 75 μ g/mL, Calcoflúor White 75 μ g/mL, Miriocina 25 μ g/mL, Voriconazol 350 ng/mL, Anfotericina B 500 ng/mL, Cerulenina 2,5 μ g/mL, Fitoesfingosina 100 μ g/mL, Terbinafina 250 ng/mL, Farnesol 2 mM, Menadiona 10 μ M e 5 – Flucitosina 500 ng/mL. As placas inoculadas foram incubadas a 37°C por 48 horas. O experimento foi realizado com três réplicas biológicas.

3.3.14.3 – Análise do crescimento frente a variações de pH e temperatura

A avaliação do crescimento em meio de cultura sólido com diferentes pHs e temperaturas foi realizado pela medida do diâmetro da colônia. Para isso, 10 μ L de uma

suspensão 10^7 conídios/mL das linhagens CEA17 Δ akuB^{ku80} e Δ masA_3 foram pipetados no centro de uma placa de petri de 90 x 15 mm contendo 20 mL de meio de cultura MM nos pHs 5,5, 6,5, 7,5 e 8,5 e incubadas a 28, 37 e 45°C. O diâmetro de cada colônia foi medido a cada 24 horas até 96 horas de desenvolvimento. O experimento foi realizado em duplicata com duas réplicas biológicas.

3.3.15 – Western blotting

3.3.15.1 – Extração de proteínas de meio de cultura líquido

A proteína foi extraída do meio de cultura de acordo com Barros *et al.* (2010) com adaptações. O meio de cultura líquido contendo as proteínas extracelulares foi filtrado em filtro 0,45 μ M – Millipore® e em seguida, para a precipitação de proteínas extracelulares, foi adicionado 3X o volume de acetona (JT Baker®) previamente refrigerada a -20 °C. Após, a acetona com o meio de cultura foi centrifugada a 20.000 g a 4°C durante 60 minutos (Eppendorf®). As proteínas extracelulares sedimentadas foram ressuspensas em 10 μ L de tampão de amostra de proteína adicionado de β – mercaptoetanol para o fracionamento em SDS-PAGE.

3.3.15.2 – Extração de proteínas totais de micélio.

A proteína foi extraída do micélio de acordo com Barros *et al.* (2010) com adaptações. Para a extração de proteína total de micélio, as amostras liofilizadas foram trituradas em cadinho e pistilo estéril com nitrogênio líquido e 500 μ L de tampão lise 1X e inibidor de protease completo Mini (Roche Applied Science®). Os extratos foram centrifugados em 20.000 g a 4°C durante 60 minutos. O sobrenadante foi coletado e a concentração de proteína foi determinada usando o método de Bradford.

3.3.15.3 – Quantificação de proteínas pelo Método de Bradford

A concentração de proteínas totais extraídas de micélio foi determinada pelo método de Bradford (1976). Foi utilizado reagente de Bradford (Bio Rad®) e preparada uma diluição 1:10 em um volume final de 200 mL de reagente. Para determinar a curva padrão, foi utilizado Soro Albumina Bovina (Sigma Aldrich®) a partir de concentrações de 1000 ng/mL, 750 ng/mL, 500 ng/mL, 250 ng/mL e 25 ng/mL. Para a leitura das absorbâncias foi preparado o branco, somente o reagente de Bradford, e as amostras de extrato bruto de proteínas totais foram diluídas para 1:100 em um volume final de 1 mL de reagente. As amostras foram pipetadas em uma cubeta de quartzo, volume de 1 mL, e quantificadas em um espectrofotômetro (Implen® - Alemanha) no comprimento de onda de 590 nm. As quantificações das proteínas foram realizadas em duplicatas e calculado a concentração de proteínas em mg/mL.

3.3.15.4 – Metodologia de *Western Blotting*

A metodologia *western blotting* foi utilizada para a detecção da proteína GFP fusionada com MasA, linhagem *masA::GFP*, em micélio (intracelular) de *A. fumigatus* e em meio de cultura (extracelular) com o anticorpo anti-GFP (Sigma Aldrich). Para isso, 2×10^7 conídios das linhagens de *A. fumigatus* com a referida construção foram inoculados em 10 mL de meio de cultivo MM líquido e incubado com agitação constante de 180 rpm (Shaker Ecotron – Infors HT - Switzerland) por 22 horas a 37°C para formação do micélio e em seguida 2 horas de indução com a droga Anidulafungina 1 µg/mL. O micélio foi filtrado em miracloth, congelados em nitrogênio líquido seguido de liofilização (L101 – Liotop®) por 4 horas e extração de proteínas totais. O meio de cultura foi coletado, filtrado em 0,45 µm e realizado o processo de precipitação extração de proteínas extracelulares em meio de cultura

líquido. 100 µg de proteína total de micélio e de proteínas extracelulares de cada amostra foi resolvidos em um SDS-PAGE 12% (p/v) e transferidos para uma membrana de nitro celulose (GE Healthcare) por 3 horas a 35 volts para cada membrana. Após a transferência, a membrana foi corada por 10 minutos com ponceau 0,5% (Sigma Aldrich®) e descorada com TCA 3% até a visualização das proteínas totais. A membrana foi incubada com tampão TBST 1X contendo 5% de leite desnatado por 4 horas em agitação constante. A proteína MasA::GFP foi examinada utilizando anticorpo anti-GFP (Sigma Aldrich), utilizando uma diluição 1:1000 em tampão TBST 1X contendo 5% (p/v) de leite desnatado durante 16 horas a 4°C em agitação constante. O anticorpo primário foi marcado com 1:3000 do anticorpo secundário conjugado com HRP produzido em coelho (Thermo Scientific) por 2 horas. O anticorpo monoclonal de anti-tubulina γ de cabra (Santa Cruz Biotechnology) foi utilizado como controle de carga de proteína no experimento. Foi utilizado em uma diluição de 1:2000 em TBST 1X incubadas em agitação constante durante 16 horas a 4°C. O anticorpo anti-tubulina γ foi marcado com 1:3000 do anticorpo secundário conjugado a uma molécula de peroxidase produzida em cabra (Santa Cruz Biotechnology). A detecção da quimioluminescência foi realizada usando o kit de detecção ECL Western Blot Prime (GE Healthcare) e visualizado utilizando Chemidoc (Biorad).

3.3.16 – Microscopia de fluorescência

Para a localização da proteína MasA aproximadamente 10⁶ conídios de *A. fumigatus* da linhagem *masA::GFP* foi inoculado em 10 mL de MM líquido previamente filtrado em filtro de seringa 0,45 µm – Millipore® e colocado em placas de petri (90 x 15 mm) contendo cinco lamínulas estéreis (Knittel Glaser, 22x22 mm) e incubado por 14 horas a 30°C e em seguida mais 2 hora com Anidulafungina (1 µg/ml). Após este período, as lamínulas foram montadas em lâminas com 40 µL de glicerol 70% em PBS 1X. A visualização foi realizada no

Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal – LMMC da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, FAPESP 2004/08868-0, utilizando o equipamento Leica TSC SP5 usando objetiva de imersão em água (63x) com laser a 458 a 8% (ex 470 nm e em 550 nm). O software de análise utilizado foi Leica Application Suite – Advanced Fluorescence Lite 2.3.0 (LAS – AF Lite).

3.3.17 – PCR quantitativo

3.3.17.1 – Extração de RNA total

De acordo com von Zeska Kress *et al.*, 2012, para a extração de RNA total, 2×10^7 conídios da linhagem CEA17(pyrG+) $\DeltaakuB^{ku80}$ *A. fumigatus* foram inoculados em 10 mL de meio mínimo líquido (MM) por 16 horas a 37°C em agitação constante de 180 rpm (Shaker Ecotron – Infors HT - Switzerland) e induzido com drogas por mais 1 hora, totalizando 17 horas de desenvolvimento. As drogas e as concentrações utilizadas para a realização deste experimento foram baseadas nas concentrações encontradas no teste de susceptibilidade a drogas (descrito no item 3.3.14.2). As drogas e as respectivas concentrações utilizadas foram: Anidulafungina (1 µg/mL), Caspofungina (16 µg/mL), Congo Red (150 µg/mL), Calcoflúor White (75 µg/mL), Cerulenina (10 µg/mL), Lovastatina (1 µg/mL), Fitoesfingosina (50 µg/mL), Miriocina (30 µg/mL), Farnesol (2 mM), Anfotericina B (1 µg/mL), Voriconazol (500 ng/mL), Menadiona (10 µM) e 5 – Flucitosina (300 µg/mL). Após a indução, o micélio foi filtrado a vácuo e imediatamente após, congelado em nitrogênio líquido e liofilizado (L101 – Liotop®) por 8 horas. O RNA foi extraído utilizando-se o kit RNeasy Plant Mini (QIAGEN®) seguindo as instruções do fabricante. Brevemente, o micélio liofilizado foi pesado e a massa entre 15 a 45 mg foi utilizada para a extração de cada amostra. O micélio foi rompido com auxílio de cadinho, pistilo e N-líquido. Ao material rompido foi adicionado 450 µL de tampão RTL/β-Mercaptoetanol. As amostras foram filtradas em coluna QIAshredder e o

efluente transferido para novo tubo de microcentrífuga 1,5 mL e misturado a 0,5 volumes de etanol (JT Baker) 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. Após, a coluna foi lavada com tampão RW1 e RPE. O RNA total foi eluído em 50 µl de água RNase free. O RNA foi quantificado em 260 nm e foi verificado a sua integridade por gel de eletroforese desnaturante.

3.3.17.2 – Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA, 1 µg do RNA total extraído de cada amostra foi tratado com a enzima RQ1 RNase Free DNase (PROMEGA) por 60 minutos a 37°C seguido da inativação da DNase a 65°C por 10 minutos. 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 *gpdA* (*gpdAAfu_Fn* e *gpdAAfu_Rn*) para a verificação da ausência de contaminação com DNA após o tratamento com a DNase. As amostras com detecção de sinal negativo na qPCR foram utilizadas para a síntese de cDNA. Os 9 µl restantes da reação com a DNase foram incubados com 1 µl de 100 µM de oligo dTV por 5 minutos a 70°C. Após resfriamento a 4°C, o volume de 10 µl de reação do kit Improm-II Reverse Transcriptase (PROMEGA) foi adicionado em cada uma das amostras tratadas com o oligo dTV. Esta reação foi incubada a 25°C por 5 minutos, em seguida 42°C por 60 minutos e 70°C por 15 minutos. O volume final de 20 µl de cada reação foi elevado para 40 µl com água Nuclease-free (PROMEGA).

3.3.17.3 – PCR quantitativo

As reações de PCR quantitativo (qPCR) foram realizadas utilizando a tecnologia SYBR® Green no equipamento Step One Plus – Real-Time PCR System (Applied Biosystems™, EUA) com o kit Power Up™ SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystem™ – Life Technologies®). Todas as reações foram realizadas de acordo com instruções do fabricante. A padronização da utilização dos *primers* foi feita com uma matriz de nove combinações de *primers* cujas concentrações variarão entre 100, 150 e 300 nM de cada *primer*, forward e reverse. A menor concentração de *primers* capaz de amplificar o DNA em uma reação de qPCR foi escolhida. A elaboração da curva de eficiência foi realizada com seis diluições seriais de 1:5, partindo de 300 ng de DNA genômico de *A. fumigatus*. Com os valores de Cq (*quantification cycle*) obtidos na qPCR para cada diluição, foi traçado uma reta obtendo-se a curva e eficiência do *primer* o qual os valores de R² mais próximo possível de 1 (100%) foram considerados ideais. A detecção de amplificação na qPCR utilizando-se o reagente Go Taq qPCR Master Mix (Promega) e suas condições de termociclagem que compreenderam uma etapa inicial a 50°C por 2', seguido de 10' a 95°C e 40 ciclos de 15'' a 95°C e 1' a 60°C. Os *primers* usados no trabalho (Tabela 9) foram desenhados através do software Primer Express 1.5 (Applied Biosystems™, EUA). Foram utilizados *primers* construídos especificamente para o gene de interesse. Os resultados foram expressos pelo cálculo da quantidade relativa da expressão do gene pelo método Cq, método que se baseia na derivação da fórmula $2^{-\Delta\Delta Cq}$. Como controle normalizador *housekeeping*, foi utilizado o gene *gpdA* que codifica o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*primers* gpdAAfu_Fn e gpdAAfu_Rn). Os experimentos foram realizados em duplicata e três réplicas biológicas.

Tabela 08: Primers utilizados para análise de expressão do gene *masA*

Nome do gene/região	Primer
gpdAAfu_Fn	AACATCATTCCCAGCTCGAC
gpdAAfu_Rn	ACGTTGGAGGGTAGGAACACG
MasAAfu_Fn	AAAAGGACACGGCAATCATC
MasAAfu_Rn	TTAATGACTGTGGCCGCATA

3.3.18 – Ensaio de virulência

3.3.18.1 – Modelo animal alternativo *Galleria mellonella*

Para caracterizar o perfil de virulência da linhagem deletada $\Delta masA$ frente à linhagem selvagem CEA17 *pyrG*+ $\Delta akuB^{ku80}$, adotou-se o protocolo segundo Renwick (2006) onde foram utilizadas larvas da espécie *Galleria mellonella*. As larvas foram mantidas a 28°C no escuro, em recipiente de vidro (30 cm altura – 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). Após o completo desenvolvimento, as larvas foram privadas da alimentação e separadas em grupos de 20 unidades em placa de Petri de vidro para a linhagem $\Delta masA_3$, CEA17*pyrG*+ $\Delta akuB^{ku80}$ e o controle PBS.

Os conídios das respectivas linhagens a serem analisadas foram coletados com auxílio de pipetas de Pasteur e água autoclavada em 48 horas de cultivo de cultura em meio YAG. As células foram filtradas com auxílio de miracloth estéril. Os conídios foram contados e sua concentração ajustada para 1×10^8 por mL em tubos de 2 mL. O material foi centrifugado por 2 min a 18000 g. Após foi adicionado 2 mL de meio de cultura YG aditivado com 5% de soro bovino fetal (SBF). O material foi transferido para Erlenmeyers de 15 mL e levado para iniciar a germinação em agitador orbital por 4 horas a 37°C. Após a germinação, 1 mL do meio de cultura com as células foi transferido para tubo de 1,5 mL e centrifugado por 2 min a

18000 g. O meio de cultura sobrenadante foi descartado e 500 µL de PBS estéril foi adicionado.

Para a infecção artificial em larvas de *G. mellonella* foi utilizado microseringa de Hamilton de 10 µL (modelo 7000.5KH). Para cada larva inoculou-se no centro da ventosa da última pró-pata direita 5 µL de uma suspensão de conídios 1×10^6 co/mL. O mesmo foi feito para o controle com apenas PBS. Entre as infecções, uma rigorosa bateria de lavagem na microseringa de Hamilton foi realizada 3 vezes com hipoclorito de sódio, etanol 70% (ETOH 70%) e água autoclavada. Após a infecção as larvas foram incubadas a 37°C privada de ração e sem iluminação direta. Durante todo o período experimental e a cada 12 horas as larvas foram retiradas da pré-pupa a fim de retardar sua metamorfose. Os dados foram anotados diariamente e o experimento foi realizado com três réplicas biológicas.

3.3.18.2 – Aspergilose pulmonar em modelo murino imunossuprimido

Camundongos fêmea (linhagem BALB/c, 20–22 g) foram alojados em gaiolas individuais ventiladas contendo no máximo cinco camundongos. Os camundongos foram imunossuprimidos de acordo com o que já foi descrito (Mota Junior *et al.*, 2008).

Conídios da linhagem selvagem CEA17 $\DeltaakuB^{ku80}pyrG+$ e mutada $\Delta masA$ foram coletados com tampão salina fosfato (PBS) a partir de um cultivo de dois dias em meio de cultura YG sólido a 37°C. Após a coleta, os conídios foram filtrados em Miracloth (Calbiochem) estéril. As suspensões de conídios foram centrifugadas por 5 minutos a 3000 g, lavadas três vezes com PBS estéril e a concentração de conídios avaliada utilizando um hemocitômetro. Os conídios foram ressuspensos a $2,5 \times 10^6$ conídios/ml. A validação da contagem dos conídios utilizados na infecção dos camundongos foi feita pela diluição serial de uma alíquota do inóculo seguida de plaqueamento em meio de cultura YG sólido e incubação a 37°C até o aparecimento de colônias. Os camundongos foram anestesiados pela

inalação de isoflurano (Baxter®) (Spikes *et al.*, 2008) e infectados pela inalação intranasal de $2 - 5 \times 10^4$ conídios em 20 μ L de tampão PBS. O controle negativo foi um grupo de 5 camundongos recebendo somente 20 μ L de salina. Os camundongos foram pesados a cada 24 horas a partir do dia da infecção e a inspeção visual feita duas vezes por dia. Animais moribundos com perda de mais de 20% do peso inicial (peso no dia da infecção) eram sacrificados e registrados como mortos na curva de sobrevivência. A diferença estatística entre as duas cepas testadas foi calculada utilizando a análise de Log Rank no software Prism 5.0 e $p < 0,05$ foi adotado como significativo. O procedimento foi aprovado pela comissão de ética no uso animal (CEUA) na Universidade de São Paulo-Campus de Ribeirão Preto, protocolo nº 10.1.821.53.7 na reunião de 01/12/2010.

3.3.19 - 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

“Se queremos progredir, não devemos repetir a história, mas fazer uma história nova.”

Mahatma Gandhi

4 – Resultados

4.1 – Análise *in silico* da proteína MasA de *Aspergillus fumigatus*

O gene *masA* de *A. fumigatus* foi identificado em experimento de hibridização *microarray* como super expresso na linhagem selvagem e calcineurina deletada de *A. fumigatus* tratada com anidulafungina (Figura 2) (von Zeska Kress *et al.*, dados não publicados). Este gene apresenta 1151 pares de base (pb), cDNA com 939 pb e sequência peptídica de 312 aminoácido com peso molecular estimado de 32 kDa. A partir de uma busca no banco de dados de sequências de proteínas “BLASTp search” do BLAST/NCBI utilizando a sequência da proteína MasA (AFUA_8G00610) foi observada identidade com a proteína de outros fungos filamentosos como 68% para *Aspergillus flavus* (AFLA_001750A), 65% para *A. oryzae* (BAE61157), 59% para *Fusarium oxysporum* (FOWG_16329), 68% para *Coccidioides immitis* (CIMG_04690) e 45% para *Magnaporthe grisea* (MGG_04202). Utilizando a ferramenta da web CLUSTAL OMEGA (EMBL-EBI), foi realizado o alinhamento e cladograma das sequências de aminoácidos das proteínas que apresentaram identidade de sequência (Figura 3A e 3B). Foi observado que estas proteínas apresentam o domínio DUF3129 (*Domain with Unknown Function* – Figura 4A) e um peptídeo sinal no aminoácido 20 da proteína (Figuras 4B a G).

A predição do peptídeo sinal foi realizado com o software SignalP 3.0 utilizando os métodos de predição “*neural network* – NN” e “*hidden Markov models* – HMM”. Estes modelos de predição de peptídeo sinal tem a capacidade de informar, através de cálculos, a probabilidade de localizar o sítio de clivagem deste peptídeo. Além disso, o local de clivagem é atribuído por uma pontuação de probabilidade, juntamente com contagens das regiões N-região, H-região e C-região do peptídeo sinal, se o tal for identificado.

O método NN gera um gráfico que é composto dos escores *C-score*, *S-score* e *Y-score*. Adicionalmente, dois escores numéricos *S-mean* e *D-score* são descritos. O *C-score* determina o sítio de clivagem do peptídeo sinal. Este escore é reportado para cada aminoácido da sequência e o sítio de clivagem é onde este escore está significativamente aumentado. O *S-score* prediz o peptídeo sinal pela indicação de um escore para cada aminoácido da sequência. Alto escore indica que o aminoácido correspondente faz parte do peptídeo sinal e baixo escore indica que é parte da proteína madura. O *Y-score* é a derivativa do *C-score* combinado com o *S-score* o qual resulta em uma melhor predição do sítio de clivagem. O escore *S-mean* é calculado a partir do tamanho predito do peptídeo sinal, onde é observada a média do *S-score*, variando desde o aminoácido N-terminal até o aminoácido com máximo escore *Y-score*. Este escore é utilizado como critério para discriminar proteínas secretadas das não secretadas. O *D-score* é a simples média dos escores *S-mean* e *Y-score*. Este escore também é utilizado como critério para discriminar proteínas secretadas das não secretadas, mas com o desempenho discriminatória superior em comparação com o *D-score* (Emanuelsson *et al.*, 2007).

As proteínas MasA de *A. fumigatus* e MAS1 de *M. grisea* foram analisadas quanto aos 70 aminoácidos da região N-terminal de cada proteína. Como resultado, foi observado pelo método NN que no aminoácido 20 da sequência peptídica de cada proteína os escores *C-score* e *Y-max* estão com valores máximos. Os escores *S-mean* e *D-score* apresentaram o peptídeo sinal entre os aminoácidos 1 a 19 (Figura 4B, 4C, 4D e 4E). O *D-score* foi de 0,685 para MasA (*A. fumigatus*) e 0,702 para MAS1 (*M. grisea*) o qual prediz que ambas as proteínas possivelmente participam de via secretora de proteínas (Tabela 09).

No método HMM a probabilidade das proteínas MasA em *A. fumigatus* e MAS1 em *M. grisea* apresentar uma sequência de peptídeo sinal foi de 0,995 e 0,992, respectivamente. O sítio de clivagem foi identificado na posição 19 e 20 aminoácidos de MasA e MAS1 com os valores respectivos de 0,795 e 0,784 (Figura 4B, 4C, 4D e 4E).

Pelo software SignalP foi identificado o peptídeo sinal nas proteínas MasA e MAS1, ambas com as mesmas características quanto à posição do sítio de clivagem e possível endereçamento proteico e participação de via clássica secretória proteica (Tabela 09).

Tabela 09: Predição *in silico* de peptídeo sinal (SignalP3.0)

	MasA - <i>A. fumigatus</i>		MAS1 - <i>M. grisea</i>	
	Posição do aa	Valor	Posição do aa	Valor
C-score	20	0,543	20	0,778
Y-score	20	0,593	20	0,682
S-mean	1-19	0,778	1-19	0,722
D-score	1-19	0,685	1-19	0,702

aa, aminoácido.

Para confirmar a predição do peptídeo sinal pelo software SignalP, foi utilizado o software PHOBIUS - <http://phobius.sbc.su.se/> (Käll *et al.*, 2007) que utiliza o HMM como mecanismo de validação do peptídeo sinal semelhante ao software SignalP. Além da identificação de peptídeo sinal, o software PHOBIUS prediz cada região da sequência proteica desde as regiões do peptídeo sinal e se a proteína madura atua no interior ou no exterior do citoplasma. Diferente do SignalP, o PHOBIUS não informa valores numéricos de cada região identificada da sequência proteica a ser analisada, mas identifica e informa a região do peptídeo sinal e os seus respectivos resíduos de aminoácidos correspondente a cada região identificada.

Como resultado, o software PHOBIUS identificou em MasA de *A. fumigatus* a presença de um peptídeo sinal de 20 aminoácidos, onde as regiões N-terminal é do aminoácido 1 a 5, a região hidrofóbica é do aminoácido 6 a 14, a região carboxi-terminal é do aminoácido 15 a 19 e a proteína madura é do aminoácido 20 a 312 classificando como uma possível proteína ligada à membrana plasmática, previsto para atuar na região extracelular (Figura 4F, 5A e 5B). A sequência MAS1 de *M. grisea* foi submetida à mesma análise e foi

identificada a presença de um peptídeo sinal de 19 aminoácidos, onde as regiões N-terminal é do aminoácido 1 a 3, a região hidrofóbica é do aminoácido 4 a 14, a região carboxi-terminal é do aminoácido 15 a 19 e a proteína madura é do aminoácido 20 a 290 classificando como uma possível proteína ligada à membrana plasmática, previsto para atuar na região extracelular (Figura 4G, 5A e 5B).

Pelo software PHOBIUS as proteínas MasA de *A. fumigatus* e MAS1 de *M. grisea* em suas sequencias apresentam o peptídeo sinal, mas estruturalmente diferem na região N – terminal e região hidrofóbica quanto ao número de aminoácidos correspondente.

Figura 2: Clusterização hierárquica dos genes altamente expressos em ensaio de *Microarray* de *A. fumigatus* tratado com anidulafungina (Kress *et al.*, dados não publicados): A barra de cores mostra a razão de Log_2 (Cy5/Cy3) para cada amostra, tendo o Cy3 como valor referência. *chsE*, subunidade do complexo quitina sintase; *agsA*, *agsC*, *fksA*, subunidades do complexo β -1,3-glucano sintase; *mpkA*, mitogen-activated protein kinase A; *masA*, *magnaporthe appressorium suppressed 1*; hp, proteína hipotética.

A.

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```

MGR      mkytsailisaf-aatnvfahgvvtevggangvltplgltaidgtprdcnpngcgseadta
FOX      --mltalflsalacshlaqahgtitrvigangvumpgltildgtprsstsaasgaqvdt
CIM      mkfnsnivalsalvagsqvaahgtitlikgangvumpgltvvdgtprgcasaacgaqkda
AFU      MLIKDILTVTAL-LASQVSAHGLVTRIKGANGVDMPLTIIDGVPRDCPSAACGGQKDTA
AFL      mlfikaiaaltgl-avsqvsahglitrkvghngidmpgltiqdgiprdcpsgacgaqkda
AOR      mlfikaiaaltgl-avsqvsahglitrkvghngidmpgltiqdgiprdcpsgacgaqkda
          :  ::::      .  *** : * : * ** : :****  ** ** . . . . : : **

MGR      iirdrelgtsrasalgrtqgggvpdaakmielfmdgasvnksdvvaarerh-----
FOX      virdpelgtskasalgrt-skgpvdgsrvikafmqgvkgrslad-----
CIM      iirpagemgr-asalgrt-sygavdprnmnafmgsnskrha-----
AFU      IIRDQEMGGIKASPLGRITMGAGPVYAATVINKFMGAATEKRGRASPSEERRMLPSHCSIN
AFL      iirdaefgsvkasplgrtlgagpvnpaivinnfmgagthkrsrvpashrr-----
AOR      iirdaefgsvkasplgrtlgagpvnpaivinnfmgagthkrsrvpashrr-----
          : ** : * : * ** * : * : * : : : : : : : : : : : : : : :

MGR      -----aanlarratlprag
FOX      -tilgggeeatreavsvftnagavvngvqdgiespvgglalgaehgvngllddffqta
CIM      -reflnarqllneaasaitgpagavlngiqdlvqatplgpivdniqnvgnalggavpgma
AFU      WANMFSGRQLINDAASVITNAGGTILNG-----AQSAVDDALSIVPGLK
AFL      -----rqlindaagvitnaggailngvqdladmtpvggvikgvqstiddamailpgte
AOR      -----vqstiddamailpgte

MGR      ggtstpkgteetgvkaatgiaatkglpttnddgtinivfhqvnqdgagpltadidstsgg
FOX      kgvpsprgyiedgvqnytgvgakiglpptasdgltkliyhqvnqdgagpllvddvftsgg
CIM      sgsvtprgtmetgvqhqhsgmqsgglptvssdgmimiyhqvndqdgagplvaeidpssgg
AFU      SGAMTPQGTKEGIQLYSGKGSRTGLPTASPDGVVTVIYHQVNQDGAGPLTADIDPSSGG
AFL      sgavtgkvgkengmqlyagkganiglpaspdgvvmtiyhqvndqdgagplsaeidpssgg
AOR      sgavtgkvgkengmqlyagkganiglpaspdgvvmtiyhqvndqdgagplsaeidpssgg
          * : : * * * : : * . ****. ** : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

MGR      qdvsafqkakittnvpplgiaglsaaqtmfvpavqmpagatcsgsvggannvciaarl
FOX      tdpkafksaevvqniig--vlgfstvsstdfpvivkvptgkacsgkvagvsgvciaarvrn
CIM      qdpsafqkakvvenvpg--vagfstssnsdfeikvkmpgmckagtigsaknvciaarvrn
AFU      TNAKAFVSAKVIQNIIPG--VAGFSTSTMDYEVKVQVPNGMKCTGTVGAAKNVCILRVRN
AFL      tdpkafksarvinqnig--vagfstssamdyavkvqvpqgmktgtvgaaknvciaarvrn
AOR      tdpkafksarvinqnig--vagfstssamdyavkvqvpqgmktgtvgaaknvciaarvrn
          : . ** . : : * : * : * : : . * : : * : : * * * : : : : : : : : : :

MGR      aavtgpfggsvaftqspaarkraiey-nlakrrfarslatdeedde
FOX      satagpfggaaafthnpeaakgkksakfrhrri-----
CIM      taigpfggaaafthnpeaakgkksakfrhrri-----
AFU      TAISGPFGGSAAFTHNPEAAGKGGKSAKFRHRRI-----
AFL      naigpfggsgaftq-----
AOR      naigpfggsgaftq-----
          * : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

```

B.

Figura 3: Alinhamento e cladograma das sequências proteicas de MasA de *A. fumigatus* frente aos seus ortólogos: **A.** Mas1 de *M. grisea* (MGR), *F. oxysporum* (FOX), *C. immitis* (CIM), *A. fumigatus* (AFU), *A. flavus* (AFL) e *A. oryzae* (AOR) pela ferramenta Clustal Omega– EMBL/EBI. Linha azul, peptídeo sinal; Quadrado vermelho, sítio de clivagem do peptídeo sinal conservado entre as proteínas (Xue *et al.*, 2002). **B.** Relação filogenética entre as proteínas. Cladograma formado a partir do algoritmo ClustalW2 Phylogeny, formato da árvore Phylip e método de clusterização *Neighbour-joining*.

Figura 4: Análise *in silico* da proteína MasA de *A. fumigatus*. **A.** Análise da sequência peptídica de MasA com a ferramenta BLASTp search-NCBI; DUF, domínio de função desconhecida. **B.** Predição *in silico* de peptídeo sinal utilizando software SignalP 3.0, método de predição “neural network – NN” de MasA (*A. fumigatus*) e **C.** MAS1 (*M. grisea*); **D.** método de predição “hidden Markov models – HMM” de MasA (*A. fumigatus*) e **E.** MAS1 (*M. grisea*); **F.** Predição *in silico* de peptídeo sinal utilizando PHOBIUS - “hidden Markov models – HMM de MasA (*A. fumigatus*) e **G.** MAS1 (*M. grisea*).

A.

B.

MasA – *A. fumigatus*

MLIKDILTVTALLASQVSAHGLVTRIKGANGVDM PGLTIIDGVPRDCPS

MAS1 – *M. grisea*

MKYTSAILISAF AATNVFAHGVVTEVQ GANGVTL PGLTAIDGTPRDCPN

Figura 5: Predição *in silico* de peptídeo sinal utilizando PHOBIUS – diferenciação de resíduos de aminoácidos: A. Representação estrutural do peptídeo sinal (adaptado de von Heijne, 1990); B. Sequencia dos resíduos de aminoácidos da região N-terminal das proteínas MasA de *A. fumigatus* e MAS1 de *M. grisea* mostrando a diferença no peptídeo sinal quanto ao número de resíduos de aminoácidos no N – região carregada positivamente (++) (azul), h – região (vermelho), C-região (verde), sítio de clivagem (azul escuro) e proteína madura (laranja).

4.2 – Deleção do gene *masA* de *A. fumigatus*

Com o intuito de entender a importância do gene *masA* para *A. fumigatus*, este foi deletado do genoma da linhagem selvagem CEA17 $\DeltaakuB^{ku80}$ *pyrG*⁻ por intermédio de transformação gênica do cassete de deleção *masA*5'UTR::*pyrG*::*masA*3'UTR (Figura 6A). A comprovação da deleção do gene *masA* foi realizada por intermédio das técnicas *Southern Blot*, PCR e qPCR. No *Southern Blot*, o DNA genômico das linhagens transformantes ($\Delta masA_1$ a 9) e da linhagem selvagem foi digerido com a endonuclease de restrição *EcoRI*. Utilizando como sonda a região *masA*3'UTR foi observado que para a linhagem selvagem há uma banda de aproximadamente 10 Kb e para as linhagens transformantes há uma banda de aproximadamente 5 kb (Figura 6B).

Na PCR foi observada à amplificação de um fragmento de 1,1 kb para a linhagem selvagem e a ausência de amplificação para as linhagens transformantes, quando utilizado os *primers* que amplificam o gene *masA* (MASAAFU_start e MASAAFU_stop – Tabela 06). Ao utilizar *primers* com homologia para a região que antecede ao cassete de deleção (MASAAFU_5) e o *primer* que apresenta homologia pelo gene *pyrG* no sentido reverso (*pyrG_rev*), bem como o *primer* que apresenta homologia pelo gene *pyrG* no sentido *forward* (*pyrG_Fw*) com o *primer* que advém o cassete de deleção (MASAAFU_6), houve a ausência de amplificação para a linhagem selvagem e à amplificação de um fragmento de aproximadamente 4 kb para as linhagens transformantes *masA* deletada (Figura 6C).

A qPCR foi realizada com a tecnologia SYBR®Green utilizando os *primers* para região não intrônica do gene *masA* de *A. fumigatus* além do gene normalizador (*housekeeping*) *gpdA* (Tabela 09). Na análise de expressão comparativa com a expressão do gene *masA* da linhagem selvagem CEA17 $\DeltaakuB^{ku80} pyrG+$, foi observado que as linhagens transformantes $\Delta masA_3$ e $\Delta masA_9$ não apresentaram a expressão do gene *masA* (Figura 6D).

Figura 6: Confirmação da deleção de *masA* em *A. fumigatus*: **A.** Representação gráfica do cassete de deleção do gene *masA* e integração homóloga no locus do gene; **B.** *Southern Blot* das linhagens candidatas *masA* deletado; **C.** PCR das linhagens candidatas *masA* deletado amplificação de 5'UTR::pyrG; **D.** Expressão relativa de *masA* das linhagens *masA* deletado (*ΔmasA*_1 a _9) em relação a linhagem selvagem (wt).

4.3 – Obtenção de uma linhagem $\Delta masA$ *pyrG*⁻

Com o objetivo de obter uma linhagem $\Delta masA::pyrG$ ⁻, as linhagens $\Delta masA_3$ e $\Delta masA_9$ foram incubadas com ácido 5-fluoroorótico (5-FOA) para a expulsão do gene *pyrG*, o qual é promovido pelo perfil de defesa da célula fúngica frente ao metabólito tóxico produzido pela presença do 5-FOA. Como resultado foi observado que para a linhagem $\Delta masA_3$ apareceram dois setores distintos e a linhagem $\Delta masA_9$ apresentou um único setor. Os conídios oriundos dos setores foram inoculados ordenadamente em meio de cultura YAG e YAG+UU. Aqueles que apresentaram ausência de crescimento na ausência de UU (YAG) e crescimento em YAG+UU foram purificados por várias passagens em meio de cultura YAG+UU. Como resultados foram obtidos 2 e 0 candidatos *pyrG*⁻ para $\Delta masA_3$ e $\Delta masA_9$, respectivamente. Estas linhagens foram utilizadas para a complementação com o cassete de construção *masA5'UTRmasAORF::GFP::pyrG:masA3'UTR*.

4.4 – Construção do cassete para obter linhagem *MasA::GFP* em *A. fumigatus*

A fusão do cassete *masA5'UTRmasAORF::GFP::pyrG::masA3'UTR* foi realizado utilizando o biosserviço de *S. cerevisiae*. Para checar se a fusão ocorreu corretamente, após a extração de DNA genômico da levedura, os 7 transformantes do cassete *masA5'UTRmasAORF::GFP::pyrG::masA3'UTR* foram submetidos a estratégias de PCR utilizando *primers* *masA5'RS_F* e *masA3'RS_R* o qual gerou um *amplicon* no tamanho aproximado de 6807 kb (Figuras 7A e 7B).

Os cassete para a construção da linhagem *masA::GFP* foi integrado ao genoma das linhagens de *A. fumigatus* CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$ *pyrG*⁻ e $\Delta masA_3$ *pyrG*⁻, respectivamente. Foram obtidos 4 transformantes candidatos a *masA::GFP* utilizando a linhagem CEA17 $\Delta akuB^{ku80}$ *pyrG*⁻ e 8 transformantes utilizando a linhagem $\Delta masA_3$ *pyrG*⁻ (Figuras 8 A e B).

A recombinação homóloga dos cassetes no *locus* do gene em *A. fumigatus* foi confirmada a partir de PCR utilizando os *primers* MASAAFU_1 e MASAAFU_6 (Tabela 06). Com estes *primers* foi obtido um *amplicon* no tamanho aproximado de 8 kb para ambos os cassetes, assim confirmando a integração homóloga e a inserção do cassette no genoma do *A. fumigatus* (Figura 8B).

Figura 7: Construção do cassete *masA5'UTRmasAORF::GFP::pyrG::masA3'UTR* por recombinação *in vivo* em *S. cerevisiae*: A. Representação gráfica do cassete de construção *masA5'UTRmasAORF::GFP::pyrG::masA3'UTR*; **B.** Verificação em linhagens transformantes de *S. cerevisiae* da fusão dos fragmentos para a construção do cassete *masA5'UTRmasAORF::GFP::pyrG::masA3'UTR*.

Figura 8: Verificação de integração de cassetes *masA* e *masA3'UTR::GFP::pyrG::masA3'UTR* no genoma de *A. fumigatus*: **A.** Verificação por PCR da integração do cassette *masA5'UTR::masAORF::GFP::pyrG::masA3'UTR* na região do gene *masA* das linhagens CEA17 $\DeltaakuB^{ku80}$ *pyrG*- (primers *masA5'RS_F* e *PYRG_rev* amplifica 4,8 Kb – figura 7A) e **B.** $\Delta masA-3$ *pyrG*- (primers *MASAAFU_1* e *MASAAFU_6* amplifica 7,8 Kb - figura 7A). M, 1 Kb DNA ladder; Kb, kilobase. *, utilizado para metodologia *western blot* com anticorpo anti-GFP; **, utilizado para microscopia confocal, ensaio de virulência em *G. mellonella* e biofilme.

4.5 – Caracterização fenotípica das linhagens *masA* deletado e *masA* complementado

Os ensaios de caracterização fenotípica das linhagens mutantes foram realizados com as linhagens transformantes $\Delta masA_3$, $\Delta masA_9$ e $\Delta masA_3 masA::GFP::pyrG$ (linhagem *masA* complementada).

4.5.1 – Características macromorfológicas

As colônias gigantes das linhagens $\Delta masA_3$ e $\Delta masA_9$ apresentaram aspecto veludoso, cor verde, superfície lisa e borda regular semelhante a linhagem selvagem CEA17 $\DeltaakuB^{ku80}pyrG+$ (Figura 9B). O diâmetro médio de ambas as linhagens foi de aproximadamente 4 cm após 48 horas de incubação a 37°C (Figura 9A). As linhagens CEA17 $\DeltaakuB^{ku80}pyrG+$, $\Delta masA_3$ e $\Delta masA_9$ não apresentam diferenças estatísticas significativas, $p>0,05$.

Figura 9: Caracterização macromorfológica das linhagens mutantes deletadas *masA* frente a linhagem selvagem CEA17 $\DeltaakuB^{ku80}pyrG+$: **A.** Colônia gigante das linhagens – I: CEA17 $\DeltaakuB^{ku80}pyrG+$, II: $\Delta masA_3$ e III: $\Delta masA_9$; **B.** Diâmetro das colônias gigantes das linhagens CEA17 $\DeltaakuB^{ku80}pyrG+$, $\Delta masA_3$ e $\Delta masA_9$. Não apresenta diferença significativa quanto ao diâmetro das colônias ($p>0,05$).

4.5.2 – Característica Micromorfológica do conidióforo

As linhagens $\Delta masA_3$ e $\Delta masA_9$ não apresentaram alterações morfológicas nos conidióforos em relação a linhagem selvagem CEA17 $\Delta akuB^{ku80} pyrG^+$, tendo em vista que a formação de hifa, célula pé, haste, vesícula, células conidiogênicas (fiálide) e cadeia de conídios típicos de *A. fumigatus* (Figura 10).

Figura 10: Estrutura de reprodução assexual (conidióforos) de *A. fumigatus*: Microcultivo de CEA17 $\Delta akuB^{ku80} pyrG^+$, $\Delta masA_3$ e $\Delta masA_9$ incubados por 24 horas e 48 horas. Microscopia de campo claro em microscópio em aumento de 1000x. wt, linhagem selvagem CEA17 $\Delta akuB^{ku80} pyrG^+$; Barra de escalas, 10 μm .

4.5.3 – Determinação do diâmetro dos conídios

O diâmetro dos conídios da linhagem selvagem CEA17 $\DeltaakuB^{ku80}pyrG+$, as mutantes $\Delta masA_3$ e $\Delta masA_9$ foram mensurados. A linhagem selvagem possui o diâmetro médio de $1,45 \pm 0,19$ e as linhagens $\Delta masA_3$ e $\Delta masA_9$ possuem os diâmetros médios de $1,29 \pm 0,19$ e $1,38 \pm 0,12$ μm , respectivamente (Figura 11). Quanto a morfologia dos conídios das linhagens mutantes frente à linhagem selvagem foi observado que não existe alteração. Portanto, não existem diferenças estatísticas significantes no diâmetro entre as linhagens $\Delta masA_3$ e $\Delta masA_9$ com a linhagem selvagem ($p > 0,05$).

4.5.4 – Teste de polarização dos conídios

A taxa de polarização da linhagem selvagem CEA17 $\DeltaakuB^{ku80}pyrG+$ e deletadas $\Delta masA_3$ e $\Delta masA_9$ observada por microscopia de campo claro demonstra que o início da polarização, isto é, emissão do tubo germinativo, foi observado em 6 horas de incubação onde a linhagem selvagem e as deletadas $\Delta masA_3$ e $\Delta masA_9$ apresentaram a taxa de polarização de 14, 3 e 4%, respectivamente. Em 8 horas de incubação as mesmas linhagens apresentaram 47, 72 e 68% de polarização, respectivamente. Em 10 horas de incubação, todas as linhagens envolvidas no teste apresentaram 100% de polarização (Figura 12). A dinâmica na polarização observada na linhagem selvagem em comparação com as linhagens *masA* deletada demonstra que a ausência deste gene em *A. fumigatus* leva a uma menor taxa de polarização em 6 horas de desenvolvimento, contudo, em 8 horas de desenvolvimento, esta taxa está aproximadamente 23% maior que a taxa de polarização encontrada para a linhagem selvagem. Assim, a diferença estatística significativa entre as linhagens selvagem e *masA* deletado ($p < 0,05$) mostra que o gene *masA* é um possível responsável por desregular a polarização dos conídios de *A. fumigatus*.

Figura 11: Determinação das dimensões dos conídios das linhagens mutantes *ΔmasA_3* e *ΔmasA_9*: Análise microscópica de conídios mostra que não existem diferenças estatísticas significantes no diâmetro e formato entre as linhagens *ΔmasA_3* e *ΔmasA_9* com a linhagem selvagem ($p > 0,05$). *Δku80*, linhagem selvagem CEA17 *akuB^{ku80}pyrG+*.

Figura 12: Taxa de polarização de conídios das linhagens *ΔmasA_3* e *ΔmasA_9*: As linhagens mutantes apresentaram taxa de polarização significativa em 8 horas de desenvolvimento significativa em relação a linhagem CEA17 *ΔakuB^{ku80}pyrG+*, $*(p < 0,05)$. CEA17 *ΔakuBku80pyrG+*, linhagem selvagem e controle do experimento.

4.5.5 – Observação de agrupamento (*clumping*) dos conídios

Durante a observação microscópica dos conídios das linhagens *masA* deletado foi observado que os agrupamentos dos conídios eram diferentes nas linhagens mutantes $\Delta masA_3$ e $\Delta masA_9$ em relação à linhagem selvagem CEA17 $\Delta akuB^{ku80} pyrG+$. Em aglomerados de no mínimo 1 e no máximo 2 conídios as linhagens CEA17 $\Delta akuB^{ku80} pyrG+$, $\Delta masA_3$ e $\Delta masA_9$ apresentaram uma taxa de 42, 30 e 29%, respectivamente. Em aglomerados de no mínimo 3 e no máximo 5 conídios apresentaram uma taxa de 10, 15 e 16%, respectivamente. Em aglomerados de no mínimo 6 e no máximo 10 conídios apresentaram uma taxa de 5, 20 e 22%, respectivamente. Em aglomerados de no mínimo 11 e no máximo 20 conídios apresentaram uma taxa de 0, 28 e 27%, respectivamente (Figuras 13A e B).

Na presença de 300 μM de Farnesol, aglomerados de no mínimo 1 e no máximo 2 conídios as linhagens CEA17 $\Delta akuB^{ku80} pyrG+$, $\Delta masA_3$ e $\Delta masA_9$ apresentaram uma taxa de 72, 86 e 85%, respectivamente. Em aglomerados de no mínimo 3 e no máximo 5 conídios apresentaram uma taxa de 3, 4 e 3%, respectivamente. Em aglomerados de no mínimo 6 e no máximo 10 conídios apresentaram uma taxa de 12, 7 e 7%, respectivamente. Em aglomerados de no mínimo 11 e no máximo 20 conídios apresentaram uma taxa de 17, 3 e 3%, respectivamente (Figuras 13A e B). Houve alteração estatística significativa, $p < 0,05$. Este resultado sugere que a proteína MasA possa participar na interação de moléculas envolvidas na comunicação celular *quorum sensing*.

Figura 13: Agrupamento (clumping) de conídios de *A. fumigatus* com e sem a presença de Farnesol **A.** wt, linhagem selvagem (CEA17 $\Delta akuB^{ku80} pyrG+$); $\Delta masA_3$ e $\Delta masA_9$, linhagens *masA* deletado. Microscopia de campo claro, em aumento de 100x. Barra de escalas 10 μ m. Setas pretas, indicam agrupamentos com mais de 11 conídios. **B.** Representação gráfica dos agrupamentos de conídios. $\Delta ku80$, linhagem selvagem (CEA17 $\Delta akuB^{ku80} pyrG+$); $\Delta masA_3$ e $\Delta masA_9$, linhagens *masA* deletado. *, alteração estatística significativa ($p < 0,05$).

4.6 – Teste de sensibilidade a drogas

4.6.1 – Estresse oxidativo com peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

A avaliação da célula fúngica frente ao estresse oxidativo causado pelo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi observado para a linhagem selvagem CEA17 $\DeltaakuB^{ku80}pyrG+$ e linhagens mutantes $\Delta masA_3$ e $\Delta masA_9$. Foi observado que todas as linhagens apresentaram o diâmetro do halo de inibição de crescimento de aproximadamente 3,3 cm com 10% de peróxido de hidrogênio (Figura 14 A) e 3,9 cm com 15% de peróxido de hidrogênio (Figura 14 B). Foi observado que não existe diferença estatística significativa entre as linhagens observadas ($p>0,05$), mostrando que a ausência do gene *masA* não causa alteração na resposta ao estresse oxidativo causado por diferentes concentrações H₂O₂.

Figura 14: Análise da resposta ao estresse oxidativo causada por 10% e 15% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂): I - CEA17 $\DeltaakuB^{ku80}pyrG+$, II - $\Delta masA_3$ e III - $\Delta masA_9$ nas concentrações de **A.** 10% e **B.** 5% não apresentaram diferenças fenotípicas quanto a resposta ao estresse oxidativo. Não foi observada diferença estatística, ($p>0,05$).

4.6.2 – Drogas que afetam parede e membrana celular, lipídios, estresse oxidativo e dano ao DNA

O teste de sensibilidade para a linhagem selvagem CEA17 $\DeltaakuB^{ku80}pyrG+$ e linhagens mutantes $\Delta masA_3$ e $\Delta masA_9$ foi realizado pela técnica *drop out* com drogas descritas no item 3.2. Como resultado foi observado que entre todas as drogas testadas (Figura 15), a linhagem $\Delta masA_3$ e $\Delta masA_9$ foram resistentes ao Farnesol (2 mM) e voriconazol (350 ng/ml).

Figura 15: Teste de susceptibilidade em ágar com drogas que afetam a parede celular, membrana celular, síntese de DNA e síntese lipídica: Linhagens CEA17 $\DeltaakuB^{ku80}pyrG+$, $\Delta masA_3$ e $\Delta masA_9$ foram inoculadas na superfície do meio de cultura pela técnica *drop out* a partir de uma suspensão 1×10^8 conídios/mL seguida de 4 diluições seriadas 1:10. C-, sem indução com droga; ANI, Anidulafungina (10 $\mu\text{g/mL}$); CAS, Caspofungina (15 $\mu\text{g/mL}$); CW, Calcofluor White (75 $\mu\text{g/mL}$); CR, Congo Red (75 $\mu\text{g/mL}$); MIR, Miriociina (25 $\mu\text{g/mL}$); VOR, Voriconazol (350 ng/mL); AMB, Amfotericina B (350 ng/mL); CER, Cerulenina (2,5 $\mu\text{g/mL}$); FIT, Fitoesfingosina (100 $\mu\text{g/mL}$); FAR, Farnesol (2 mM); MEN, Menadiona (10 μM) e 5 - FC, 5 - Flucitosina (500 ng/mL).

4.7 – Tolerância a pH e temperatura

A presença da termotolerância e da habilidade de desenvolvimento em diferentes pHs são compartilhados por fungos patogênicos e, portanto, estas são características que se correlacionam com o potencial de virulência do fungo (Sales-Campos *et al.*, 2013).

O perfil de crescimento das linhagens CEA17 $\DeltaakuB^{ku80}pyrG+$ e $\Delta masA_3$ em diferentes temperaturas foi observado em relação ao diâmetro da colônia de cada linhagem. As colônias de ambas as linhagens, CEA17 $\DeltaakuB^{ku80}pyrG+$ e $\Delta masA_3$, apresentaram os diâmetros de 3,5, 8,0 e 8,0 cm em 96 horas de desenvolvimento a 28, 37 e 45°C, respectivamente (Figura 16). Assim, as linhagens CEA17 $\DeltaakuB^{ku80}pyrG+$ e $\Delta masA_3$ não apresentaram diferenças significativas do diâmetro da colônia nas temperaturas testadas, $p>0,05$.

Em relação ao perfil de crescimento das colônias das linhagens CEA17 $\DeltaakuB^{ku80}pyrG+$ e $\Delta masA_3$ em diferentes pHs, foi observado diâmetro de colônia nos pHs 5,5, 6,5, 7,5 e 8,5, nas temperaturas de 28, 37 e 45°C e a 96 horas de incubação, as linhagens analisadas apresentaram semelhança no diâmetro de colônia em cada ponto observado. No pH 8,5, temperatura de 45°C e 96 horas de incubação a linhagem $\Delta masA_3$ apresentou o diâmetro de colônia de 5,7 cm enquanto que a linhagem selvagem o diâmetro de 6,8 cm apresentando uma diferença estatística significativa, $p<0,05$ (Figura 16). Assim, a ausência do gene *masA* em altas temperaturas e pH básico altera o crescimento da colônia fúngica.

Figura 16: Tolerância a diferentes pH e temperaturas: Conídios da linhagem selvagem CEA17 $\DeltaakuB^{ku80}pyrG+$ ($\Delta ku80$ linha em azul) e *masA* deletado ($\Delta masA_3$ linha em laranja) foram incubados em diferentes pHs (5,5, 6,5, 7,5 e 8,5) e temperaturas (28, 37 e 45°C). O diâmetro da colônia foi medido a cada 24 horas até completar 96 horas de incubação. *, diferença estatística entre as linhagens a 45 °C, pH 8,5 e 96 horas de desenvolvimento ($p < 0,05$).

4.8 – Formação de biofilme com e sem a presença de Farnesol e Anidulafungina

Uma possível relação do gene *masA* com *quorum sensing* (QS) foi constatada perante a observação do padrão de agrupamento dos conídios das linhagens mutantes $\Delta masA_3$ e $\Delta masA_3 masA::GFP::pyrG$ frente à linhagem selvagem CEA17 $\Delta akuB^{ku80} pyrG+$ com e sem a indução com Farnesol.

A linhagem selvagem CEA17 $\Delta akuB^{ku80} pyrG+$ e as mutantes $\Delta masA_3$ e $\Delta masA_3 masA::GFP::pyrG$ em condições normais de desenvolvimento e sem indução com as drogas farnesol e anidulafungina, tiveram a sua formação de biofilme representadas pelas absorbâncias em 570 nm de 1,79, 2,14 e 1,72, respectivamente. Foi observada diferença estatística entre $\Delta masA_3$ e as linhagens selvagem e $\Delta masA_3$ e $\Delta masA_3 masA::GFP::pyrG$ complementada ($p < 0,05$ – figura 17).

Na presença de anidulafungina, foi observado que as linhagens CEA17 $\Delta akuB^{ku80} pyrG+$, $\Delta masA_3$ e $\Delta masA_3 masA::GFP::pyrG$, formaram o biofilme representados pelas absorbâncias em 570 nm nos valores de 2,28, 2,26 e 2,29, respectivamente. Não apresentando diferença estatística significativa ($p > 0,05$ – figura 17).

Farnesol causou a inibição na formação de biofilme para a linhagem selvagem e $\Delta masA_3 masA::GFP::pyrG$ onde foi observada as absorbâncias 0,75 e 0,98, respectivamente. Já para a linhagem deletada $\Delta masA_3$ a absorbância de 1,94, onde apresentou diferença estatística significativa ($p < 0,05$ - Figura 17).

Este resultado mostra que diferente da linhagem selvagem e complementada, a linhagem deletada $\Delta masA_3$ forma normalmente o biofilme na presença de Farnesol. Portanto o gene *masA* possivelmente participa da comunicação *quorum sensing*.

Figura 17: Formação de Biofilme na presença de Anidulafungina e de Farnesol: *, diferença estatística significativa ($p < 0,05$). wt, linhagem selvagem CEA17 Δ akuB^{ku80}pyrG⁺; C, Controle Negativo; FAR, Farnesol (300 μ M); ANI, Anidulafungina (16 ng/mL).

4.9 – Caracterização do perfil de virulência do gene *masA*

4.9.1 – Virulência em modelo alternativo *G. mellonella*

O perfil de virulência das linhagens Δ *masA_3* (*masA* deletado) e Δ *masA_3 masA::GFP::pyrG* (linhagem complementada) foi avaliado pela infecção em larvas no sexto instar de *G. mellonella*. No terceiro dia após a infecção as linhagens selvagens, *masA* deletado e complementada apresentaram 63, 86 e 100% de sobrevivência, respectivamente. No quinto dia após a infecção, a taxa de sobrevivência foi de 30, 27 e 30%, respectivamente. No oitavo dia a linhagem selvagem e *masA* deletada tiveram 10 e 13% de sobrevivência, respectivamente, enquanto que a linhagem complementada teve todos os indivíduos mortos (0% de sobrevivência). Nove dias após a infecção com os conídios da linhagem *masA* deletado, as larvas de *G. mellonella* estavam mortas (0% de sobrevivência) e 10% de

sobreviventes para a linhagem selvagem. No décimo dia todas as larvas estavam mortas (100% de morte) ($p>0,05$ – Figuras 18 B). Assim, observa-se que a linhagem *masA* deletado apresenta a virulência similar à linhagem selvagem em *G. mellonella*.

4.9.2 – Virulência da linhagem $\Delta masA_1$ em modelo murino imunossuprimido

Para os conídios da linhagem selvagem CEA17 $\Delta akuB^{ku80} pyrG^+$, os camundongos tornaram-se moribundos (20% de sobrevivência) após o quarto dia da infecção. No sexto dia, 100% dos camundongos não sobreviveram a aspergilose pulmonar. Já os conídios da linhagem $\Delta masA_1$, 70% dos camundongos estavam saudáveis no quarto dia da infecção e no sexto dia 20% haviam sobrevivido a aspergilose pulmonar. Este experimento foi acompanhado num total de 10 dias, onde se observou que neste período os camundongos controle (PBS) permaneceram saudáveis. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas ($p>0,05$ - Figura 18 A). Assim, observa-se que a linhagem *masA* deletado apresenta a virulência similar à linhagem selvagem em modelo murino imunossuprimido.

Figura 18: Caracterização do perfil de virulência do gene *masA*: A. Modelo murino imunossuprimido - PBS (tampão salina), wt (CEA17 $\Delta akuB^{ku80} pyrG^+$) e $\Delta masA_1$ ($n = 10$ por linhagem) com leitura a cada 24 horas. Uma réplica biológica. **B.** Larvas de *G. mellonella* submetidas a infecção artificial com as linhagens $\Delta masA_3::pyrG$, $\Delta masA_3 masA::GFP::pyrG$ e CEA17 $\Delta akuB^{ku80} pyrG^+$ ($n = 20$ por linhagem) com leitura a cada 24 horas. Três réplicas biológicas. Não foram observadas diferenças estatísticas ($p>0,05$). PBS, tampão

salina fosfato; wt, linhagem selvagem CEA17 $\DeltaakuB^{ku80}pyrG+$; Time (days), dias; Survival, taxa de sobrevivência.

4.10 – Avaliação de expressão do gene *masA* frente a drogas que afetam parede e membrana celular, lipídios, estresse oxidativo e dano ao DNA

Com o intuito de avaliar a expressão relativa do gene *masA* frente a diferentes danos à célula, a linhagem selvagem CEA17 $\DeltaakuB^{ku80}pyrG+$ foi submetida a diferentes drogas que atuam em diferentes alvos da célula, como a parede celular, a membrana celular, os lipídios, o DNA e outros.

Como resultado o gene *masA* apresentou a expressão gênica relativa de 180, 140, 40 e 50 vezes maior na presença de dano causado na parede celular com Anidulafungina, Caspofungina, Calcofluor White e Congo Red, respectivamente (Figura 19A). No dano a membrana celular fúngica, a expressão relativa do gene *masA* foi de 15 e 14 vezes maior com anfotericina B e voriconazole, respectivamente (Figura 19B). A alteração em lipídios foi observado com as drogas cerulenina, fitoesfingosina, miriocina e farnesol, sendo que este último também envolvido em *quorum sensing*. Foi observada, respectivamente, a expressão relativa de 45, 30, 20, 60 e 80 vezes maior (Figura 19C). No estresse oxidativo (menadiona) e dano ao DNA (5-flucitosina) o gene *masA* está 4 e 5 vezes mais expresso, respectivamente (Figura 19D e E).

Com estes resultados, podemos observar que o gene *masA* esta expresso em alto número de cópias na presença de danos nas principais biomoléculas e estruturas da célula de *A. fumigatus* apresentando diferença significativa comparando com a linhagem CEA17 $\DeltaakuB^{ku80}pyrG+$ sem a presença das drogas utilizadas para a avaliação de expressão gênica ($p < 0,05$).

Figura 19: Análise da expressão gênica relativa por qPCR do gene *masA* em linhagem selvagem de *A. fumigatus*. Os valores foram normalizados com o gene *housekeeping gpda*. A razão *masA/gpda* para o tratamento sem droga (C-) foi determinado como valor para o qual foram normalizados todos os níveis de transcrição. O micélio da linhagem selvagem CEA17 $\DeltaakuB^{ku80}pyrG+$ foi tratado por uma hora com drogas que atuam na **A. Parede celular:** (ANI, Anidulafungina (1 $\mu\text{g/mL}$); CAS, Caspofungina (16 $\mu\text{g/mL}$); CW, Calcofluor White (75 $\mu\text{g/mL}$); CR, Congo Red (150 $\mu\text{g/mL}$); **B. Membrana celular:** AMB, Amfotericina B (1 $\mu\text{g/mL}$); VOR, Voriconazol (500 ng/mL); **C. Lipídios:** CER, Cerulenina (10 $\mu\text{g/mL}$); FIT, Fitoesfingosina (50 $\mu\text{g/mL}$); MIR, Miriocina (30 $\mu\text{g/mL}$); FAR, Farnesol (2 mM); **D. Estresse oxidativo:** MEN, Menadiona (10 μM) e **E. Dano ao DNA:** 5 – FC, 5 – Flucitosina (300 $\mu\text{g/mL}$). As barras de erro se referem ao desvio padrão da duplicata de uma réplica biológica que foi representativa do resultado encontrado em três réplicas biológicas. Todos os resultados da expressão genica relativa apresentaram significância estatística ($p < 0,05$).

4.11 – Identificação da proteína MasA em micélio e meio de cultura por *western blotting*

Para confirmar a expressão da proteína MasA::GFP no meio intra e extracelular, o micélio das linhagens *MasA::GFP* 1 a 5 foram induzidos com 1 $\mu\text{g/mL}$ de Anidulafungina onde foram extraídos proteína do micélio e meio de cultura para observar as proteínas intracelulares e extracelulares, respectivamente. Como resultado do *western blotting* com o anticorpo anti-GFP, foi observado que nas proteínas totais extraídas do micélio na presença da

droga há um sinal com massa molecular de aproximadamente 50 kDa, sugestivo de MasA fusionado ao GFP (Figura 19A). Já nas amostras sem a indução, o anti-GFP apresentou um sinal de aproximadamente 23 kDa, sugestivo de GFP (Figura 20A).

Nas proteínas extraídas do meio de cultura oriundo da incubação da linhagem *MasA::GFP* 5 induzida com 1 µg/mL de Anidulafungina foi observado um sinal no peso molecular de aproximadamente 23 kDa, sugestivo de GFP (Figura 20). Já na ausência de indução com a droga, não foi detectado presença de marcação com o anticorpo anti-GFP (Figura 20B).

Este resultado sugere que quando a célula não recebe nenhum estímulo que interfere na síntese de parede celular, a localização da proteína *MasA::GFP* é intracelular. Quando ocorre alteração da estrutura da parede celular na inibição de 1,3 β – glucano causado pela presença da anidulafungina, o GFP esta presente no meio extracelular. Isso possivelmente ocorre devido à participação de MasA da via secretória. O peso molecular do sinal detectado na proteína extraída do meio de cultura com a indução de anidulafungina sugere que ocorre uma clivagem da fusão MasA::GFP.

Figura 20: Western blotting MasA::GFP com anticorpo anti-GFP: A. Proteínas extraídas do micélio linhagens MasA::GFP que foram induzidos ou não com anidulafungina foram marcadas com anti-GFP. A razão anti-GFP/anti-γ tubulina é referente ao sinal em 50 kDa; **B.** Proteínas extraídas do meio de cultura oriunda do crescimento das linhagens MasA::GFP que foram induzidos ou não com anidulafungina. C+, GFP_{PPYRG}; C-, linhagem selvagem (CEA17ΔakuB^{ku80} pyrG+); 1 a 5, MasA::GFP; 1+ a 5+, MasA::GFP tratado com anidulafungina (1 μg/mL) por duas horas; GFP, *green fluorescent protein*; SDS-PAGE CBB, sodium duodecil sulfato *polyacrylamide gel electrophoresis* *Coomassie Brilliant Blue*, kDa, kilodaltons.

4.12 – Localização da proteína MasA::por microscopia de fluorescência

A localização da proteína MasA em *A. fumigatus* foi realizada por intermédio da observação microscópica de uma linhagem Δ*masA_3 masA::GFP::pyrG*. Por microscopia de fluorescência foi observado que após 16 horas de incubação em meio MM a 30°C a fluorescência estava dispersa por todo o citoplasma (Figura 21B). Na presença de Anidulafungina, foi observado que a proteína GFP fusionada a proteína MasA apresenta um sinal alto de fluorescência na parede celular próximo a ponta da hifa e pouco nos septos (Figura 21C).

Figura 21: Microscopia confocal de uma linhagem MasA::GFP de *A. fumigatus*: **A.** Linhagem selvagem CEA17ΔakuB^{ku80} pyrG⁺, **B.** ΔmasA₃ masA::GFP sem indução de Anidulafungina, e **C.** ΔmasA₃ masA::GFP com indução de Anidulafungina (1 μg/ml). Imagens capturas no equipamento Leica TSC SP5, com objetiva de imersão em água (63x), laser a 458 a 8% (excitação 470 nm e emissão 550 nm). O software de análise utilizado foi Leica Application Suite – Advanced Fluorescence Lite 2.3.0 (LAS – AF Lite). Barra de escalas, 10 μm.

5. DISCUSSÃO

“Se você falar com um homem numa linguagem que ele compreende, isso entra na cabeça dele. Se você falar com ele em sua própria linguagem, você atinge seu coração.”

Nelson Mandela

5 – Discussão

O peptídeo sinal é uma sequência curta de aminoácidos que participa de vias de endereçamento de proteínas que podem participar da integridade da membrana plasmática, dos lisossomos e guiar as proteínas solúveis secretadas ou outras proteínas sintetizadas pelos ribossomos e aderidos à membrana do retículo endoplasmático rugoso (Nelson *et al.*, 2011 e Albert *et al.*, 2004).

O gene *masA* de *A. fumigatus* codifica uma proteína com domínio de função desconhecida e um peptídeo sinal em sua região amino-terminal, semelhante ao observado no ortólogo em *Magnaporthe grisea*, *MAS1/GAS2* (Xue *et al.*, 2002). Na análise *in silico* das proteínas MasA de *A. fumigatus* e *MAS1* de *M. grisea* foi identificado um peptídeo sinal nos primeiros 19 aminoácidos seguidos de um sítio de clivagem no vigésimo aminoácido e a predição da participação da via secretória clássica. O peptídeo sinal de MasA apresenta a N-região com 5 resíduos de aminoácidos e a N-região de *MAS1/GAS2* apresenta 3 resíduos de aminoácidos. Para a h-região, ambas as proteínas apresentam diferenças de resíduos, sendo 8 aminoácidos para a proteína MasA e 10 aminoácidos para a *MAS1/GAS2*. A região C-terminal do peptídeo sinal de ambas as proteínas apresentam o mesmo número de resíduos de aminoácidos. Sabe-se que a sua função e o endereçamento de uma proteína são definidos a partir da composição do peptídeo sinal (De Bona *et al.*, 2012; von Heijne, 2005; von Heijne e Abrahmsén, 1989 e von Heijne, 1990) e, portanto, as diferenças encontradas no número de resíduos na sequência da N-região e h-região do peptídeo sinal de MasA de *A. fumigatus* e *MAS1/GAS2* de *M. grisea* mostra que estas proteínas possivelmente não compartilham de idêntica função e endereçamento de proteína.

Com o intuito de caracterizar os efeitos que a ausência do gene *masA* causa em *A. fumigatus*, foi realizada a deleção do referido gene. A linhagem *masA* deletado se desenvolveu normalmente, caracterizando este gene como não essencial para o

desenvolvimento e a vida de *A. fumigatus*. A referida deleção foi comprovada por intermédio *southern blotting*, PCR e qPCR. Duas linhagens deletadas foram estudadas, *ΔmasA_3* e *ΔmasA_9* e os experimentos conduzidos com as duas linhagens *masA* deletado independentes apresentaram idêntica alteração, sugerindo que o referido fenótipo está diretamente associada à deleção de *masA* e não devido a uma mutação não relacionada resultante da transformação em *A. fumigatus*.

A formação dos conidióforos em *A. nidulans* e *A. fumigatus* é regulada por *stuA* e *brlA*, sendo o primeiro gene o fator de transcrição do segundo (Aguirre *et al.*, 1993; Busby *et al.*, 1996; Miller *et al.*, 1991; Sheppard *et al.*, 2005). A expressão gênica de *masA* nas linhagens deletadas para o gene *stuA* em *A. nidulans* está reprimida. Já na linhagem mutante para *brlA*, a expressão de *masA* está induzida (Twumasi-Boateng *et al.*, 2009). A ausência do *masA* não altera a formação do conidióforo nem a conidiogênese de *A. fumigatus*, indicando que apesar de sua expressão ser regulada por genes envolvidos na via conidiogênica, *masA* não influencia no correto desenvolvimento da estrutura de reprodução assexuada de *A. fumigatus*. Similar resultado foi observado para o fungo fito patogênico capaz de formar apressório *M. grisea*. *MAS1/GAS2* demonstrou ser dispensáveis para o crescimento vegetativo (micélio), reprodução assexuada e sexual do fungo (Xue *et al.*, 2002). O apressório é uma estrutura de função adesiva que auxilia o conídio do fungo fito patogênico a se fixar na superfície da planta. Em sua característica morfológica, o fungo filamentosamente patogênico oportunista *A. fumigatus* não forma o apressório. Em seu desenvolvimento, os conídios deste fungo emitem tubos germinativos. Tanto no apressório quanto na emissão do tubo germinativo pelo conídio, existe uma pressão hidrostática interna chamada pressão de Turgor. Esta é uma das principais forças motrizes da expansão localizada na ponta da hifa que faz com que tenha a forma filamentosa e também permite a invasão dos tecidos de organismos hospedeiros, infectando-os (Lew, 2011). No início do desenvolvimento de um conídio de *A. fumigatus* com ausência do gene *masA* a polarização do conídio/emissão do tubo germinativo

está prejudicado. Portanto, na ausência de *masA* a pressão de Turgor que auxilia no direcionamento da polarização da hifa inclusive nos momentos iniciais do desenvolvimento vegetativo, possivelmente não está ocorrendo de forma correta. O mesmo já foi citado anteriormente para *M. grisea*, onde a deleção do *MASI/GAS2* causa redução na capacidade de penetração do apressório e desenvolvimento da lesão indicando uma possível função como fator de virulência (Xue *et al.*, 2002).

No momento de uma infecção fúngica o hospedeiro mamífero apresenta um ambiente adverso para o fungo (*e.g.* hipóxia, privação de nutrientes, variação de pH, resposta imune, variação na temperatura), o qual necessita se adaptar para conseguir sobreviver e proliferar (Davis, 2009). Entre as características envolvidas nesta adaptação e que estão diretamente relacionadas com o potencial de virulência do microrganismo estão a termotolerância e a habilidade de adaptação a diferentes pHs (Nosanchuk e Casadevall, 2006; Davis, 2009; Sales-Campos *et al.* 2013, Gow *et al.*, 2002). A termotolerância é uma característica peculiar de *A. fumigatus* o qual o permite se desenvolver em altas temperaturas como em materiais em decomposição (Latgé *et al.*, 1999; Samson *et al.*, 1999). Assim, já é conhecido que *A. fumigatus* apresenta termotolerância nas variações de 28 a 45°C bem como tolerância a variações de pH entre 5,5 e 8,5. A ausência do gene *masA* atribuiu ao fungo similar tolerância, excetuando em altas temperaturas (45°C) e pH básico (8,5). Ainda relacionado com a virulência, a ausência do gene *MASI/GAS2*, ortólogo a *masA* de *A. fumigatus* foi relatado como causador de atenuação da virulência do fungo fito patogênico *M. grisea* (Xue *et al.*, 2002). Já em *A. fumigatus* a ausência de *masA* não alterou o perfil de virulência do fungo tanto no modelo animal alternativo *G. mellonella* quanto para o modelo murino imunossuprimido, ambos amplamente utilizados para estudo de virulência microbiana. A diferença no perfil de virulência atribuída a estes genes ortólogos possivelmente esta relacionada as diferenças no mecanismo de patogenicidade (Sexton e Howlett, 2006) que existe entre *M. grisea* e *A. fumigatus*, onde o primeiro invade o tecido da planta através da

estrutura especializada chamada apressório e o segundo invade a célula do hospedeiro mamífero por intermédio da projeção da hifa. Estas diferenças incluem os genes reguladores e sinais de transdução que são tópicos relevantes que influenciam na patogenicidade do microrganismo o qual precisam ser explorados (Hamer e Holden, 1997).

A caracterização da polarização/germinação dos conídios das linhagens selvagem e *masA* deletado foi de grande importância para a observação do padrão de aglomerados/agrupamento (*clumping*) destes conídios após algumas horas de incubação em meio de cultura líquido. Em uma densidade populacional controlada de conídios, a linhagem selvagem apresenta grupos de 2 a 10 conídios. Curiosamente, na ausência do gene *masA* existe uma grande quantidade de grupos de conídios constituídos de 11 a 20 conídios ou mais. A alteração da parede celular fúngica pode levar a uma grande exposição de proteínas de superfície celular envolvidos em aderência o qual pode levar ao aumento nos agrupamentos de conídios, como mostrado para a linhagem de *A. fumigatus* mutante para *ecm33*, importante para a correta manutenção da parede celular fúngica (Romano *et al.*, 2006). Além disso, o controle da formação de aglomerados em microrganismo foi observado na bactéria gram negativa *Yersinia pseudotuberculosis* onde a formação ou não do aglomerado bacteriano é controlado pela presença de moléculas *quorum sensing* (MQS) (Atkinson *et al.*, 1999). Em *A. fumigatus*, uma MQS muito conhecida é o farnesol que entre outras ações, afeta a sinalização que mantém a correta organização da parede celular fúngica (Dichtl *et al.*, 2010). Farnesol induz a aglomeração de conídios de *A. fumigatus* e na ausência desta droga, esta aglomeração esta reduzida. De forma inversa foi encontrado para a linhagem *masA* deletado. Onde ocorreu a formação de muitos agrupamentos de conídios e na presença de farnesol reduziu drasticamente a ocorrência destes agrupamentos. Indicando assim, a importância de *masA* na comunicação *quorum sensing* (QS) que envolve a propriedade de adesão célula a célula.

O mecanismo QS regula inúmeros comportamentos celulares, inclusive a formação de biofilme. No fungo leveduriforme *C. albicans* a formação de biofilme é inibida pela MQS

farnesol (Ramage *et al.*, 2002; Fernandes *et al.*, 2016). Além disso, o co-cultivo do organismo produtor de farnesol *C. albicans*, com o fungo filamentoso *A. nidulans* resulta em inibição de crescimento do fungo filamentoso de forma dependente de farnesol (Semighini *et al.*, 2006) sugerindo a regulação da extensão da formação do biofilme pelo mecanismo QS. Esta informação está de acordo com que foi encontrado em *A. fumigatus* onde o desenvolvimento da linhagem selvagem está inibido na presença de farnesol, bem como a formação de biofilme. Contudo, na ausência de *masA* o fungo não tem a formação de biofilme inibida. Portanto, *masA* é importante na regulação da formação do biofilme, quando na presença de farnesol.

O gene *masA* foi identificado como altamente expresso em experimento de hibridização *microarray* em linhagem selvagem de *A. fumigatus* desafiados com anidulafungina (von Zeska Kress *et al.*, dados não publicados), antifúngico que causa o desarranjo da parede celular fúngica pela inibição síntese da 1,3- β -glucano. A formação de biofilme na presença do antifúngico anidulafungina está beneficiada tanto para a linhagem selvagem quanto para *masA* deletado de *A. fumigatus*. Assim, conclui-se que na presença de anidulafungina a formação de biofilme ocorre de forma independente da expressão do gene *masA*, uma vez que tanto a alta expressão de *masA* na linhagem selvagem induzida pela anidulafungina quanto a ausência de expressão de *masA* ocasionada na linhagem deletada não influenciam na formação do biofilme.

Como mencionado anteriormente, foi demonstrado em experimento *microarray* que *masA* está altamente expresso em *A. fumigatus* na presença de anidulafungina. Em experimento de qPCR foi confirmado que o gene *masA* está altamente expresso em resposta a agentes que causam desarranjo na parede celular, como a própria anidulafungina, a caspofungina, o calcoflúor white e o congo red. Na ausência do gene *masA*, o fungo *A. fumigatus* não apresenta alteração de sensibilidade à estas drogas. Portanto, é indicado que apesar de ter sua expressão aumentada, *masA* não altera o desenvolvimento do fungo na

presença de drogas que afetam a parede celular fúngica, que é essencial para que ocorra o desenvolvimento normal dos organismos fúngicos, quanto a sua sobrevivência, crescimento e morfologia (Latgé *et al.*, 2014).

De forma semelhante as drogas que afetam a parede celular, o gene *masA* apresenta expressão aumentada na presença de farnesol e além disso, a ausência de *masA* tornou *A. fumigatus* resistente a farnesol. Como mencionado anteriormente, farnesol é uma MQS que também está relacionada com o correto arranjo da parede celular. A via PKC/MAPK está diretamente ligada a modelagem de parede celular e é ativada por Rho1, o qual a sua localização em *A. fumigatus* é influenciada por farnesol (Dichtl *et al.*, 2010). Na via PKC/MAPK de *M. grisea*, em linhagem deletada de *pmk1*, utilizando a técnica de *Northern Blotting*, foi mostrado que *MAS1/GAS2* possui a sua expressão regulada por PMK1 (Figura suplementar 1) (Xue *et al.*, 2002). No teste de sensibilidade em ágar desafiado ao farnesol, a linhagem deletada de *mpkA*, ortólogo a PMK1 em *A. nidulans*, mostra resistência ao fungo (Colabardini *et al.*, 2010). O mesmo acontecendo com linhagens deletadas de MpkA, onde este é regulado por PkcA, que por sua vez apresenta resistência a farnesol em ambas as situações, quando mutado (*calC2*) em *A. nidulans* (Savoldi *et al.*, 2008, Colabardini *et al.*, 2010) e com a expressão de forma constitutiva em *S. cerevisiae* (Fairn *et al.*, 2007). Em uma análise de RNA-seq utilizando linhagem deletada de MpkA, em *A. fumigatus*, o gene *masA* (AFUB_085960) teve a sua expressão caracterizada como *downregulated* (Müller *et al.*, 2012), propondo assim que *masA* possivelmente participar indiretamente da via PKC/MAPK.

Curiosamente, o gene *masA* foi relatado como expresso em ensaio de hibridização *microarray* em linhagem selvagem de *A. fumigatus* desafiada com voriconazole, que afeta a membrana celular fúngica pela inibição da biossíntese do ergosterol (da Silva Ferreira *et al.*, 2006). Este dado foi confirmado por qPCR onde além de voriconazol, outras drogas que afetam a membrana celular como a anfotericina B, miriocina, cerulenina e fitoesfingosina também induziram a expressão de *masA*. Entretanto, entre as drogas testadas, somente

voriconazole causou maior resistência da linhagem *masA* deletado. Miriocina, cerulenina, fitoesfingosina atuam na biossíntese dos esfingolipídios pela inibição da enzima serina palmitoiltransferase, inibindo a síntese de ácidos graxos e como intermediário da biossíntese, respectivamente (Figura suplementar 2). Já o farnesol, voriconazole e anfotericina B atuam na via do ergosterol. Anfotericina B atua pela ligação direta ao ergosterol, formando poros na membrana plasmática onde as células fúngicas perdem íons e organelas. Voriconazole inibe a síntese do ergosterol pela desativação da 14- α -demetilase, enzima chave do processo biossintético do ergosterol. Farnesol é um catabólito da via de biossíntese do ergosterol sendo um produto secundário do pirofosfato de farnesil (Figura suplementar 3).

O pirofosfato de farnesil é o precursor da síntese de farnesol e ergosterol, este último o principal esterol da membrana plasmática fúngica. Os antifúngicos azoles prejudicam a síntese do ergosterol que ocorre após a formação do pirofosfato de farnesil levando a um acúmulo de pirofosfato de farnesil que então pode levar a uma produção aumentada de farnesol (Rhome e Del Poeta, 2009). Contudo, *Aspergillus* sp. não parece produzir em condições normais quantidades detectáveis de farnesol (Rhome e Del Poeta, 2009). Mesmo assim, uma possível explicação para a resistência da linhagem *masA* deletado ao voriconazole possivelmente ocorre devido ao acúmulo de farnesol causado pela inibição da via biossintética do ergosterol causado pelo voriconazole.

A presença de *masA* está evidenciada pela expressão aumentada em *A. fumigatus* frente a diferentes danos na célula (e.g. parede e membrana celular, DNA e danos causados por estresse oxidativo). Entretanto, somente voriconazole e farnesol causaram alteração no desenvolvimento do fungo. Ambos compostos estão envolvidos na via do ergosterol, onde o primeiro inibe a síntese de ergosterol e causa no próprio fungo o possível acúmulo na produção de farnesol, justificando assim semelhante perfil de resistência da linhagem *masA* deletado encontrado para farnesol. Já o mecanismo de ação da anfotericina B não inibe a biossíntese de ergosterol e sim se liga diretamente a esta biomolécula gerando poros na

membrana celular fúngica. Consequentemente, com a anfotericina B possivelmente não é gerado acúmulo de farnesol, o que explica a não resistência da linhagem *masA* deletada a este antifúngico.

masA é um gene que codifica a proteína MasA que possui domínio com função desconhecida e um peptídeo sinal em sua região amino-terminal que o direciona possivelmente para a via secretória da célula. Para confrontar os resultados desta análise *in silico* feita com a sequência proteica de MasA, foi verificada em experimento *in vitro* se a proteína MasA é secretada para o meio extracelular. Por intermédio da visualização/detecção da proteína MasA fusionada a proteína fluorescente GFP foi observado que MasA::GFP esta localizada no citoplasma do fungo e ausente no meio de cultura. Com a indução da expressão do gene *masA* pela anidulafungina, a proteína MasA::GFP esta presente no micélio do fungo bem como localizada na parede celular fúngica, mais precisamente nas pontas das hifas do fungo. Com a indução da expressão de *masA* por anidulafungina, foi observado que GFP esta presente no meio de cultura, isto é, foi secretado pelo fungo. Esta característica de após o recebimento de estímulo ser capaz de gerar a secreção para o meio extracelular e a ausência deste estímulo manter a proteína no citoplasma é pertinente a proteínas que possuem peptídeo sinal (Poter *et al.*, 2015). Isto é explicado pela possível ocorrência de um duplo direcionamento da proteína, sendo direcionada a participar de via clássica de secreção proteica e direcionada ao retículo endoplasmático. Estímulo aplicado a célula faz com que ocorra uma competição entre diferentes moléculas reconhecedoras de sinal, sendo elas as SRP e as NAC endereçando as proteínas para o seu devido local de atuação (Levitan *et al.*, 2005; Poter *et al.*, 2015).

A evidencia da participação da proteína MasA no processo *quorum sensing* terá que ser investigada com maiores detalhes, pois a densidade populacional, pH e temperatura são variáveis importantes que possam interferir nesta habilidade que a célula de *A. fumigatus* irá realizar. Como o processo de aderência e formação de biofilme estão diretamente

relacionados com o mecanismo *quorum sensing*, experimentos em diversos materiais e polímeros diferentes irão nos responder se realmente interfere no fator de virulência em linhagens *masA* deletado.

6. CONCLUSÃO

“O otimista erra tanto quanto o pessimista, mas não sofre por antecipação.”

Fernando Sabino – Escritor Brasileiro

6 - Conclusão

O gene *masA* de *A. fumigatus* codifica a proteína MasA que apresenta um peptídeo sinal e predição de participação na via de secreção. O crescimento polarizado dos fungos filamentosos é dependente desta via de secreção que realiza a entrega de constituintes de parede e membrana celular bem como da maquinaria necessária de construção na ponta da hifa. O sistema de secreção e a integridade da parede celular são mecanismos coordenados na resposta a estímulos externos. Um fungo experimenta a todo o momento drásticas alterações no meio ambiente ou em um organismo hospedeiro. A parede celular fúngica, que desempenha essencial função na morfologia e desenvolvimento do fungo, é a primeira linha de defesa a estas alterações. A sinalização que mantém a organização da parede celular pode ser afetada por moléculas *quorum sensing*, possivelmente por afetar a via PKC/MAPK. MasA está envolvida da propriedade de adesão célula-a-célula e biofilme bem como genes ortólogos estão implicados na via PKC/MAPK. Assim, possivelmente existe participação indireta de MasA na via PKC/MAPK e comunicação *quorum sensing*. A ausência do gene *masA* não é essencial a vida e virulência de *A. fumigatus*. Entretanto, a expressão do referido gene está elevado na presença de danos à parede e membrana celular e DNA, bem como a danos causados por estresse oxidativo. Além disso, em danos na parede celular fúngica causados por anidulafungina, MasA está localizado na parede celular próximo a ponta da hifa e adicionalmente, foi capaz de transferir para o meio extra-celular a proteína fusionada a ele, GFP. Indicando que MasA possivelmente participa da via secretória do fungo principalmente em momentos de estresse como o desarranjo da parede celular. A capacidade de secreção natural dos fungos filamentosos tem sido explorada no contexto industrial há décadas. Indicando para este fim, uma possível aplicabilidade para este peptídeo sinal.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

“Conhecimento sem transformação não é sabedoria.”

Paulo Coelho – Escritor Brasileiro

7- Referência Bibliográfica

ABE, S.; TSUNASHIMA, R.; IJIMA, R.; YAMADA, T.; MARUYAMA, N.; HISAJIMA, T.; ABE, Y.; OSHIMA, H.; YAMAZAKI, M. Suppression of anti-Candida activity of macrophages by a quorum-sensing molecule, farnesol, through induction of oxidative stress. **Microbiol Immunol**, v. 53, n. 6, p. 323-30, 2009.

ADAMS, T. H.; BOYLAN, M. T.; TIMBERLAKE, W. E. brlA is necessary and sufficient to direct conidiophore development in *Aspergillus nidulans*. **Cell**, v. 54, n. 3, p. 353-62, 1988.

ADAMS, T. H.; WIESER, J. K.; YU, J. H. Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 62, n. 1, p. 35-54, 1998.

AGUIRRE, J. Spatial and temporal controls of the *Aspergillus brlA* developmental regulatory gene. **Mol Microbiol**, v. 8, n. 2, p. 211-8, 1993.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M. C.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Molecular biology of the cell. 4. S.l.: **Garland Science**, 2002.

ALKHAYYAT, F.; CHANG KIM, S.; YU, J. H. Genetic control of asexual development in *aspergillus fumigatus*. **Adv Appl Microbiol**, v. 90, p. 93-107, 2015.

ARCHER, D. B.; PEBERDY, J. F. The molecular biology of secreted enzyme production by fungi. **Crit Rev Biotechnol**, v. 17, n. 4, p. 273-306, 1997.

ATKINSON, S.; THROUP, J. P.; STEWART, G. S.; WILLIAMS, P. A hierarchical quorum-sensing system in *Yersinia pseudotuberculosis* is involved in the regulation of motility and clumping. **Mol Microbiol**, v. 33, n. 6, p. 1267-77, 1999.

AXELROD, D. E.; GEALT, M.; PASTUSHOK, M. Gene control of developmental competence in *Aspergillus nidulans*. **Dev Biol**, v. 34, n. 1, p. 9-15, 1973.

BARROS, B. H.; DA SILVA, S. H.; DOS REIS MARQUES E, R.; ROSA, J. C.; YATSUDA, A. P.; ROBERTS, D. W.; BRAGA, G. U. A proteomic approach to identifying proteins differentially expressed in conidia and mycelium of the entomopathogenic fungus *Metarhizium acridum*. **Fungal Biol**, v. 114, n. 7, p. 572-9, 2010.

- BEAUVAIS, A.; BRUNEAU, J. M.; MOL, P. C.; BUITRAGO, M. J.; LEGRAND, R.; LATGE, J. P. Glucan synthase complex of *Aspergillus fumigatus*. **J Bacteriol**, v. 183, n. 7, p. 2273-9, 2001.
- BEAUVAIS, A.; FONTAINE, T.; AIMANIANDA, V.; LATGE, J. P. *Aspergillus* cell wall and biofilm. **Mycopathologia**, v. 178, n. 5-6, p. 371-7, 2014.
- BEAUVAIS, A.; LATGE, J. P. Chitinases and peptide mimotopes. **Chem Biol**, v. 12, n. 1, p. 7-8, 2005.
- BENDTSEN, J. D.; NIELSEN, H.; VON HEIJNE, G.; BRUNAK, S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. **J Mol Biol**, v. 340, n. 4, p. 783-95, 2004.
- BENNETT, J. W. *Aspergillus*: a primer for the novice. **Med Mycol**, v. 47 Suppl 1, p. S5-12, 2009.
- BHABHRA, R.; ASKEW, D. S. Thermotolerance and virulence of *Aspergillus fumigatus*: role of the fungal nucleolus. **Med Mycol**, v. 43 Suppl 1, p. S87-93, 2005.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, 1976.
- BUSBY, T. M.; MILLER, K. Y.; MILLER, B. L. Suppression and enhancement of the *Aspergillus nidulans* medusa mutation by altered dosage of the bristle and stunted genes. **Genetics**, v. 143, n. 1, p. 155-63, 1996.
- CHABI, M. L.; GORACCI, A.; ROCHE, N.; PAUGAM, A.; LUPO, A.; REVEL, M. P. Pulmonary aspergillosis. **Diagn Interv Imaging**, v. 96, n. 5, p. 435-42, 2015.
- CHAUVEROCHE, M. K.; GHIGO, J. M.; D'ENFERT, C. A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. **Nucleic Acids Res**, v. 28, n. 22, p. E97, 2000.
- CHRISTIANSON, T. W.; SIKORSKI, R. S.; DANTE, M.; SHERO, J. H.; HIETER, P. Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. **Gene**, v. 110, n. 1, p. 119-22, 1992.
- CLUTTERBUCK, A. J. Cell volume per nucleus in haploid and diploid strains of *Aspergillus nidulans*. **J Gen Microbiol**, v. 55, n. 2, p. 291-9, 1969.

COLABARDINI, A. C.; DE CASTRO, P. A.; DE GOUVEA, P. F.; SAVOLDI, M.; MALAVAZI, I.; GOLDMAN, M. H.; GOLDMAN, G. H. Involvement of the *Aspergillus nidulans* protein kinase C with farnesol tolerance is related to the unfolded protein response. **Mol Microbiol**, v. 78, n. 5, p. 1259-79, 2010.

COLABARDINI, A. C.; RIES, L. N.; BROWN, N. A.; DOS REIS, T. F.; SAVOLDI, M.; GOLDMAN, M. H.; MENINO, J. F.; RODRIGUES, F.; GOLDMAN, G. H. Functional characterization of a xylose transporter in *Aspergillus nidulans*. **Biotechnol Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 46, 2014.

COLE, L.; DAVIES, D.; HYDE, G. J.; ASHFORD, A. E. Brefeldin A affects growth, endoplasmic reticulum, Golgi bodies, tubular vacuole system, and secretory pathway in *Pisolithus tinctorius*. **Fungal Genet Biol**, v. 29, n. 2, p. 95-106, 2000.

CONESA, A.; PUNT, P. J.; VAN LUIJK, N.; VAN DEN HONDEL, C. A. The secretion pathway in filamentous fungi: a biotechnological view. **Fungal Genet Biol**, v. 33, n. 3, p. 155-71, 2001.

CORDEIRO RDE, A.; NOGUEIRA, G. C.; BRILHANTE, R. S.; TEIXEIRA, C. E.; MOURAO, C. I.; CASTELO-BRANCO DDE, S.; PAIVA MDE, A.; RIBEIRO, J. F.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J.; ROCHA, M. F. Farnesol inhibits in vitro growth of the *Cryptococcus neoformans* species complex with no significant changes in virulence-related exoenzymes. **Vet Microbiol**, v. 159, n. 3-4, p. 375-80, 2012.

DA SILVA FERREIRA, M. E.; KRESS, M. R.; SAVOLDI, M.; GOLDMAN, M. H.; HARTL, A.; HEINEKAMP, T.; BRAKHAGE, A. A.; GOLDMAN, G. H. The *akuB*(KU80) mutant deficient for nonhomologous end joining is a powerful tool for analyzing pathogenicity in *Aspergillus fumigatus*. **Eukaryot Cell**, v. 5, n. 1, p. 207-11, 2006.

DA SILVA FERREIRA, M. E.; MALAVAZI, I.; SAVOLDI, M.; BRAKHAGE, A. A.; GOLDMAN, M. H.; KIM, H. S.; NIERMAN, W. C.; GOLDMAN, G. H. Transcriptome analysis of *Aspergillus fumigatus* exposed to voriconazole. **Curr Genet**, v. 50, n. 1, p. 32-44, 2006.

DAVENPORT, K. R.; SOHASKEY, M.; KAMADA, Y.; LEVIN, D. E.; GUSTIN, M. C. A second osmosensing signal transduction pathway in yeast. Hypotonic shock activates the PKC1 protein kinase-regulated cell integrity pathway. **J Biol Chem**, v. 270, n. 50, p. 30157-61, 1995.

DAVIS, D. A. How human pathogenic fungi sense and adapt to pH: the link to virulence. **Curr Opin Microbiol**, v. 12, n. 4, p. 365-70, 2009.

DAVIS-HANNA, A.; PIISPANEN, A. E.; STATEVA, L. I.; HOGAN, D. A. Farnesol and dodecanol effects on the *Candida albicans* Ras1-cAMP signalling pathway and the regulation of morphogenesis. **Mol Microbiol**, v. 67, n. 1, p. 47-62, 2008.

DE BONA, P.; DESHMUKH, L.; GORBATYUK, V.; VINOGRADOVA, O.; KENDALL, D. A. Structural studies of a signal peptide in complex with signal peptidase I cytoplasmic domain: the stabilizing effect of membrane-mimetics on the acquired fold. **Proteins**, v. 80, n. 3, p. 807-17, 2012.

DE GROOT, P. W.; BRANDT, B. W.; HORIUCHI, H.; RAM, A. F.; DE KOSTER, C. G.; KLIS, F. M. Comprehensive genomic analysis of cell wall genes in *Aspergillus nidulans*. **Fungal Genet Biol**, v. 46 Suppl 1, p. S72-81, 2009.

DEBEAUPUIS, J. P.; SARFATI, J.; CHAZALET, V.; LATGE, J. P. Genetic diversity among clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus*. **Infect Immun**, v. 65, n. 8, p. 3080-5, 1997.

DERENGOWSKI, L. S.; DE-SOUZA-SILVA, C.; BRAZ, S. V.; MELLO-DE-SOUSA, T. M.; BAO, S. N.; KYAW, C. M.; SILVA-PEREIRA, I. Antimicrobial effect of farnesol, a *Candida albicans* quorum sensing molecule, on *Paracoccidioides brasiliensis* growth and morphogenesis. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, v. 8, p. 13, 2009.

ICHTL, K.; EBEL, F.; DIRR, F.; ROUTIER, F. H.; HEESEMANN, J.; WAGENER, J. Farnesol misplaces tip-localized Rho proteins and inhibits cell wall integrity signalling in *Aspergillus fumigatus*. **Mol Microbiol**, v. 76, n. 5, p. 1191-204, 2010.

EDWARDS, P. A.; ERICSSON, J. Sterols and isoprenoids: signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway. **Annu Rev Biochem**, v. 68, p. 157-85, 1999.

EMANUELSSON, O.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G.; NIELSEN, H. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. **Nat Protoc**, v. 2, n. 4, p. 953-71, 2007.

FAIRN, G. D.; MACDONALD, K.; MCMASTER, C. R. A chemogenomic screen in *Saccharomyces cerevisiae* uncovers a primary role for the mitochondria in farnesol toxicity and its regulation by the Pkc1 pathway. **J Biol Chem**, v. 282, n. 7, p. 4868-74, 2007.

FERNANDES, R. A.; MONTEIRO, D. R.; ARIAS, L. S.; FERNANDES, G. L.; DELBEM, A. C.; BARBOSA, D. B. Biofilm formation by *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* in the presence of farnesol: a quantitative evaluation. **Biofouling**, v. 32, n. 3, p. 329-38, 2016.

FORNAROTTO, M.; XIAO, L.; HOU, Y.; KOCH, K. A.; CHANG, E.; O'MALLEY, R. M.; BLACK, T. A.; CABLE, M. B.; WALKER, S. S. Sphingolipid biosynthesis in pathogenic fungi: identification and characterization of the 3-ketosphinganine reductase activity of *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. **Biochim Biophys Acta**, v. 1761, n. 1, p. 52-63, 2006.

FUJITA, H.; YAMAGISHI, M.; KIDA, Y.; SAKAGUCHI, M. Positive charges on the translocating polypeptide chain arrest movement through the translocon. **J Cell Sci**, v. 124, n. Pt 24, p. 4184-93, 2011.

FURUKAWA, K.; HOSHI, Y.; MAEDA, T.; NAKAJIMA, T.; ABE, K. *Aspergillus nidulans* HOG pathway is activated only by two-component signalling pathway in response to osmotic stress. **Mol Microbiol**, v. 56, n. 5, p. 1246-61, 2005.

GORDON, C. L.; KHALAJ, V.; RAM, A. F.; ARCHER, D. B.; BROOKMAN, J. L.; TRINCI, A. P.; JEENES, D. J.; DOONAN, J. H.; WELLS, B.; PUNT, P. J.; VAN DEN HONDEL, C. A.; ROBSON, G. D. Glucoamylase::green fluorescent protein fusions to monitor protein secretion in *Aspergillus niger*. **Microbiology**, v. 146 (Pt 2), p. 415-26, 2000.

GOW, N. A.; BROWN, A. J.; ODDS, F. C. Fungal morphogenesis and host invasion. **Curr Opin Microbiol**, v. 5, n. 4, p. 366-71, 2002.

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**, v. 87, n. 12, p. 4645-9, 1990.

GRELL, M. N.; MOURITZEN, P.; GIESE, H. A *Blumeria graminis* gene family encoding proteins with a C-terminal variable region with homologues in pathogenic fungi. **Gene**, v. 311, p. 181-92, 2003.

HACHIYA, N.; ALAM, R.; SAKASEGAWA, Y.; SAKAGUCHI, M.; MIHARA, K.; OMURA, T. A mitochondrial import factor purified from rat liver cytosol is an ATP-dependent conformational modulator for precursor proteins. **EMBO J**, v. 12, n. 4, p. 1579-86, 1993.

HAMER, J. E.; HOLDEN, D. W. Linking Approaches in the Study of Fungal Pathogenesis: A Commentary. **Fungal Genet Biol**, v. 21, n. 1, p. 11-6, 1997.

HAN, K. H.; PRADE, R. A. Osmotic stress-coupled maintenance of polar growth in *Aspergillus nidulans*. **Mol Microbiol**, v. 43, n. 5, p. 1065-78, 2002.

HARRIS, S. D. Septum formation in *Aspergillus nidulans*. **Curr Opin Microbiol**, v. 4, n. 6, p. 736-9, 2001.

HARRIS, S. D. The Spitzenkorper: a signalling hub for the control of fungal development? **Mol Microbiol**, v. 73, n. 5, p. 733-6, 2009.

HARTLAND, R. P.; FONTAINE, T.; DEBEAUPUIS, J. P.; SIMENEL, C.; DELEPIERRE, M.; LATGE, J. P. A novel beta-(1-3)-glucanosyltransferase from the cell wall of *Aspergillus fumigatus*. **J Biol Chem**, v. 271, n. 43, p. 26843-9, 1996.

HENRIQUES, M.; MARTINS, M.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. Effect of farnesol on *Candida dubliniensis* morphogenesis. **Lett Appl Microbiol**, v. 44, n. 2, p. 199-205, 2007.

HERRMANN, M.; SPROTE, P.; BRAKHAGE, A. A. Protein kinase C (PkcA) of *Aspergillus nidulans* is involved in penicillin production. **Appl Environ Microbiol**, v. 72, n. 4, p. 2957-70, 2006.

HORNBY, J. M.; JENSEN, E. C.; LISEC, A. D.; TASTO, J. J.; JAHNKE, B.; SHOEMAKER, R.; DUSSAULT, P.; NICKERSON, K. W. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. **Appl Environ Microbiol**, v. 67, n. 7, p. 2982-92, 2001.

HORNBY, J. M.; NICKERSON, K. W. Enhanced production of farnesol by *Candida albicans* treated with four azoles. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n. 6, p. 2305-7, 2004.

ICHINOMIYA, M.; UCHIDA, H.; KOSHI, Y.; OHTA, A.; HORIUCHI, H. A protein kinase C-encoding gene, *pkcA*, is essential to the viability of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 71, n. 11, p. 2787-99, 2007.

IRIE, T.; MATSUMURA, H.; TERAUCHI, R.; SAITOH, H. Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) of *Magnaporthe grisea*: genes involved in appressorium formation. **Mol Genet Genomics**, v. 270, n. 2, p. 181-9, 2003.

- JIN, Q.; LI, C.; LI, Y.; SHANG, J.; LI, D.; CHEN, B.; DONG, H. Complexity of roles and regulation of the PMK1-MAPK pathway in mycelium development, conidiation and appressorium formation in *Magnaporthe oryzae*. **Gene Expr Patterns**, v. 13, n. 5-6, p. 133-41, 2013.
- JOHNSON, N.; POWIS, K.; HIGH, S. Post-translational translocation into the endoplasmic reticulum. **Biochim Biophys Acta**, v. 1833, n. 11, p. 2403-9, 2013.
- JUNGHANS, H.; METZLAFF, M. A simple and rapid method for the preparation of total plant DNA. **Biotechniques**, v. 8, n. 2, p. 176, 1990.
- JUSTESEN, A.; SOMERVILLE, S.; CHRISTIANSEN, S.; GIESE, H. Isolation and characterization of two novel genes expressed in germinating conidia of the obligate biotroph *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. **Gene**, v. 170, n. 1, p. 131-5, 1996.
- KALL, L.; KROGH, A.; SONNHAMMER, E. L. Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction--the Phobius web server. **Nucleic Acids Res**, v. 35, n. **Web Server issue**, p. W429-32, 2007.
- KAWASAKI, L.; SANCHEZ, O.; SHIOZAKI, K.; AGUIRRE, J. SakA MAP kinase is involved in stress signal transduction, sexual development and spore viability in *Aspergillus nidulans*. **Mol Microbiol**, v. 45, n. 4, p. 1153-63, 2002.
- KURATSU, M.; TAURA, A.; SHOJI, J. Y.; KIKUCHI, S.; ARIOKA, M.; KITAMOTO, K. Systematic analysis of SNARE localization in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. **Fungal Genet Biol**, v. 44, n. 12, p. 1310-23, 2007.
- KUWAYAMA, H.; OBARA, S.; MORIO, T.; KATOH, M.; URUSHIHARA, H.; TANAKA, Y. PCR-mediated generation of a gene disruption construct without the use of DNA ligase and plasmid vectors. **Nucleic Acids Res**, v. 30, n. 2, p. E2, 2002.
- LATGE, J. P. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. **Clin Microbiol Rev**, v. 12, n. 2, p. 310-50, 1999.
- LATGE, J. P. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. **Trends Microbiol**, v. 9, n. 8, p. 382-9, 2001.
- LATGE, J. P. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. **Mol Microbiol**, v. 66, n. 2, p. 279-90, 2007.

- LATGE, J. P.; BEAUVAIS, A. Functional duality of the cell wall. **Curr Opin Microbiol**, v. 20, p. 111-7, 2014.
- LATGE, 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*. **Infect Immun**, v. 62, n. 12, p. 5424-33, 1994.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. *Lehninger principles of biochemistry*. 5. New York: **W.H. Freeman**, 2008.
- LEVITAN, A.; TREBITSH, T.; KISS, V.; PEREG, Y.; DANGOOR, I.; DANON, A. Dual targeting of the protein disulfide isomerase RB60 to the chloroplast and the endoplasmic reticulum. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 17, p. 6225-30, 2005.
- LEW, R. R. How does a hypha grow? The biophysics of pressurized growth in fungi. **Nat Rev Microbiol**, v. 9, n. 7, p. 509-18, 2011.
- LI, X.; GAO, M.; HAN, X.; TAO, S.; ZHENG, D.; CHENG, Y.; YU, R.; HAN, G.; SCHMIDT, M.; HAN, L. Disruption of the phospholipase D gene attenuates the virulence of *Aspergillus fumigatus*. **Infect Immun**, v. 80, n. 1, p. 429-40, 2012.
- MACHIDA, K.; TANAKA, T. Farnesol-induced generation of reactive oxygen species dependent on mitochondrial transmembrane potential hyperpolarization mediated by F(0)F(1)-ATPase in yeast. **FEBS Lett**, v. 462, n. 1-2, p. 108-12, 1999.
- MACHIDA, K.; TANAKA, T.; FUJITA, K.; TANIGUCHI, M. Farnesol-induced generation of reactive oxygen species via indirect inhibition of the mitochondrial electron transport chain in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **J Bacteriol**, v. 180, n. 17, p. 4460-5, 1998.
- MALAVAZI, I.; GOLDMAN, G. H. Gene disruption in *Aspergillus fumigatus* using a PCR-based strategy and in vivo recombination in yeast. **Methods Mol Biol**, v. 845, p. 99-118, 2012.
- MALAVAZI, I.; GOLDMAN, G. H.; BROWN, N. A. The importance of connections between the cell wall integrity pathway and the unfolded protein response in filamentous fungi. **Brief Funct Genomics**, v. 13, n. 6, p. 456-70, 2014.

MARTIN, S. W.; KONOPKA, J. B. Lipid raft polarization contributes to hyphal growth in *Candida albicans*. **Eukaryot Cell**, v. 3, n. 3, p. 675-84, 2004.

MARUYAMA, J.; KIKUCHI, S.; KITAMOTO, K. Differential distribution of the endoplasmic reticulum network as visualized by the BipA-EGFP fusion protein in hyphal compartments across the septum of the filamentous fungus, *Aspergillus oryzae*. **Fungal Genet Biol**, v. 43, n. 9, p. 642-54, 2006.

MASCHMEYER, G.; HAAS, A.; CORNELLY, O. A. Invasive aspergillosis: epidemiology, diagnosis and management in immunocompromised patients. **Drugs**, v. 67, n. 11, p. 1567-601, 2007.

MAYORGA, M. E.; TIMBERLAKE, W. E. Isolation and molecular characterization of the *Aspergillus nidulans* wA gene. **Genetics**, v. 126, n. 1, p. 73-9, 1990.

MESSINA, E. L.; YORK, J.; NUNBERG, J. H. Dissection of the role of the stable signal peptide of the arenavirus envelope glycoprotein in membrane fusion. **J Virol**, v. 86, n. 11, p. 6138-45, 2012.

MILLER, K. Y.; TOENNIS, T. M.; ADAMS, T. H.; MILLER, B. L. Isolation and transcriptional characterization of a morphological modifier: the *Aspergillus nidulans* stunted (stuA) gene. **Mol Gen Genet**, v. 227, n. 2, p. 285-92, 1991.

MOSEL, D. D.; DUMITRU, R.; HORNBY, J. M.; ATKIN, A. L.; NICKERSON, K. W. Farnesol concentrations required to block germ tube formation in *Candida albicans* in the presence and absence of serum. **Appl Environ Microbiol**, v. 71, n. 8, p. 4938-40, 2005.

MOTA JUNIOR, A. O.; MALAVAZI, I.; SORIANI, F. M.; HEINEKAMP, T.; JACOBSEN, I.; BRAKHAGE, A. A.; SAVOLDI, M.; GOLDMAN, M. H.; DA SILVA FERREIRA, M. E.; GOLDMAN, G. H. Molecular characterization of the *Aspergillus fumigatus* NCS-1 homologue, NcsA. **Mol Genet Genomics**, v. 280, n. 6, p. 483-95, 2008.

MOURINO-PEREZ, R. R.; RIQUELME, M. Recent advances in septum biogenesis in *Neurospora crassa*. **Adv Genet**, v. 83, p. 99-134, 2013.

MULLINS, J.; HARVEY, R.; SEATON, A. Sources and incidence of airborne *Aspergillus fumigatus* (Fres). **Clin Allergy**, v. 6, n. 3, p. 209-17, 1976.

MULLER, S.; BALDIN, C.; GROTH, M.; GUTHKE, R.; KNIEMEYER, O.; BRAKHAGE, A. A.; VALIANTE, V. Comparison of transcriptome technologies in the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* reveals novel insights into the genome and MpkA dependent gene expression. **BMC Genomics**, v. 13, p. 519, 2012.

NAKAI, K. Protein sorting signals and prediction of subcellular localization. **Adv Protein Chem**, v. 54, p. 277-344, 2000.

NATORI, Y.; KANO, Y.; IMAMOTO, F. Genetic transformation of *Lactobacillus casei* by electroporation. **Biochimie**, v. 72, n. 4, p. 265-9, 1990.

NG, D. T.; BROWN, J. D.; WALTER, P. Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. **J Cell Biol**, v. 134, n. 2, p. 269-78, 1996.

NIERMAN, W. C.; PAIN, A.; ANDERSON, M. J.; WORTMAN, J. R.; KIM, H. S.; ARROYO, J.; BERRIMAN, M.; ABE, K.; ARCHER, D. B.; BERMEJO, C.; BENNETT, J.; BOWYER, P.; CHEN, D.; COLLINS, M.; COULSEN, R.; DAVIES, R.; DYER, P. S.; FARMAN, M.; FEDOROVA, N.; FEDOROVA, N.; FELDBLYUM, T. V.; FISCHER, R.; FOSKER, N.; FRASER, A.; GARCIA, J. L.; GARCIA, M. J.; GOBLE, A.; GOLDMAN, G. H.; GOMI, K.; GRIFFITH-JONES, S.; GWILLIAM, R.; HAAS, B.; HAAS, H.; HARRIS, D.; HORIUCHI, H.; HUANG, J.; HUMPHRAY, S.; JIMENEZ, J.; KELLER, N.; KHOURI, H.; KITAMOTO, K.; KOBAYASHI, T.; KONZACK, S.; KULKARNI, R.; KUMAGAI, T.; LAFON, A.; LATGE, J. P.; LI, W.; LORD, A.; LU, C.; MAJOROS, W. H.; MAY, G. S.; MILLER, B. L.; MOHAMOUD, Y.; MOLINA, M.; MONOD, M.; MOUYNIA, I.; MULLIGAN, S.; MURPHY, L.; O'NEIL, S.; PAULSEN, I.; PENALVA, M. A.; PERTEA, M.; PRICE, C.; PRITCHARD, B. L.; QUAIL, M. A.; RABBINOWITSCH, E.; RAWLINS, N.; RAJANDREAM, M. A.; REICHARD, U.; RENAULD, H.; ROBSON, G. D.; RODRIGUEZ DE CORDOBA, S.; RODRIGUEZ-PENA, J. M.; RONNING, C. M.; RUTTER, S.; SALZBERG, S. L.; SANCHEZ, M.; SANCHEZ-FERRERO, J. C.; SAUNDERS, D.; SEEGER, K.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; TAKEUCHI, M.; TEKAIA, F.; TURNER, G.; VAZQUEZ DE ALDANA, C. R.; WEIDMAN, J.; WHITE, O.; WOODWARD, J.; YU, J. H.; FRASER, C.; GALAGAN, J. E.; ASAI, K.; MACHIDA, M.; HALL, N.; BARRELL, B.; DENNING, D. W. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. **Nature**, v. 438, n. 7071, p. 1151-6, 2005.

NILSSON, I.; LARA, P.; HESSA, T.; JOHNSON, A. E.; VON HEIJNE, G.; KARAMYSHEV, A. L. The code for directing proteins for translocation across ER membrane: SRP cotranslationally recognizes specific features of a signal sequence. **J Mol Biol**, v. 427, n. 6 Pt A, p. 1191-201, 2015.

NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 11, p. 3519-28, 2006.

NUCCI, M.; MARR, K. A. Emerging fungal diseases. **Clin Infect Dis**, v. 41, n. 4, p. 521-6, 2005.

OLIVER, P. T. Conidiophore and spore development in *Aspergillus nidulans*. **J Gen Microbiol**, v. 73, n. 1, p. 45-54, 1972.

ONYEWU, C.; BLANKENSHIP, J. R.; DEL POETA, M.; HEITMAN, J. Ergosterol biosynthesis inhibitors become fungicidal when combined with calcineurin inhibitors against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, n. 3, p. 956-64, 2003.

ORLEAN, P. Architecture and biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. **Genetics**, v. 192, n. 3, p. 775-818, 2012.

OSMANI, S. A.; MAY, G. S.; MORRIS, N. R. Regulation of the mRNA levels of *nimA*, a gene required for the G2-M transition in *Aspergillus nidulans*. **J Cell Biol**, v. 104, n. 6, p. 1495-504, 1987.

PARK, G.; XUE, C.; ZHENG, L.; LAM, S.; XU, J. R. MST12 regulates infectious growth but not appressorium formation in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Mol Plant Microbe Interact**, v. 15, n. 3, p. 183-92, 2002.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clin Microbiol Rev**, v. 20, n. 1, p. 133-63, 2007.

PHILIPPE, B.; IBRAHIM-GRANET, O.; PREVOST, M. C.; GOUGEROT-POCIDALO, M. A.; SANCHEZ PEREZ, M.; VAN DER MEEREN, A.; LATGE, J. P. Killing of *Aspergillus fumigatus* by alveolar macrophages is mediated by reactive oxidant intermediates. **Infect Immun**, v. 71, n. 6, p. 3034-42, 2003.

PITT, J. I. The current role of *Aspergillus* and *Penicillium* in human and animal health. **J Med Vet Mycol**, v. 32 Suppl 1, p. 17-32, 1994.

PORTER, B. W.; YUEN, C. Y.; CHRISTOPHER, D. A. Dual protein trafficking to secretory and non-secretory cell compartments: clear or double vision? **Plant Sci**, v. 234, p. 174-9, 2015.

RAM, A. F.; KLIS, F. M. Identification of fungal cell wall mutants using susceptibility assays based on Calcofluor white and Congo red. **Nat Protoc**, v. 1, n. 5, p. 2253-6, 2006.

RAMAGE, G.; MOWAT, E.; JONES, B.; WILLIAMS, C.; LOPEZ-RIBOT, J. Our current understanding of fungal biofilms. **Crit Rev Microbiol**, v. 35, n. 4, p. 340-55, 2009.

RAMAGE, G.; SAVILLE, S. P.; THOMAS, D. P.; LOPEZ-RIBOT, J. L. *Candida* biofilms: an update. **Eukaryot Cell**, v. 4, n. 4, p. 633-8, 2005.

RAMAGE, G.; SAVILLE, S. P.; WICKES, B. L.; LOPEZ-RIBOT, J. L. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. **Appl Environ Microbiol**, v. 68, n. 11, p. 5459-63, 2002.

RENWICK, J.; DALY, P.; REEVES, E. P.; KAVANAGH, K. Susceptibility of larvae of *Galleria mellonella* to infection by *Aspergillus fumigatus* is dependent upon stage of conidial germination. **Mycopathologia**, v. 161, n. 6, p. 377-84, 2006.

REYES, G.; ROMANS, A.; NGUYEN, C. K.; MAY, G. S. Novel mitogen-activated protein kinase MpkC of *Aspergillus fumigatus* is required for utilization of polyalcohol sugars. **Eukaryot Cell**, v. 5, n. 11, p. 1934-40, 2006.

RHOME, R.; DEL POETA, M. Lipid signaling in pathogenic fungi. **Annu Rev Microbiol**, v. 63, p. 119-31, 2009.

ROMAN, E.; ALONSO-MONGE, R.; GONG, Q.; LI, D.; CALDERONE, R.; PLA, J. The Cek1 MAPK is a short-lived protein regulated by quorum sensing in the fungal pathogen *Candida albicans*. **FEMS Yeast Res**, v. 9, n. 6, p. 942-55, 2009.

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**, v. 152, n. Pt 7, p. 1919-28, 2006.

RONEN, R.; SHARON, H.; LEVDANSKY, E.; ROMANO, J.; SHADKCHAN, Y.; OSHEROV, N. The *Aspergillus nidulans* *pkcA* gene is involved in polarized growth, morphogenesis and maintenance of cell wall integrity. **Curr Genet**, v. 51, n. 5, p. 321-9, 2007.

SALES-CAMPOS, H.; TONANI, L.; CARDOSO, C. R.; KRESS, M. R. The immune interplay between the host and the pathogen in *Aspergillus fumigatus* lung infection. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 693023, 2013.

SAMBROOK J AND RUSSELD. W. Molecular Cloning: a laboratory manual, 3rd ed, **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, New York, 2001.

SAMSON, R. A. The genus *Aspergillus* with special regard to the *Aspergillus fumigatus* group. **Contrib Microbiol**, v. 2, p. 5-20, 1999.

SANCHEZ-LEON, E.; VERDIN, J.; FREITAG, M.; ROBERSON, R. W.; BARTNICKI-GARCIA, S.; RIQUELME, M. Traffic of chitin synthase 1 (CHS-1) to the Spitzenkorper and developing septa in hyphae of *Neurospora crassa*: actin dependence and evidence of distinct microvesicle populations. **Eukaryot Cell**, v. 10, n. 5, p. 683-95, 2011.

SAVOLDI, M.; MALAVAZI, I.; SORIANI, F. M.; CAPELLARO, J. L.; KITAMOTO, K.; DA SILVA FERREIRA, M. E.; GOLDMAN, M. H.; GOLDMAN, G. H. Farnesol induces the transcriptional accumulation of the *Aspergillus nidulans* Apoptosis-Inducing Factor (AIF)-like mitochondrial oxidoreductase. **Mol Microbiol**, v. 70, n. 1, p. 44-59, 2008.

SCHATZ, G.; DOBBERSTEIN, B. Common principles of protein translocation across membranes. **Science**, v. 271, n. 5255, p. 1519-26, 1996.

SEMIGHINI, C. P.; HORNBY, J. M.; DUMITRU, R.; NICKERSON, K. W.; HARRIS, S. D. Farnesol-induced apoptosis in *Aspergillus nidulans* reveals a possible mechanism for antagonistic interactions between fungi. **Mol Microbiol**, v. 59, n. 3, p. 753-64, 2006.

SEMIGHINI, C. P.; MURRAY, N.; HARRIS, S. D. Inhibition of *Fusarium graminearum* growth and development by farnesol. **FEMS Microbiol Lett**, v. 279, n. 2, p. 259-64, 2008.

SEXTON, A. C.; HOWLETT, B. J. Parallels in fungal pathogenesis on plant and animal hosts. **Eukaryot Cell**, v. 5, n. 12, p. 1941-9, 2006.

SHEPPARD, D. C.; DOEDT, T.; CHIANG, L. Y.; KIM, H. S.; CHEN, D.; NIERMAN, W. C.; FILLER, S. G. The *Aspergillus fumigatus* StuA protein governs the up-regulation of a discrete transcriptional program during the acquisition of developmental competence. **Mol Biol Cell**, v. 16, n. 12, p. 5866-79, 2005.

SHIRTLIFF, M. E.; KROM, B. P.; MEIJERING, R. A.; PETERS, B. M.; ZHU, J.; SCHEPER, M. A.; HARRIS, M. L.; JABRA-RIZK, M. A. Farnesol-induced apoptosis in *Candida albicans*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 6, p. 2392-401, 2009.

SHOJI, J. Y.; ARIOKA, M.; KITAMOTO, K. Dissecting cellular components of the secretory pathway in filamentous fungi: insights into their application for protein production. **Biotechnol Lett**, v. 30, n. 1, p. 7-14, 2008.

STEINBERG, G. Hyphal growth: a tale of motors, lipids, and the Spitzenkorper. **Eukaryot Cell**, v. 6, n. 3, p. 351-60, 2007.

SUGUI, J. A.; KWON-CHUNG, K. J.; JUVVADI, P. R.; LATGE, J. P.; STEINBACH, W. J. *Aspergillus fumigatus* and related species. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 5, n. 2, p. a019786, 2015.

TAYLOR, M. M.; MACDONALD, K.; MORRIS, A. J.; MCMASTER, C. R. Enhanced apoptosis through farnesol inhibition of phospholipase D signal transduction. **FEBS J**, v. 272, n. 19, p. 5056-63, 2005.

TEEPE, A. G.; LOPRETE, D. M.; HE, Z.; HOGGARD, T. A.; HILL, T. W. The protein kinase C orthologue PkcA plays a role in cell wall integrity and polarized growth in *Aspergillus nidulans*. **Fungal Genet Biol**, v. 44, n. 6, p. 554-62, 2007.

TEKAIA, F.; LATGE, J. P. *Aspergillus fumigatus*: saprophyte or pathogen? **Curr Opin Microbiol**, v. 8, n. 4, p. 385-92, 2005.

TOWBIN, H.; GORDON, J. Immunoblotting and dot immunobinding--current status and outlook. **J Immunol Methods**, v. 72, n. 2, p. 313-40, 1984.

TWUMASI-BOATENG, K.; YU, Y.; CHEN, D.; GRAVELAT, F. N.; NIERMAN, W. C.; SHEPPARD, D. C. Transcriptional profiling identifies a role for BrlA in the response to nitrogen depletion and for StuA in the regulation of secondary metabolite clusters in *Aspergillus fumigatus*. **Eukaryot Cell**, v. 8, n. 1, p. 104-15, 2009.

UPPULURI, P.; MEKALA, S.; CHAFFIN, W. L. Farnesol-mediated inhibition of *Candida albicans* yeast growth and rescue by a diacylglycerol analogue. **Yeast**, v. 24, n. 8, p. 681-93, 2007.

VALIANTE, V.; HEINEKAMP, T.; JAIN, R.; HARTL, A.; BRAKHAGE, A. A. The mitogen-activated protein kinase MpkA of *Aspergillus fumigatus* regulates cell wall signaling and oxidative stress response. **Fungal Genet Biol**, v. 45, n. 5, p. 618-27, 2008.

VALIANTE, V.; MACHELEIDT, J.; FOGÉ, M.; BRAKHAGE, A. A. The *Aspergillus fumigatus* cell wall integrity signaling pathway: drug target, compensatory pathways, and virulence. **Front Microbiol**, v. 6, p. 325, 2015.

von HEIJNE, G. The signal peptide. **J Membr Biol**, v. 115, n. 3, p. 195-201, 1990.

von HEIJNE, G.; ABRAHMSEN, L. Species-specific variation in signal peptide design. Implications for protein secretion in foreign hosts. **FEBS Lett**, v. 244, n. 2, p. 439-46, 1989.

von ZESKA KRESS, M. R.; HARTING, R.; BAYRAM, O.; CHRISTMANN, M.; IRMER, H.; VALERIUS, O.; SCHINKE, J.; GOLDMAN, G. H.; BRAUS, G. H. The COP9 signalosome counteracts the accumulation of cullin SCF ubiquitin E3 RING ligases during fungal development. **Mol Microbiol**, v. 83, n. 6, p. 1162-77, 2012.

VOZIYAN, P. A.; HAUG, J. S.; MELNYKOVYCH, G. Mechanism of farnesol cytotoxicity: further evidence for the role of PKC-dependent signal transduction in farnesol-induced apoptotic cell death. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 212, n. 2, p. 479-86, 1995.

WINSTON, F.; DOLLARD, C.; RICUPERO-HOVASSE, S. L. Construction of a set of convenient *Saccharomyces cerevisiae* strains that are isogenic to S288C. **Yeast**, v. 11, n. 1, p. 53-5, 1995.

WOLKOW, T. D.; HARRIS, S. D.; HAMER, J. E. Cytokinesis in *Aspergillus nidulans* is controlled by cell size, nuclear positioning and mitosis. **J Cell Sci**, v. 109 (Pt 8), p. 2179-88, 1996.

WONGSUK, T.; PUMESAT, P.; LUPLERTLOP, N. Fungal quorum sensing molecules: Role in fungal morphogenesis and pathogenicity. **J Basic Microbiol**, 2016.

XUE, C.; PARK, G.; CHOI, W.; ZHENG, L.; DEAN, R. A.; XU, J. R. Two novel fungal virulence genes specifically expressed in appressoria of the rice blast fungus. **Plant Cell**, v. 14, n. 9, p. 2107-19, 2002.

YANG, C.; KAZANIETZ, M. G. Divergence and complexities in DAG signaling: looking beyond PKC. **Trends Pharmacol Sci**, v. 24, n. 11, p. 602-8, 2003.

8. APÊNDICE

“Volta teu rosto sempre na direção do sol, e então, as sombras ficarão para trás.”

Sabedoria oriental

8 – Apêndice

8.1 – Meio de cultura

8.1.1 – Meio de cultura para *A. fumigatus*

8.1.1.1 – MEIO DE CULTURA MÍNIMO pH 6,5 (Kaffer, 1977)

Solução de Sais	1X
Elementos traços	0,1% (v/v)
Glicose	1% (p/v)
Ágar	2% (p/v)

Acertar o pH 6,5 com NaOH 10 M e completar o volume com água destilada e autoclavar.

*Obs.: Meio de cultura mínimo com pH 5,5 e 6,5 foi tamponado com 100 mM de ácido 2-(N-morfolino) etanosulfônico (MES) e pH 7,5 e 8,5 com 100 mM de tampão ácido N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-etanosulfônico (HEPES).

8.1.1.2 – SOLUÇÃO DE SAIS 20X (Kaffer, 1977)

NaNO ₃	3,2 M
KCl	0,14 M
KH ₂ PO ₄	0,2 M
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,04 M

Completar o volume com água destilada e autoclavar.

8.1.1.3 – SOLUÇÕES DE ELEMENTOS TRAÇOS 1000X (Kaffer, 1977)

ZnSO ₄ .7H ₂ O	75 mM
H ₃ BO ₃	180 mM
MnCl ₂ .4H ₂ O	25 mM
FeSO ₄ .7H ₂ O	18 mM
CoCl ₂ .5H ₂ O	6 mM
Cu(SO ₄).5H ₂ O	6 mM
(NH ₄) ₆ MO ₇ O ₂₄ .4.H ₂ O	1 mM
EDTA	140 mM

Adicionar os sólidos na ordem listada em 8/10 do volume final de água destilada. Dissolver cada um completamente antes de adicionar o próximo. Aquecer a solução até 100°C. Resfriar para 60°C e ajustar o pH entre 6,5 e 6,8 com NaOH. Resfriar até atingir a temperatura ambiente e completar para o volume final.

8.1.1.4 – MEIO DE CULTURA COMPLETO YG E YAG (Kaffer, 1977)

Extrato de levedura	0,5% (p/v)
Glicose	2% (p/v)
Elementos Traços	0,1% (v/v)

Completar o volume com água destilada e autoclavar.

*Obs.: YAG, YG mais 1% (p/v) ágar; YG+UU, YG suplementado com 4 mM de uridina (Sigma Aldrich®) e 10 mM de uracila (Sigma Aldrich®); Suplementação com

1,2 M de Sorbitol (Sigma Aldrich®) e Meio de cultura completo Top Agar: YG mais 1% de ágar.

8.2.2 – Meios de Cultura para *S. cerevisiae*

8.2.2.1 – YEAST PEPTONE DEXTROSE (YPD)

Extrato de levedura	1% (p/v)
Peptona	2% (p/v)
Dextrose	2% (p/v)
Ágar	1,7% (p/v)

Completar o volume com água destilada e autoclavar.

8.2.2.2 – Meio SC – URA⁻

Base de nitrogênio sem aminoácidos	0,7% (p/v)
Glicose	2% (p/v)
Leucina	0,1% (p/v)
Lisina	0,1% (p/v)
Triptofano	0,1% (p/v)
Histidina	0,05% (p/v)
Ágar	2% (p/v)

Dissolver em água destilada e autoclavar.

8.2.3 – Meio de cultura para *E. coli*

8.2.3.1 –LURIA BERTANI (LB)

Extrato de Levedura	0,5% (p/v)
Cloreto de Sódio	0,17 M
Triptona	1% (p/v)
Ágar	2% (p/v)

Completar o volume com água destilada e autoclavar.

8.3- Soluções

8.3.1 – Soluções para ensaios de recombinação *in vivo* em *S. cerevisiae*

8.3.1.1 – TRIS – EDTA (TE) pH 7,5 10X

Tris	100 mM
EDTA	10 mM

Acertar o pH para 7,5 com HCl, completar o volume com água destilada e filtrar em filtro 0,45 µM – Millipore®.

8.3.1.2 – ACETATO DE LITIO (LiOAc) 10X

LiOAc	1 M
-------	-----

Ajustar o pH para 7,5 com ácido acético diluído, completar o volume com água destilada e filtrar em filtro 0,45 µM – Millipore®.

8.3.1.3 – TRIS-EDTA / ACETATO DE LÍTIO (TE/LiOAc)

TE	1X
LiOAc	0,1 M

Completar o volume com água ultrapura. Filtrar em filtro 0,45 µM – Millipore®

8.3.1.4 – POLIETILENO GLICOL (PEG 3350) 50%

PEG 3350	50% (p/v)
----------	-----------

Completar o volume com água ultrapura e filtrar em filtro 0,45 µM – Millipore®.

8.3.1.5 – PEG 3350/TE/LiOAc

PEG3350	50% (p/v)
TE	1X
LiOAc	
0,1M	

Completar o volume com água ultrapura e filtrar em filtro 0,45 µM – Millipore®.

8.3.2 – Soluções para transformação em *A. fumigatus***8.3.2.1 – TAMPÃO CITRATO**

KCl	150 mM
NaCl	580 mM
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	50 mM

Ajustar para o pH 5,5, Completar o volume com água ultrapura e autoclavar.

8.3.2.2 – SOLUÇÃO DE PROTOPLASTIZAÇÃO

Lallzyme MMX (Lallemand®)	1% (p/v)
Lisozima de ovo de galinha (SERVA®)	1% (p/v)
Tampão Citrato	50 mL

Completar o volume com água ultrapura e filtrar em filtro 0,45 µM – Millipore®.

8.3.2.3 – STC 1700

Sorbitol	1,2 M
Tris pH 5,5	10 mM
CaCl ₂ .2H ₂ O	50 mM
NaCl	35 mM

Completar o volume com água ultrapura. Autoclavar.

8.3.2.4 – POLIETILENO GLICOL (PEG) 4000

Tris pH 7,5	10 mM
CaCl ₂	50 mM
PEG4000	60 % (p/v)

Completar o volume com água ultrapura. Autoclavar.

8.3.3 – Soluções para ensaios com DNA

8.3.3.1 – TRIS ACETATO EDTA (TAE) pH 8,0 50X

Tris Base	242 g
CH ₃ COOH (Ácido Acético Glacial)	57,1 mL
0,5 M EDTA pH 8,0	100 mL

Ajustar para o pH 8,0 e completar o volume com água destilada.

8.3.3.2 – TAMPÃO DE AMOSTRA PARA ELETROFORES DE DNA

Azul de Bromofenol	5% (p/v)
Xileno Cianol FF	0,25% (p/v)
Glicerol	30% (v/v)

Dissolver em água destilada e acertar o volume final.

8.3.3.3 – TAMPÃO DE EXTRAÇÃO DE DNA

Tris-HCl pH 8,5	200 mM
NaCl	250 mM
EDTA	25 mM
SDS	0,5% (p/v)

Dissolver em água destilada e acertar o volume final.

8.3.4 – Soluções para ensaios com proteínas**8.3.4.1 - TAMPÃO DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA**

Glicerol	10% (v/v)
Tris Base pH 7,5	50 mM
Triton X – 100	1%
NaCl	150 mM
SDS	0,1%
EDTA pH 7,5	5 mM
PMSF	1 mM

Dissolver em água ultra pura e completar o volume.

8.3.4.2 – GEL DE POLIACRILAMIDA – EMPILHAMENTO (SDS-PAGE)

Tris-HCl pH 6,8	125 mM
SDS (Dodecil Sulfato de Sódio)	0,1% (p/v)
Bis: Acrilamida (0,8:30)	5% (v/v)
TEMED	0,15% (v/v)
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ (Persulfato de Amônia)	10 % (p/v)

Dissolver em água ultrapura, aplicar na cuba e polimerizar por no mínimo 30 minutos.

8.3.4.3 – GEL DE POLIACRILAMIDA – CORRIDA (SDS-PAGE)

Tris-HCl pH 8,0	375 mM
Bis: Acrilamida (0,8:30)	10 ou 12% (v/v)
TEMED	0,1% (v/v)
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ (Persulfato de Amônia)	10 % (p/v)

Dissolver em água ultrapura, aplicar na cuba e polimerizar por no mínimo 30 minutos.

8.3.4.4 – TAMPÃO DE AMOSTRA (TA)

Tris-HCl	313 mM
SDS	10% (p/v)
Sacarose ou Glicerol	10% (p/v) ou (v/v)
Azul de bromofenol	0,1% (p/v)

8.3.4.5 – CORANTE COOMASSIE

Comassie Brilliant Blue	0,25% (p/v)
CH ₃ COOH (Ácido Acético Glacial)	30% (v/v)
CH ₃ OH (Metanol)	50% (v/v)

Dissolver em água destilada e completar o volume.

Fazer uma diluição 3:1 de TA com β-mercaptoetanol. Adicionar em cada amostra um quinto do volume final da amostra. Ferver (100°C) a amostra por 3 minutos e imediatamente aplicar no gel (SDS-PAGE).

8.3.4.6 – TAMPÃO DE ELETROFORESE DE PROTEÍNA

Tris base	25 mM
Glicina	19 mM
SDS	0,1% (p/v)

Dissolver em água ultrapura e acertar o volume final.

8.3.5 – Soluções para *Southern Blotting***8.3.5.1 – TAMPÃO CITRATO DE SÓDIO (SSC) 2X**

NaCl	300 mM
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ .2H ₂ O	30 mM pH 7,0

8.3.5.2 –TAMPÃO DE HIBRIDIZAÇÃO *AlkPhos* (GE Healthcare Life Sciences)

NaOH	0,5 M
Blocking reagent	4% (p/v)

8.3.5.3 – TAMPÃO DE LAVAGEM – PRIMÁRIO *AlkPhos* (GE Healthcare Life Sciences)

Uréia	2 M
SDS	0,1% (p/v)
NaH ₂ PO ₄ pH7,0	50 mM
MgCl ₂	1 mM
Blocking Reagent	0,2% (p/v)

8.3.5.4 – TAMPÃO DE LAVAGEM – SECUNDÁRIO *AlkPhos* (GE Healthcare Life Sciences)

Tris base	50 mM
NaCl	10 mM
MgCl ₂ , pH10,0	2 mM

8.3.6 – Soluções para *Western Blotting*

8.3.6.1 – TAMPÃO TBST (10X)

Tris-HCl	100 mM
NaCl	300 mM
Tween – 20	0,5% (v/v)

8.3.6.2 – TAMPÃO DE TRANSFERÊNCIA

Tris base	250 mM
Glicina	2,5 M
SDS	0,1 % (p/v)
Etanol Absoluto	18,5% (v/v)

8.3.6.3 – PONCEAU 0,5%

Ponceau	0,5% (p/v)
TCA	3% (v/v)

8.3.6.4 – TAMPÃO SALINA – FOSFATO (PBS)

NaCl	350 mM
KCl	180 mM
Na ₂ HPO ₄	25 mM
KH ₂ PO ₄	18 mM

Dissolver em água destilada, acertar o pH 7,4 e completar para o volume final.

Figura suplementar 1: Via de integridade da parede celular. GEF, *guanine nucleotide exchange factor*; GTPase, *guanosina trifosfatase*; MAPK, *mitogen activated protein kinases*; RE, *retículo endoplasmático*; CG, *complexo de golgi*. Adaptado de Malavazi *et al.*, 2014.

Figura suplementar 2: Via biossintética do mevalonato e ergosterol. CoA, coenzima A; HMG-CoA, 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A; VOR, voriconazol; AMB, anfotericina B. Adaptado de Onyewu *et al.*, 2003.

Figura suplementar 3: Via biossintética dos esfingolipídios. Adaptado de Fornarotto *et al.*, 2006.