UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Análise molecular da anidrase carbônica no fungo patogênico humano *Aspergillus fumigatus*

Heliara Maria Spina Canela

Ribeirão Preto

2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Análise molecular da anidrase carbônica no fungo patogênico humano *Aspergillus fumigatus*

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientada: Heliara Maria Spina Canela

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Márcia Eliana da Silva Ferreira Balieiro

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia em 05/11/2013. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP

Ribeirão Preto
2013

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.

Canela, Heliara Maria Spina

Análise molecular da anidrase carbônica no fungo patogênico humano *Aspergillus fumigatus*. Ribeirão Preto, 2013.

79 p.: il.; 30cm.

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

Orientadora: Balieiro, Márcia Eliana da Silva Ferreira

1. *Aspergillus fumigatus*. 2. Anidrases carbônicas. 3. Análise da expressão gênica. 4. Aspergilose invasiva. 5. Análise da virulência, 6. *cipC*

FOLHA DE APROVAÇÃO

Heliara Maria Spina Canela

Análise molecular da anidrase carbônica no fungo patogênico humano *Aspergillus fumigatus*.

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Márcia Eliana da Silva Ferreira Balieiro

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico

Aos meus pais, pelos ensinamentos, amor, confiança e apoio.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por orientar meu caminho nas horas de dificuldade.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Márcia Eliana da Silva Ferreira Balieiro, pelo acolhimento de “última hora”, pela oportunidade, pelos ensinamentos transmitidos e incentivos, que tornaram possível a conclusão dessa dissertação.

Aos meus pais, pelo apoio, amor e dedicação.

Ao meu namorado, Leopoldo, pelo apoio, paciência e amor.

Ao meu irmão, Renan, e minha família, pelo apoio e bons momentos.

Às minhas companheiras de casa, Miliane Rodrigues Frazão e Renata Reis, pelos momentos de alegria e as ótimas ideias.

Às amigas do laboratório, Rebeca Cantelmo e Mariane Vergílio, pela ótima convivência e pela ajuda.

Aos técnicos Luciano Akira Takami e Ludimilla Tonani, pela ótima convivência e ajuda inestimável em várias etapas do trabalho.

À CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – pela bolsa de mestrado concedida.

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – e ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – pelo auxílio financeiro.

Aos Professores Gustavo Henrique Goldman, Juliana Pfrimer Falcão e Vitor Hugo Aquino Quintana, pela disponibilização de equipamentos e de laboratórios.

À Jaqueline Moisés Tobal, pela ajuda “à distância”.

Ao Roberto Souza, pela ajuda com o aparelho de qPCR.

À Adriana Soares, pela ajuda com o aparelho Bioanalyzer.

À Laura Vieira, pela ajuda com as análises estatísticas.

Aos alunos e técnicos do laboratório do Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman: Ana Cristina Colabardini, Nádia Krohn, Neil Brown, Paula Fagundes, Thaila Reis, Wagner de Souza, Livia Marangoni, Marcela Savoldi e Paulo de Carvalho, pela ajuda em diversos experimentos e, principalmente, Enyara Rezende Moraes, Lizziane Kretli Winkelströter, Patrícia Alves de Castro e Vinícius Leite pela ajuda com os testes de virulência.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e todos os seus professores e funcionários.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

“Nada como procurar quando se quer achar alguma coisa. Quando se procura geralmente se encontra alguma coisa, sem dúvida, mas nem sempre o que estávamos procurando”.

(J.R.R. Tolkien)

RESUMO

CANELA, H.M.S. **Análise molecular da anidrase carbônica no fungo patogênico humano *Aspergillus fumigatus***. 2013. 79 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

O fungo *Aspergillus fumigatus* é o segundo maior causador de infecções fúngicas invasivas em pacientes imunocomprometidos e a principal espécie causadora da aspergilose invasiva, doença de alta taxa de mortalidade que atinge principalmente os pulmões e que pode se disseminar pelo organismo. Durante o processo de infecção, o fungo precisa adaptar-se ao organismo do hospedeiro e um dos obstáculos encontrados é a mudança na concentração de dióxido de carbono (CO₂), que, de 0,033% no ambiente, chega a até 6% no interior do hospedeiro. As anidrases carbônicas são enzimas envolvidas na hidratação reversível do CO₂ e já foram apontadas como importantes na virulência de patógenos como *Plasmodium falciparum*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori*, *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans*. Esse trabalho teve como objetivo avaliar o papel da enzima anidrase carbônica no desenvolvimento e virulência do fungo *A. fumigatus*, que apresenta quatro homólogos desta enzima (*cafA*, *cafB*, *cafC* e *cafD*). Para isso, foram utilizadas linhagens de *A. fumigatus* com os homólogos da enzima deletados ($\Delta cafA$, $\Delta cafB$, $\Delta cafC$, $\Delta cafD$ e $\Delta cafA\Delta cafB$) e a linhagem selvagem ($\Delta akuB^{ku80}$), da qual foram originadas as mutantes. Foram realizadas avaliações fenotípicas da estrutura dos conidióforos das diferentes linhagens, determinação da sensibilidade frente a diferentes agentes estressantes (antifúngicos, promotores de apoptose, estresse iônico, nitroativo, oxidativo, e de parede celular) e determinação da expressão gênica global em diferentes concentrações de CO₂. Foi verificado que a deleção de cada um dos homólogos da anidrase carbônica de *A. fumigatus* não interfere na estrutura dos conidióforos deste fungo. Por outro lado, a deleção induziu alteração da sensibilidade do fungo frente a alguns compostos estressantes (ácido acético e peróxido de hidrogênio). Ainda, a análise da expressão gênica revelou um gene envolvido na adaptação do fungo ao aumento da concentração de CO₂, o gene *cipC*, que não apresenta homólogos nas células de mamíferos. Este gene foi caracterizado neste trabalho por meio de sua deleção na linhagem selvagem ($\Delta akuB^{ku80}$) de *A. fumigatus* e avaliação fenotípica microscópica e de sensibilidade a agentes estressantes (antifúngicos, promotores de apoptose, estresse iônico, nitroativo, oxidativo, e de parede celular). A deleção do gene não interferiu na estrutura do fungo, porém aumentou sua sensibilidade a alguns compostos (calcoflúor e menadiona). Foram realizados, ainda, testes de virulência em modelo animal utilizando-se o mutante $\Delta cipC$, os quais revelaram que a deleção deste gene atenua a virulência do fungo. Assim, foi possível concluir que as anidrases carbônicas não são relevantes para o desenvolvimento e virulência de *A. fumigatus*;

porém, este fungo modifica a expressão de seus genes de modo a adaptar-se às variações na concentração atmosférica de CO₂. O gene *cipC* está envolvido nesse processo de adaptação e é importante para o desenvolvimento do fungo e sua virulência, tornando-se um alvo para o estudo de novas terapias para o tratamento da aspergilose invasiva.

Palavras-chave: 1. *Aspergillus fumigatus*. 2. Anidrases carbônicas. 3. Análise da expressão gênica. 4. Aspergilose invasiva. 5. Análise da virulência. 6. *cipC*.

ABSTRACT

CANELA, H.M.S. **Molecular analysis of carbonic anhydrase in the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus***. 2013. 79 f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

The fungus *Aspergillus fumigatus* is the second cause of fungal infections in immunocompromised patients and it is the main specie which causes invasive aspergillosis, a disease with high mortality rate that mainly affects the lungs and it can spread through the body. During the infectious process, the fungus must adapt to the host and one of the obstacles is the drastic change of the carbon dioxide (CO₂) concentration, which is 0.033% in the environment and until 6% inside the host. The carbonic anhydrases are enzymes which are involved in the reversible hydration of carbon dioxide and they have been pointed as important in the virulence of pathogens such as *Plasmodium falciparum*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori*, *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*. This work aimed to evaluate the role of the enzyme carbonic anhydrase in the development and virulence of the fungus *A. fumigatus*, which has four homologues of this enzyme (*cafA*, *cafB*, *cafC* e *cafD*). Therefore, strains, which have the homologues of the enzyme deleted ($\Delta cafA$, $\Delta cafB$, $\Delta cafC$, $\Delta cafD$ and $\Delta cafA\Delta cafB$) were used in parallel with the wild strain ($\Delta akuB^{ku80}$), which originated the mutant ones. We did structure phenotypic evaluations of the different strains of conidiophores, sensibility determination against different stressors (antifungal agents, apoptosis, ionic, nitrosative, oxidative, and cell wall stress promoters) and global gene expression determination at different carbon dioxide concentrations. It was verified that the carbonic anhydrases homologues deletion of *A. fumigatus* did not interfere on the structure (conidiophore) of this fungus, in the tested conditions. On the other hand, the deletion caused a change in sensibility of the fungus against some stressors (acetic acid and hydrogen peroxide). The gene expression experiments showed a gene involved in the adaptation to the increase of CO₂ concentration, the *cipC* gene. This gene does not have homologues in the mammalian cells. The *cipC* gene was characterized in this work by its deletion in the *A. fumigatus* wild strain ($\Delta akuB^{ku80}$) and microscopic phenotypic evaluation and sensibility tests against stressors (antifungal agents, apoptosis, ionic, nitrosative, oxidative, and cell wall stress promoters). The gene deletion did not interfere on the fungus conidiophore structure but increase its sensibility to some compounds (calcoflúor white and menadione). Virulence tests in animal model using the $\Delta cipC$ mutant were done and they showed that the deletion of this gene attenuates the fungus virulence. In conclusion, the carbonic anhydrases are not relevant to development and virulence of the fungus, which modifies the gene expression to adapt to the variations of atmospheric CO₂ concentration. Besides, the *cipC* gene seems to be involved in this adaptation

process. Moreover, the *cipC* gene showed to be important to the development of the fungus and its virulence, which makes the gene a target for the study of new therapies for the treatment of invasive aspergillosis.

Keywords: 1. *Aspergillus fumigatus*. 2. Carbonic anhydrases. 3. Genic expression analysis. 4. Invasive aspergillosis. 5. Virulence analysis. 6. *cipC*

RESUMEN

CANELA, H.M.S. **El análisis molecular de la anhidrasa carbónica en el hongo patógeno humano *Aspergillus fumigatus*. 2013.** 79 f. Disertación (Maestría). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

El hongo *Aspergillus fumigatus* es el segundo mayor causador de infecciones fúngicas invasivas en pacientes inmunocomprometidos y es la principal especie causadora de la aspergilose invasiva, enfermedad de alto índice de mortalidad que atinge principalmente los pulmones y que puede diseminarse por el organismo. Durante el proceso de infección el hongo necesita adaptarse al organismo del hospedero y uno de los obstáculos encontrados es la mudanza drástica en la concentración de bióxido de carbono (CO₂), que, de 0,033% en el ambiente, llega hasta 6% en el interior del hospedero. Las anhidrasas carbónicas son enzimas envueltas en la hidratación reversible del bióxido de carbono y ya fueron apuntadas como importantes en la virulencia de patógenos como *Plasmodium falciparum*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori*, *Cryptococcus neoformans* y *Candida albicans*. Esta monografía tiene como objetivo evaluar la función de la enzima anhidrasa carbónica en el desarrollo y la virulencia del hongo *A. fumigatus* que presenta cuatro homólogos de esta enzima (*cafA*, *cafB*, *cafC* y *cafD*). Para esto fueron utilizados linajes con los homólogos de las enzimas deletadas ($\Delta cafA$, $\Delta cafB$, $\Delta cafC$, $\Delta cafD$ e $\Delta cafA\Delta cafB$) y la linaje salvaje ($\Delta akuB^{ku80}$) del cual fueron originadas las linajes mutantes. Fueron realizadas evaluaciones fenotípicas de la estructura de los conidióforos de las diferentes linajes, determinación de la sensibilidad frente a los diferentes agentes estresantes (antifúngicos, promotores de la apoptosis, estrés iónico, nitroativo, oxidativo, y de la pared celular) y determinación de la expresión génica global en diferentes concentraciones de CO₂. Fue verificado que la delección de cada uno de los homólogos de la anhidrasa carbónica de *A. fumigatus* no interfirió en la estructura del conidióforo de este hongo en las condiciones testadas. Por otro lado, a delección indujo una alteración en la sensibilidad del hongo frente algunos compuestos estresantes (ácido acético y peróxido de hidrógeno). Aun, los experimentos de expresión génica revelaron un gen envuelto en la adaptación del hongo al aumento de la concentración de CO₂, el gen *cipC*. Este gen no presenta homólogos en las células de mamíferos y fue caracterizado en este trabajo por medio de la delección del gen en la linaje salvaje ($\Delta akuB^{ku80}$) de *A. fumigatus* y evaluación fenotípica microscópica y de sensibilidad a agentes estresantes (antifúngicos, promotores de la apoptosis, estrés iónico, nitroativo, oxidativo, y de la pared celular). La delección del gen no interfirió en la estructura del hongo más, aumento su sensibilidad a algunos compuestos (calcoflúor y menadiona). Fueron realizados, todavía, pruebas de virulencia en modelo animal utilizándose el mutante $\Delta cipC$, que revelaron que la delección de este gen atenúa la virulencia del hongo. Así

fue posible concluir que, en las condiciones testadas, las anhidrasas carbónicas no son relevantes para el desenvolvimiento y virulencia del hongo; sin embargo, el hongo modifica la expresión de sus genes de un modo que le permite adaptarse a las variaciones en la concentración atmosférica de CO_2 y el gen *cipC* parece estar envuelto en este proceso. Más allá de esto, el gen *cipC* mostro ser importante para el desenvolvimiento del hongo y su virulencia, lo cual lo torna un potencial objetivo para el estudio de nuevas terapias para el tratamiento de la aspergilose invasiva.

Palabras clave: 1. *Aspergillus fumigatus*. 2. Anhidrasa carbónicas. 3. Análisis de la expresión genética. 4. Aspergilose invasiva. 5. Análisis de la virulencia. 6. *cipC*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Evolução da aspergilose invasiva em pulmão de coelho	3
Figura 2 -	Representação esquemática da distribuição das linhagens e suas concentrações nas placas de Petri nos testes de “Drop-out”	18
Figura 3 -	Representação esquemática do vetor pRS426.....	28
Figura 4 -	Representação esquemática da construção do cassete de deleção em <i>S. cerevisiae</i>	28
Figura 5 -	Conidióforos de diferentes linhagens com os homólogos da enzima anidrase carbônica deletados e a linhagem selvagem, $\DeltaakuB^{ku80}$, observados ao microscópio óptico (40x). Fotos obtidas em microcultivo incubado em concentrações ambientais (0,033%) de CO ₂ , durante 48 horas.....	35
Figura 6 -	Conidióforos de diferentes linhagens com os homólogos da enzima anidrase carbônica deletados e a linhagem selvagem, $\DeltaakuB^{ku80}$, observados ao microscópio óptico (40x). Fotos obtidas em microcultivo incubado em 5% de CO ₂ , durante 48 horas	35
Figura 7 -	Efeito do promotor de apoptose, ácido acético (25 mM) sobre o crescimento radial das linhagens mutantes $\Delta cafA$ (A), $\Delta cafB$ (B), $\Delta cafC$ (C), $\Delta cafD$ (D), $\Delta cafA\Delta cafB$ (E) e da linhagem selvagem $\DeltaakuB^{ku80}$ (F).....	36
Figura 8 -	Efeito do promotor de estresse oxidativo, peróxido de hidrogênio (2,5 mM) sobre o crescimento radial das linhagens mutantes $\Delta cafA$ (A), $\Delta cafB$ (B), $\Delta cafC$ (C), $\Delta cafD$ (D), $\Delta cafA\Delta cafB$ (E) e da linhagem selvagem $\DeltaakuB^{ku80}$ (F)	37

- Figura 9 -** Efeito dos antifúngicos (1) anfotericina B (0,1 µg/mL), (2) anidulafungina (10 ng/mL), (3) cetoconazol (4 µg/mL), (4) fluconazol (300 µg/mL), (5) itraconazol (1,5 µg/mL), (6) nistatina (3,5 UI/mL) e (7) terbinafina (0,2 µg/mL) sobre o crescimento radial das linhagens mutantes $\Delta cafA$ (A), $\Delta cafB$ (B), $\Delta cafC$ (C), $\Delta cafD$ (D), $\Delta cafA\Delta cafB$ (E) e da linhagem selvagem $\Delta akuB^{Ku80}$ (F)..... 38
- Figura 10 -** Efeito dos agentes promotores de estresse iônico (1) $CaCl_2$ (400 mM), (2) $MgSO_4$ (400 mM) e (3) NaCl (500 mM) sobre o crescimento radial das linhagens mutantes $\Delta cafA$ (A), $\Delta cafB$ (B), $\Delta cafC$ (C), $\Delta cafD$ (D), $\Delta cafA\Delta cafB$ (E) e da linhagem selvagem $\Delta akuB^{Ku80}$ (F)..... 39
- Figura 11 -** Efeito dos agentes promotores de estresse de parede celular (1) calcoflúor (20 µg/mL), (2) vermelho congo (75 µg/mL) e (3) SDS (0,01%) sobre o crescimento radial das linhagens mutantes $\Delta cafA$ (A), $\Delta cafB$ (B), $\Delta cafC$ (C), $\Delta cafD$ (D), $\Delta cafA\Delta cafB$ (E) e da linhagem selvagem $\Delta akuB^{Ku80}$ (F) 40
- Figura 12 -** Efeito do promotor de estresse nitroativo, nitroprussiato de sódio (0,3 mM) sobre o crescimento radial das linhagens mutantes $\Delta cafA$ (A), $\Delta cafB$ (B), $\Delta cafC$ (C), $\Delta cafD$ (D), $\Delta cafA\Delta cafB$ (E) e da linhagem selvagem $\Delta akuB^{Ku80}$ (F) 41
- Figura 13 -** Efeito dos promotores de estresse oxidativo (1) menadiona (10 µM) e (2) paraquat (2,5 mM) sobre o crescimento radial das linhagens mutantes $\Delta cafA$ (A), $\Delta cafB$ (B), $\Delta cafC$ (C), $\Delta cafD$ (D), $\Delta cafA\Delta cafB$ (E) e da linhagem selvagem $\Delta akuB^{Ku80}$ (F) 42
- Figura 14 -** Linhagem analisada ao microscópio óptico durante a padronização 43
- Figura 15 -** PCR para confirmação da deleção do gene *cipC* na linhagem selvagem $\Delta akuB^{Ku80}$, por diferença de tamanho 48

Figura 16 -	PCR para confirmação da deleção do gene <i>cipC</i> na linhagem selvagem $\DeltaakuB^{ku80}$	48
Figura 17 -	Conidióforos das linhagens mutante, $\Delta cipC$ (A), e selvagem, $\DeltaakuB^{ku80}$ (B) , observados ao microscópio óptico (40x). Fotos obtidas em microcultivo incubado em concentrações ambientais (0,033%) de CO ₂ , durante 48 horas	49
Figura 18 -	Conidióforos das linhagens mutante, $\Delta cipC$ (A), e selvagem, $\DeltaakuB^{ku80}$ (B), observados ao microscópio óptico (40x). Fotos obtidas em microcultivo incubado em 5% de CO ₂ , durante 48 horas	50
Figura 19 -	Efeito do promotor de apoptose, ácido acético (20 mM) sobre o crescimento radial da linhagem mutante $\Delta cipC$ (A) e da linhagem selvagem $\DeltaakuB^{ku80}$ (B)	51
Figura 20 -	Efeito do promotor de estresse de parede celular, calcoflúor (20 µg/mL) sobre o crescimento radial da linhagem mutante $\Delta cipC$ (A) e da linhagem selvagem $\DeltaakuB^{ku80}$ (B)	51
Figura 21 -	Efeito do promotor de estresse oxidativo, menadiona (10 µM) sobre o crescimento radial da linhagem mutante $\Delta cipC$ (A) e da linhagem selvagem $\DeltaakuB^{ku80}$ (B)	52
Figura 22 -	Efeito dos antifúngicos, (1) anfotericina B (0,1 µg/mL), (2) anidulafungina (10 ng/mL), (3) cetoconazol (4 µg/mL), (4) fluconazol (300 µg/mL), (5) itraconazol (1,5 µg/mL), (6) nistatina (3,5 UI/mL) e (7) terbinafina (0,2 µg/mL) sobre o crescimento radial da linhagem mutante $\Delta cipC$ (A) e da linhagem selvagem $\DeltaakuB^{ku80}$ (B)	53

- Figura 23 -** Efeito dos agentes promotores de estresse iônico, (1) CaCl_2 (400 mM), (2) MgSO_4 (400 mM) e (3) NaCl (500 mM) sobre o crescimento radial da linhagem mutante $\Delta cipC$ (A) e da linhagem selvagem $\Delta akuB^{Ku80}$ (B) 54
- Figura 24 -** Efeito dos agentes promotores de estresse de parede celular, (1) vermelho congo (75 $\mu\text{g/mL}$) e (2) SDS (0,0075%) sobre o crescimento radial da linhagem mutante $\Delta cipC$ (A) e da linhagem selvagem $\Delta akuB^{Ku80}$ (B) 55
- Figura 25 -** Efeito do agente promotor de estresse nitroativo, nitroprussiato de sódio (0,3 mM) sobre o crescimento radial da linhagem mutante $\Delta cipC$ (A) e da linhagem selvagem $\Delta akuB^{Ku80}$ (B)..... 55
- Figura 26 -** Efeito dos agentes promotores de estresse oxidativo, (1) H_2O_2 (2 mM) e (2) paraquat (2,5 mM) sobre o crescimento radial da linhagem mutante $\Delta cipC$ (A) e da linhagem selvagem $\Delta akuB^{Ku80}$ (B)..... 56

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1-	Valores de expressão dos experimentos de “microarray” e qPCR.....	47
Gráfico 2 -	Curva de sobrevivência relativa aos testes de virulência em modelo animal	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Linhagens utilizadas no trabalho	16
Tabela 2 -	Agentes utilizados nos testes de sensibilidade	18
Tabela 3 -	Detalhes das sondas utilizadas nos ensaios de qPCR	26
Tabela 4 -	“Primers” utilizados para deleção e confirmação da deleção do gene Afu5g09330 (<i>cipC</i>)	27
Tabela 5 -	Padronização dos tempos de incubação para extração de RNA...	43
Tabela 6 -	Genes diferencialmente expressos quando o fungo é exposto a concentrações elevadas de CO ₂ (5%)	44
Tabela 7 -	Genes diferencialmente expressos quando o fungo é exposto a concentrações diminuídas de CO ₂ (0,033%)	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cDNA	DNA complementar
CoA	Coenzima A
cRNA	RNA complementar
C_T	“Cycle Threshold”
Cy	“Cyanine”
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfato
EDTA	Ácido Etilenodiaminatetracético
Fw	“Forward”
GABA	Ácido gama-aminobutírico
LB	Luria Bertani
MES	Ácido 2-morfolinoetanossulfônico
MFS	“Major Facilitator Superfamily”
MM	Meio Mínimo
mRNA	RNA mensageiro
ORF	“Open Reading Frame”
PBS	“Phosphate Buffered Saline”
PCR	“Polymerase Chain Reaction”
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial Hidrogeniônico
pyrG	Orotidina-5'-fosfato descarboxilase
qPCR	PCR quantitativo
RNA	Ácido Ribonucléico
Rv	“Reverse”
SC URA⁻	Meio de cultura para <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sem uridina e uracila
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TE	Tampão Tris-EDTA
TRIS	Tris-(hidroximetil)-aminometano

USP (padrão)	Farmacopeia Americana
UTR	“Untranslated Region”
YAG	“Yeast Agar Glucose”
YG	“Yeast Glucose”
YPD	“Yeast Peptone Dextrose”
YUU	Meio YAG suplementado com uridina e uracila

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
%	Por cento
+	Positivo ou sinal de adição
-	Negativo ou sinal de subtração
↔	Equação química reversível
®	Marca registrada
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
δ	Delta
ζ	Zeta
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
μM	Micromolar
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
Cd (II)	Íon cádmio bivalente
cm ³	Centímetro cúbico
Co (II)	Íon cobalto bivalente
CO ₂	Dióxido de carbono
Fe (II)	Íon ferroso
H ⁺	Íon hidrogênio
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
HCO ₃ ⁻	Íon bicarbonato
Kb	Kilobase
Kg	Kilograma
Kgf	Kilograma-força

KOH	Hidróxido de potássio
m ³	Metro cúbico
M	Molar
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
pb	Pares de base
pmol	picomol
p/v	Partes por volume
rpm	Rotações por minuto
spp.	Espécies
v/v	Volume por volume
x	Sinal de multiplicação
xg	Gravidade
Zn (II)	Íon zinco bivalente

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	iii
RESUMEN.....	v
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE GRÁFICOS	xi
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xiii
LISTA DE SÍMBOLOS	xv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Aspergillus fumigatus</i>	2
1.2 Anidrases carbônicas.....	5
1.3 O gene <i>cipC</i>	7
1.4 Microcultivo.....	8
1.5 Teste de sensibilidade por “drop-out”	8
1.6 “Microarray” de cRNA	9
1.7 PCR em tempo real	9
1.8 Deleção gênica.....	10
1.9 Testes de virulência em animais	11
1.10 Justificativa do trabalho.....	11
2. OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivos específicos	14
3. MATERIAS E MÉTODOS.....	15
3.1 Linhagens de <i>A. fumigatus</i>	16
3.2 Protocolos adotados	16
3.2.1 Suspensão de conídios	16
3.2.2 Microcultivo.....	17
3.2.3 Testes de sensibilidade por “drop-out”	17
3.2.4 “Microarray”	19
3.2.4.1 Padronização dos tempos de incubação	19

3.2.4.2	Extração do RNA.....	19
3.2.4.3	Obtenção de cDNA, hibridização e leitura das lâminas de “microarray”	21
3.2.4.4	Análise dos resultados de “microarray”	23
3.2.5	Extração de DNA genômico de <i>A. fumigatus</i>	23
3.2.6	Eletroforese de DNA em gel de agarose	24
3.2.7	Obtenção de cDNA	25
3.2.8	PCR em tempo real	25
3.2.9	Deleção gênica.....	26
3.2.9.1	Construção do cassete de deleção	27
3.2.9.2	Transformação em <i>A. fumigatus</i>	32
3.2.10	Testes de virulência em camundongos	33
4.	RESULTADOS	34
4.1	Microcultivo.....	35
4.2	Testes de sensibilidade por “drop-out”	36
4.3	“Microarray”	42
4.4	PCR em tempo real	46
4.5	Deleção gênica.....	47
4.6	Caracterização do gene <i>cipC</i>	49
4.6.1	Caracterização microscópica (microcultivo)	49
4.6.2	Testes de sensibilidade por “drop-out”	50
4.6.3	Testes de virulência.....	56
5.	DISCUSSÃO	58
6.	CONCLUSÕES.....	65
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
	ANEXOS	74

1.1 *Aspergillus fumigatus*

O gênero *Aspergillus* compreende mais de 250 espécies que podem produzir produtos úteis no dia a dia, serem utilizadas em processos biotecnológicos ou como modelo para estudos de biologia celular e genética de células eucarióticas, contaminar alimentos e produzir toxinas e, finalmente, causar doenças, como *A. fumigatus* (GIBBONS; ROKAS, 2013).

As espécies patogênicas podem causar diversas patologias como aspergilose broncopulmonar alérgica, aspergilose pulmonar crônica, sinusite e aspergilose invasiva, que é a patologia mais severa (FORTÚN et al., 2012; LÓPEZ-CORTÉS et al., 2012).

A aspergilose invasiva ocorre quando os conídios do fungo são inalados por pessoas imunodeprimidas e não são eliminados pelo sistema imune ineficaz. Isto que permite que o fungo se aloje no pulmão e suas hifas se desenvolvam e destruam os tecidos, causando isquemia e infarto, podendo atingir a corrente sanguínea e se espalhar para outros órgãos. A doença atinge principalmente pacientes portadores de neoplasias hematológicas, transplantados de órgãos sólidos e transplantados de medula óssea. Embora o uso de voriconazol tenha trazido melhoras aos pacientes, a mortalidade da doença ainda é alta e varia de 60 a 90% (ABAD et al., 2010; ASARE et al., 2013; BARKER et al., 2012; FORTÚN et al., 2012; STEINBACH et al., 2012).

Por ser a principal porta de entrada do fungo, o trato respiratório e, principalmente, os pulmões, são as partes mais atingidas. Entretanto, em 3 a 7% dos casos, a doença atinge outras partes do corpo, como coração e sistema nervoso central, podendo também causar fungemia (LÓPEZ-CORTÉS et al., 2012; STEINBACH et al., 2012). A aspergilose invasiva também pode ser adquirida durante cirurgias e, nesses casos, a doença atinge o local do corpo que sofreu a intervenção cirúrgica (LÓPEZ-CORTÉS et al., 2012).

A evolução da aspergilose invasiva é rápida. Através de cortes anatomopatológicos é possível visualizar infiltrados inflamatórios de 8 a 24 horas após a infecção de coelhos com conídios do fungo; hifas aparecem de 8 a 16 horas após a infecção e de 24 a 96 horas há uma progressiva extensão das hifas,

acompanhada de inflamação, o que pode ser visualizado na Figura 1 (HOPE et al., 2010).

Figura 1. Evolução da aspergilose invasiva em pulmão de coelho (adaptado de HOPE et al., 2010).

Embora seja raro, pacientes imunocompetentes também podem adquirir a aspergilose invasiva. Também já foram relatados casos de colonização por *Aspergillus* spp. em portadores de câncer no sistema respiratório (ASARE et al., 2013; NILSSON; RESTREPO; JAGIRDAR, 2013).

O diagnóstico da doença é difícil devido à baixa sensibilidade dos métodos existentes. Existem três classificações de infecção: possível, provável e provada, determinadas com base na doença pré-existente, exames clínicos, incluindo exames radiológicos, e exames microbiológicos e histológicos (FORTÚN, et al., 2012).

Nos últimos anos, o número de pessoas imunocomprometidas aumentou devido aos avanços alcançados no transplante de órgãos, tratamentos de câncer e doenças como a AIDS. Sendo assim, a incidência das infecções fúngicas

aumentou drasticamente; porém, o desenvolvimento de novos antifúngicos não acompanhou esse crescimento. Assim, o tratamento da aspergilose invasiva ainda é um desafio: o fármaco mais utilizado é o voriconazol, embora o uso de anfotericina B também seja muito frequente; a anfotericina B lipossomal e a caspofungina também são utilizadas. O voriconazol pode causar danos hepáticos, quando interage com outros medicamentos e já foram relatadas linhagens resistentes a esse antifúngico. Sabe-se que a anfotericina B é nefrotóxica e pode complicar ainda mais o estado do paciente, que, por ser imunossuprimido, já se encontra debilitado. As equinocandinas, como a caspofungina, são eficientes, porém, apresentam alto custo e casos de resistência a esses antifúngicos já foram relatados (FORTÚN et al., 2012; LÓPEZ-CORTÉS et al., 2012).

Dentre as espécies causadoras da aspergilose invasiva, destaca-se *A. fumigatus*, a principal espécie causadora da aspergilose invasiva, sendo responsável por 50 a 90% dos casos, incidência que varia com os anos; e é a segunda espécie que mais causa infecções fúngicas invasivas em pacientes imunocomprometidos, atrás somente da levedura *Candida albicans* (GIBBONS; ROKAS, 2013; STEINBACH, et al., 2012).

O fungo *A. fumigatus* apresenta colônias brancas de textura algodonosa, que desenvolvem coloração cinza esverdeada e textura veludosa com o passar dos dias de cultivo. Apresenta conidióforo liso, constituído por vesículas hemiesféricas que tem seus três quartos superiores ocupados por fiálides com conídios globulosos (SIDRIM; ROCHA, 2004).

A predominância de *A. fumigatus* se deve às diversas características que o auxiliam na colonização e não a um fator de virulência isolado. O fungo apresenta ampla distribuição no meio ambiente (1 a 100 conídios/m³ no ambiente), termotolerância (resiste a até 75°C), conídios de pequeno tamanho (2-3 µm) que apresentam superfície hidrofóbica, resistência ao estresse oxidativo e toxinas (ABAD et al., 2010; KUBITSCHECK-BARREIRA et al., 2013; WEZENSKY; CRAMER, 2011).

Para que a colonização do hospedeiro se realize, o fungo deve se adaptar rapidamente ao microambiente encontrado no interior do hospedeiro. Estudos mostraram que, para que essa colonização se efetue, o fungo modifica a expressão de cerca de 2200 genes envolvidos em diversas funções, dentre elas o

transporte de ferro e aminoácidos, proteólise, catabolismo de carboidratos e resposta ao estresse oxidativo. Os genes que estão envolvidos com a resposta às espécies reativas de oxigênio são os que mais apresentam sua expressão aumentada. Além do estresse oxidativo, o fungo também tem que lidar com a diferença na temperatura, mudanças de pH, disponibilidade de nutrientes, hipóxia e aumento da concentração de dióxido de carbono, que, no ambiente é de 0,033% e no interior do hospedeiro chega a 6%. O fungo *A. fumigatus* apresenta a capacidade de se desenvolver em concentrações de até 0,1% de oxigênio, porém, não tem a habilidade de se desenvolver em ambientes anaeróbios, já que necessita da cadeia respiratória para a germinação dos conídios e posterior infecção (HAN et al., 2010; HARTMANN et al., 2011; WEZENSKY; CRAMER, 2011).

Dadas às dificuldades de diagnóstico e tratamento e altas taxas de incidência e mortalidade, existe a necessidade de se desenvolver novas terapias e tratamentos para essa doença tão perigosa. Para isso, o entendimento da fisiologia e patogênese do fungo é fundamental, visto que aponta alvos terapêuticos e possíveis estratégias de diagnóstico (KUBITSCHECK-BARREIRA, et al, 2013).

O genoma de *A. fumigatus* foi sequenciado em 2005 e sabe-se que o fungo apresenta 8 cromossomos e cerca de 9922 sequências codificadoras de proteínas. O sequenciamento do genoma foi um enorme passo no estudo do fungo e possibilitou o uso de metodologias úteis e confiáveis para o entendimento de mecanismos utilizados durante a evolução da patologia, como o “microarray”, PCR em tempo real, deleção de genes, entre outros (KNIEMEYER et al., 2011; NIERMAN et al., 2005).

1.2 Anidrases carbônicas

O dióxido de carbono (CO₂) é uma pequena molécula que é gerada em decorrência do processo de respiração. Também é um nutriente, um fator de sensoriamento e um componente do ciclo do carbono. No ambiente é encontrado em baixas concentrações, 0,033%, porém, atinge altas concentrações em diversos tecidos. O CO₂ sofre uma interconversão para bicarbonato, através da

reação espontânea $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3 \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$, porém, esta reação ocorre lentamente. Existe uma família de enzimas, chamadas anidrases carbônicas, que catalisam essa interconversão com eficiência. Essa família ocorre em diversas espécies e é dividida em 5 classes: α , β , γ , δ , ζ ; todas são metaloenzimas que necessitam de íons como cofatores, tais como Zn (II), Fe (II), Co (II) ou Cd (II). A classe α é encontrada em procariotos, fungos, plantas e mamíferos; a β , em bactérias, fungos e plantas; a γ , em arqueobactérias; δ e ζ , em diatomáceas marinhas (ELEUCHE; PÖGGELER, 2010).

As anidrases carbônicas são importantes para o crescimento em concentrações ambientais de CO_2 por fornecerem bicarbonato para várias reações, como aquelas catalisadas por acetil-CoA e piruvato carboxilase (ELEUCHE; PÖGGELER, 2010).

Estudos mostraram que a inibição das anidrases carbônicas dos patógenos *Plasmodium falciparum*, *Mycobacterium tuberculosis*, *C. neoformans*, *C. albicans* e *Helicobacter pylori* interfere no desenvolvimento e na virulência destes patógenos (MORISHITA et al., 2008).

As anidrases carbônicas influenciam no desenvolvimento de *C. albicans* como fungo filamentoso, e sua deleção neste fungo provoca a incapacidade de filamentação em 0,033% de CO_2 , o que impede, por exemplo, que infecções superficiais causadas por esse fungo se tornem invasivas. Em *C. neoformans*, essas enzimas estão relacionadas à produção de ácidos graxos e formação de basidiósporos. Já em *Plasmodium* spp., foi demonstrado que mudanças na concentração de CO_2 afetam a gametogênese. No patógeno *Helicobacter pylori*, as anidrases carbônicas estão envolvidas na manutenção do pH citoplasmático dessa bactéria, o que permite sua sobrevivência no baixo pH estomacal (ELEUCHE; PÖGGELER, 2010; HAN et al., 2010; INNOCENTI et al., 2009; MORISHITA et al., 2008; SCHLICKER et al., 2009).

A primeira anidrase carbônica fúngica foi descoberta na levedura *Saccharomyces cerevisiae* e foi classificada como β ; sua deleção causou a incapacidade de crescimento em concentrações ambientais de CO_2 (ELEUCHE; PÖGGELER, 2010).

A classe β é a principal classe de anidrases carbônicas em fungos, bactérias, plantas e algas. Além disso, estão presentes em diversos organismos patogênicos, mas não em humanos, o que as define como um alvo interessante para novas drogas. As anidrases carbônicas também têm sido alvo de pesquisas com medicamentos para outros fins, como tratamento de glaucoma, desequilíbrio ácido-básico, epilepsia, entre outros (ALMAJAN et al., 2005; INNOCENTI et al., 2009).

O fungo *A. fumigatus* apresenta 4 homólogos da enzima anidrase carbônica: *cafA*, *cafB*, *cafC* e *cafD*, todas da classe β . A localização celular de cada uma delas não foi determinada, porém, análises “in silico” utilizando os programas TargetP e MitoProt II indicaram que as anidrases A e D podem estar localizadas na mitocôndria, enquanto as B e C seriam citosólicas. Os homólogos A e B são constitutivos e, portanto, expressos independentemente de fatores externos; já os homólogos C e D apresentam sua expressão modulada, tendo sua expressão aumentada quando o fungo se depara com altas concentrações de CO₂. A deleção das duas enzimas constitutivas (A e B) por Han e colaboradores (2010) gerou um mutante, $\Delta cafA\Delta cafB$, incapaz de crescer em concentrações ambientes de CO₂ (0,033%), mas capaz de crescer em ambientes com altas concentrações (5%) (HAN et al., 2010).

1.3 O gene *cipC*

O gene *cipC* codifica uma pequena proteína denominada cipC, presente exclusivamente nas hifas do fungo *A. fumigatus*. Homólogos dessa proteína estão presentes exclusivamente em fungos, sendo mais frequentes em fungos filamentosos e menos comuns em fungos leveduriformes. O nome cipC vem de proteína induzida por concanamicina (“concanamycin-induced protein”) porque, em *Aspergillus nidulans*, o homólogo dessa proteína tem sua expressão aumentada em resposta a esse composto (BAUER et al., 2009; CRESPO-SEMPERE et al., 2013).

A função da proteína cipC ainda é desconhecida, porém esta tem sido relacionada com a resposta em situações de estresse, tais como patogênese,

privação de nitrogênio e produção de micotoxinas (CRESPO-SEMPERE et al., 2013).

Em *A. fumigatus*, a proteína cipC é monomérica e citosólica e, diferente do que ocorre em *A. nidulans*, sua expressão não é induzida por concanamicina (BAUER et al., 2009).

A proteína cipC já foi apontada como alvo de estudos de novas drogas por não apresentar homólogos em células de mamíferos, por ser descrita como proteína de resposta ao estresse e por estar presente nas hifas, que são as estruturas que permitem a disseminação do fungo e a destruição de tecidos do hospedeiro (BAUER et al., 2009; KUBITSCHECK-BARREIRA et al., 2013).

1.4 Microcultivo

O microcultivo, também conhecido por técnica de Ridell, permite a visualização da morfologia dos fungos ao microscópio, tornando possível a análise das hifas, conidióforos e conídios. As lâminas produzidas por esse método podem ser armazenadas por longos períodos de tempo (LACAZ et al., 2002).

A técnica pode ser utilizada para fungos filamentosos e leveduriformes e utiliza materiais de baixo custo, como placas de Petri, corantes, meios de cultura e lâminas para microscopia (LACAZ et al., 2002; SIDRIM et al., 2004).

1.5 Teste de sensibilidade por “drop-out”

A técnica de “drop-out” permite a observação da ação de diversos agentes estressantes sobre o crescimento radial do fungo. A técnica consiste na aplicação de suspensões de conídios, de diversas concentrações, em placas de Petri contendo meio de cultura e um agente estressante, para que a ação deste sobre o fungo seja analisada. As substâncias em teste são utilizadas em concentrações subletais e, em uma mesma placa, são testadas diversas linhagens, o que otimiza o processo. Além das placas teste, são feitas placas controle, que contém o solvente do agente, para assegurar que o efeito observado é realmente do agente e não de seu solvente (RAM; KLIS, 2006).

1.6 “Microarray” de cRNA

A técnica de “microarray” de cRNA é muito utilizada por propiciar a análise simultânea da expressão gênica com relativa especificidade e rapidez. Ela pode ser aplicada para fins como comparação da expressão gênica de micro-organismos em duas situações (droga x controle, hipóxia x controle) e comparação da expressão gênica de duas populações de células (células cancerosas x normais). Esses estudos são úteis no desenvolvimento de novas drogas, estudo dos processos moleculares envolvidos em doenças, estudo dos processos de resistências às drogas e até na toxicologia (BARKER et al., 2012; JANUCHOWSKI et al., 2012; KARAKACH et al., 2010; SCHINDLER et al., 2005).

A técnica se baseia na conversão do mRNA em cDNA, sua conversão em cRNA e conjugação a fluoróforos e sua posterior hibridização com sequências de nucleotídeos imobilizadas em uma lâmina, que é lavada e lida em um “scanner” (AGILENT, 2010; JANUCHOWSKI et al., 2012; KARAKACH et al., 2010).

As sequências presentes na lâmina podem corresponder a uma parte ou até ao genoma inteiro de determinada espécie. A conversão em cRNA possibilita que a técnica seja realizada partindo-se de pequenas quantidades de mRNA, sem que se perca a fidelidade dos resultados. Fato vantajoso, já que determinadas amostras não possibilitam a extração de grandes quantidades de mRNA. (KARAKACH et al., 2010; PARK et al., 2004; SCHINDLER et al., 2005).

A análise da expressão gênica é relativa, ou seja, dois cRNAs são utilizados para cada “array” e a sua hibridização sinaliza a mudança na expressão dos genes nas duas amostras. Essas amostras podem ser provenientes de duas situações diferentes às quais o material foi submetido antes da extração do RNA, como um tratamento com droga ou exposição a atmosferas; ou então um tratamento e sua referência (controle) (KARAKACH et al., 2010; PAN, 2002).

1.7 PCR em tempo real

A técnica de PCR em tempo real, também conhecida como PCR quantitativo (qPCR), é baseada na quantificação simultânea à reação de PCR e tem sido utilizada com grande eficiência para a detecção de vírus e bactérias para

diagnóstico, quantificação de fungos no solo e avaliação da expressão gênica. A técnica também é muito útil para a validação de genes apontados em experimentos de “microarray” de DNA e cRNA (CHENG, et al., 2006; LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; PATHAK et al., 2012).

Os “amplicons” são detectados através de fluorescência. Como repórteres inespecíficos, utiliza-se as cianinas assimétricas, como o “SYBR Green”. Como repórteres específicos, existem as sondas, que são sequências de nucleotídeos acopladas a corantes, como as sondas TaqMan (KUBISTA et al., 2006).

1.8 Deleção gênica

O sequenciamento dos genomas dos patógenos e os avanços em técnicas de biologia molecular trouxeram facilidades ao estudo de fatores de virulência dos patógenos. A deleção de um gene permite a visualização do papel deste para a sobrevivência e virulência de determinado organismo e, com isso, elucida e aponta novos alvos para drogas (MOUYNA et al., 2004; TAKAHASHI et al., 2011).

Atualmente, vários estudos utilizam a deleção gênica como ferramenta: camundongos “knockout” são utilizados na caracterização de genes em doenças genéticas e até infecciosas; genes de patógenos são deletados para a elucidação de novos alvos para terapias; além de muitas outras aplicações (BUER; BALLING, 2003; GONDO, 2008; MOUYNA et al., 2004).

A técnica mais comum de deleção é a conhecida como “knockout”, que consiste na substituição do gene a ser deletado por outro, como um gene produtor de nutrientes ou que confere resistência a algum antibiótico. A substituição do gene é feita através da recombinação de um cassete de deleção, que contém o gene que substituirá o gene deletado. A recombinação desse cassete pode ser homóloga ou não, porém, quando esta não é homóloga, o gene inserido não substitui o gene a ser deletado e, portanto, a deleção não tem sucesso (FERREIRA et al., 2006; TAKAHASHI et al., 2011).

Em *A. fumigatus*, os mecanismos de recombinação não-homóloga são mediados pelo heterodímero *Ku70-Ku80*. Ferreira e colaboradores (2006) deletaram o gene *Ku80* e geraram o mutante $\DeltaakuB^{ku80}$, que apresenta melhor taxa de recombinação homóloga, facilitando, assim, a realização da técnica de

“knockout” e estudos que necessitam da deleção gênica (FERREIRA et al., 2006; TAKAHASHI et al., 2011).

1.9 Testes de virulência em animais

O modelo animal consiste em reproduzir o fenômeno a ser estudado em um organismo vivo que se assemelhe ao organismo que sofre aquele fenômeno. Os resultados desse estudo podem caracterizar um sistema ou patologia e predizer a resposta a tratamentos. Para que um modelo animal seja utilizado, este deve ser adequado ao propósito do estudo: deve se assemelhar ao organismo ao qual se quer extrapolar os resultados, apresentar uniformidade genética e ser facilmente manipulável (WALL; SHANI, 2008).

Os modelos animais são muito úteis quando o estudo direto do fenômeno biológico é impraticável, como, por exemplo, nos estudos de patologias, devido ao óbvio problema ético de expor seres humanos a situações que podem prejudicar a saúde e o bem-estar e até levar à morte. Existem alternativas aos testes utilizando animais, porém, somente os modelos animais podem demonstrar a complexidade dos processos e aproximar-se da situação biológica em estudo. Entretanto, esses testes devem ser feitos com consciência, não se devendo utilizar animais em excesso nem causar dor e sofrimento desnecessários (WILES et al., 2006).

Os modelos animais de aspergilose invasiva são utilizados com o intuito de estudar os fatores de virulência do fungo e testar novos tratamentos e diagnósticos. A maioria dos testes utiliza roedores imunodeprimidos que desenvolvem a doença através da inoculação intranasal do fungo (BUIRAGO et al., 2005).

1.10 Justificativa do trabalho

O diagnóstico e o tratamento da aspergilose invasiva, doença provocada principalmente pelo fungo *Aspergillus fumigatus*, ainda são um desafio e a incidência e taxa de mortalidade desta doença permanecem altas. Os medicamentos disponíveis para o tratamento apresentam efeitos adversos

indesejáveis, toxicidade e alto custo. As enzimas anidrases carbônicas têm sido apontadas como possíveis alvos terapêuticos, por apresentarem papel importante na virulência de vários patógenos e por comporem uma classe de anidrases diferente daquelas presentes no ser humano. Tendo em vista todo o histórico apresentado, o objetivo desse trabalho foi avaliar o papel da enzima anidrase carbônica no desenvolvimento e virulência do fungo *A. fumigatus*.

2.1 Objetivo geral

O objetivo desse trabalho foi avaliar o papel da enzima anidrase carbônica no desenvolvimento e virulência do fungo *A. fumigatus* utilizando-se linhagens mutantes, que apresentam deleção dos genes que codificam esta enzima, e uma linhagem selvagem, como controle.

2.2 Objetivos específicos

- (i) Análise fenotípica microscópica das linhagens mutantes e selvagem frente a duas diferentes concentrações de CO₂ - 0,033% e 5%;
- (ii) Análise fenotípica das linhagens mutantes e selvagem frente a diferentes agentes que promovem estresse oxidativo, nitroativo, iônico e de parede celular, promotores de apoptose e antifúngicos;
- (iii) Análise da expressão gênica global por “microarray” de cRNA das linhagens mutantes e selvagem expostas a duas diferentes concentrações de CO₂ - 0,033% e 5%;
- (iv) Validação, por qPCR, de alguns genes identificados nos experimentos de “microarray”;
- (v) Deleção e caracterização de algum gene que pareça ser importante para a virulência do fungo *A. fumigatus*, identificado nos experimentos de “microarray” e validado por qPCR.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Linhagens de *A. fumigatus*

Para o desenvolvimento do trabalho, foram utilizadas linhagens mutantes que apresentam um ou dois homólogos da enzima anidrase carbônica deletados e que foram gerados através de recombinação homóloga por Han e colaboradores (2010). Também foi utilizada a linhagem selvagem, $\DeltaakuB^{ku80}$, que deu origem às mutantes. Além dessas, durante esse trabalho, uma linhagem com o gene *cipC* deletado também foi obtida a partir da linhagem $\DeltaakuB^{ku80}$. A Tabela 1 traz informações sobre as linhagens utilizadas.

Tabela 1 - Linhagens utilizadas no trabalho

Nome da linhagem	Genótipo	Referências
$\DeltaakuB^{ku80}$	$\Delta ku80::pyrG\ pyrG^- MAT1-1$	FERREIRA et al. 2006
$\Delta cafA$	$\Delta cafA::pyrG\ \Delta ku80\ pyrG^- MAT1-1$	HAN et al. 2010
$\Delta cafB$	$\Delta cafB::pyrG\ \Delta ku80\ pyrG^- MAT1-1$	HAN et al. 2010
$\Delta cafC$	$\Delta cafC::pyrG\ \Delta ku80\ pyrG^- MAT1-1$	HAN et al. 2010
$\Delta cafD$	$\Delta cafD::pyrG\ \Delta ku80\ pyrG^- MAT1-1$	HAN et al. 2010
$\Delta cafA\Delta cafB$	$\Delta cafA\ \Delta cafB::pyrG\ \Delta ku80\ pyrG^- MAT1-1$	HAN et al. 2010
$\Delta cipC$	$\Delta cipC::pyrG\ \Delta ku80\ pyrG^- MAT1-1$	Este trabalho

3.2 Protocolos adotados

3.2.1 Suspensão de conídios

Para a confecção das suspensões de conídios, as linhagens foram inoculadas em meio YAG (anexo A - 2) e incubadas a 37°C durante 48 horas. Após a completa esporulação, os conídios foram incorporados à água estéril com o auxílio de uma pipeta Pasteur. A água contendo os conídios foi filtrada em seringa com lã de vidro estéril, para que restos de meio de cultura e hifas fossem retirados, armazenada em tubo falcon e mantida a 4°C.

3.2.2 Microcultivo

A técnica de microcultivo foi realizada segundo Lacaz e colaboradores (2002). Suspensões frescas de conídios das linhagens foram inoculadas em pequenos blocos de meio YAG em câmaras de microcultivo e incubadas a 37°C durante 48 horas em 0,033% e 5% de CO₂, exceto a linhagem $\Delta cafA\Delta cafB$ que, por não crescer em concentrações ambientais de CO₂, foi incubada somente em 5%.

As câmaras de microcultivo consistem em placas de Petri grandes contendo papel de filtro, suporte para lâmina, lâmina, lamínula e bloco de ágar. O bloco de ágar fica entre a lâmina e a lamínula e o fungo cresce nas laterais.

Após 48 horas, as lamínulas foram retiradas e colocadas sobre outras lâminas contendo uma gota do corante lactofenol azul de algodão e examinadas ao microscópio óptico.

3.2.3 Testes de sensibilidade por “drop-out”

Os testes de sensibilidade aos agentes estressantes foram realizados de acordo com Ram e Klis (2006). Foram utilizados agentes que promovem estresse oxidativo (menadiona, paraquat e peróxido de hidrogênio), nitroativo (nitroprussiato de sódio), iônico (cloreto de cálcio, cloreto de sódio e sulfato de magnésio) e de parede celular (calcoflúor, dodecil sulfato de sódio e vermelho congo), promotores de apoptose (ácido acético) e antifúngicos (anfotericina B, anidulafungina, cetoconazol, fluconazol, itraconazol, nistatina e terbinafina). Nos testes de “drop-out”, foi analisado o efeito do agente em teste sobre o crescimento radial das linhagens mutantes e selvagem.

Os agentes em teste foram incorporados em meio mínimo (anexo A - 1) e, para as placas controle, somente seus solventes foram incorporados com o mesmo volume dos agentes em teste. Para os testes com calcoflúor e vermelho congo, o meio de cultura foi tamponado com MES 100 mM para prevenir a acidificação do meio e consequente precipitação dos agentes em teste.

Os testes de sensibilidade foram feitos utilizando-se suspensões frescas de conídios. No dia do teste, as suspensões foram diluídas nas seguintes concentrações: 5.10^7 , 5.10^6 , 5.10^5 , 5.10^4 e 5.10^3 conídios por mL e 5 μ L de cada concentração foram aplicados nas placas de Petri na ordem demonstrada na Figura 2.

Figura 2. Representação esquemática da distribuição das linhagens e suas concentrações nas placas de Petri nos testes de “Drop-out”.

As placas foram incubadas a 37°C durante 48 horas em 0,033% e 5% de CO₂. Compostos fotossensíveis (anfotericina B, calcoflúor, menadiona e vermelho congo) tiveram suas placas montadas em ambiente com pouca iluminação e incubadas protegidas da luz. Abaixo, seguem as tabelas com os agentes testados, seus solventes e fabricantes (Tabela 2).

Tabela 2 - Agentes utilizados nos testes de sensibilidade

Tipo de estresse	Agente	Diluyente
Apoptose	ácido acético (Dinâmica)	água
	anfotericina B (Sigma)	DMSO
Antifúngicos	anidulafungina (Pfizer)	água
	cetoconazol (Padrão USP)	DMSO
	fluconazol (Padrão USP)	DMSO
		Continua

Continuação		
Tipo de estresse	Agente	Diluyente
Antifúngicos	itraconazol (Padrão USP)	HCl 0,1N
	nistatina (Bristol-Myers Squibb)	água
	terbinafina (Padrão USP)	etanol
Estresse iônico	CaCl ₂ (J.T. Baker)	água
	MgSO ₄ (J.T. Baker)	água
	NaCl (J.T. Baker)	água
Estresse nitroativo	nitroprussiato de sódio (Dinâmica)	água
Estresse oxidativo	H ₂ O ₂ (Dinâmica)	água
	menadiona (Sigma)	etanol
	paraquat (Sigma)	água
Estresse de parede celular	calcoflúor (Sigma)	KOH (0,5%), glicerol (83%) e água
	SDS (Promega)	água
	vermelho congo (Dinâmica)	água

3.2.4 “Microarray”

3.2.4.1 Padronização dos tempos de incubação

Primeiramente, foi realizada uma padronização dos tempos de crescimento, para que todas as linhagens estivessem no mesmo estágio de desenvolvimento. Para isso, as linhagens foram cultivadas a 37°C em meio mínimo líquido sem agitação, e analisadas macro e microscopicamente de hora em hora.

3.2.4.2 Extração do RNA

Foram inoculados $2 \cdot 10^8$ conídios em 30 mL de meio mínimo líquido e estes foram incubados durante os tempos e condições adequados, sem agitação.

Para a extração do RNA, as linhagens foram incubadas da seguinte maneira: dois frascos de cultura de cada linhagem foram incubados em estufa com 0,033% de CO₂ durante o tempo padronizado; passado esse tempo, um dos frascos foi transferido para estufa com 5% de CO₂ enquanto que o outro permaneceu na estufa com 0,033% durante 160 minutos. Assim, foram obtidos os

RNAs que demonstram a expressão gênica do fungo quando este se depara com aumento na concentração de CO₂.

Para a obtenção do RNA que demonstra a mudança da expressão gênica em situações de diminuição do CO₂, dois frascos de cultura de cada linhagem foram incubados em estufa com 5% de CO₂ durante o tempo padronizado; passado esse tempo, um dos frascos foi transferido para estufa com 0,033% de CO₂ enquanto que o outro permaneceu na estufa com 5% durante 160 minutos.

A seguir, o micélio, que cresceu na superfície do meio sob a forma de uma película, foi colhido com o auxílio de uma espátula, imediatamente congelado em nitrogênio líquido e liofilizado para se evitar a degradação do RNA.

A extração do RNA total foi feita utilizando-se o kit RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. O micélio foi triturado em nitrogênio líquido e transferido para a parte superior da coluna QIAshredder contendo 450 µL do tampão RLT com β-mercaptoetanol, homogeneizado em vórtex e centrifugado a 22000 xg durante 2 minutos. O efluente foi transferido para a coluna RNeasy spin, foi adicionado etanol em volume correspondente a metade do volume do efluente e a coluna foi centrifugada a 8000 xg durante 15 segundos. O efluente foi descartado e foram adicionados 350 µL do tampão RW1 e a coluna foi novamente centrifugada a 8000 xg durante 15 segundos. O efluente foi descartado mais uma vez e a coluna tratada com DNase da seguinte maneira: 10 µL de DNase I diluídos em 70 µL de tampão RDD foram adicionados à coluna e esta foi incubada a temperatura ambiente durante 15 minutos. Após a incubação, foram adicionados 350 µL de tampão RW1 e a coluna foi centrifugada a 8000 xg durante 15 segundos. O efluente foi descartado e 500 µL de tampão RPE foram adicionados e a coluna foi novamente centrifugada a 8000 xg durante 15 segundos. O efluente foi descartado, foram adicionados 500 µL do tampão RPE e a coluna foi centrifugada a 8000 xg durante 2 minutos. A coluna foi transferida para um novo tubo coletor e centrifugada a 8000 xg durante 1 minuto para que resíduos do tampão fossem retirados. A coluna foi novamente transferida para outro tubo coletor e o RNA foi eluído em 30 µL de água livre de RNase através de uma centrifugação a 8000 xg durante 1 minuto. A operação foi

repetida com mais 20 μL de água livre de RNase e o RNA foi armazenado a -80°C .

A integridade do RNA foi verificada em Bioanalyzer com o kit RNA 6000 nano (Agilent). Os “chips” do kit foram preenchidos com 9 μL do gel preparado previamente (65 μL de gel com 1 μL de corante), 5 μL do marcador foram adicionados em cada poço do “chip”, 1 μL do marcador de peso molecular foi adicionado no poço destinado a ele e 1 μL das amostras foram adicionados nos demais poços. Tanto as amostras quanto o marcador de peso molecular foram desnaturados previamente a 70°C durante 2 minutos. O “chip” foi homogeneizado em vórtex adequado a este e inserido no aparelho para a leitura. Materiais que apresentaram degradação ou pureza imprópria (A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} menores que 1,8) tiveram a extração repetida.

3.2.4.3 Obtenção de cRNA, hibridização e leitura das lâminas de “microarray”

As lâminas de “microarray” foram adquiridas de forma personalizada para o organismo *A. fumigatus* contendo a totalidade dos genes preditos (9926 genes), de acordo com Nierman e colaboradores (2005). As lâminas foram confeccionadas pela empresa Agilent Technologies.

Moléculas de cRNA marcadas diferencialmente foram obtidas de acordo com o protocolo padrão descrito pela Agilent Technologies (“Two-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis”) mediante a utilização do sistema de reações “Quick Amp” (Agilent Technologies), partindo-se de RNA total purificado.

Resumidamente, para a síntese de cDNA, 200 ng de RNA total, contidos em um volume final de 1,5 μL , foram adicionados em 2 μL do mix Spike diluído (Spike A para marcação com Cy3 e Spike B para marcação com Cy5). A seguir, foram adicionados 0,8 μL do primer T7 Promoter, 1 μL de água livre de nuclease e a mistura foi incubada a 65°C , durante 10 minutos, para a desnaturação do primer e da amostra. As amostras foram transferidas para o gelo e incubadas durante 5 minutos. A seguir, foram adicionados a essa mistura, 2 μL de 5X First Strand Buffer, 1 μL de DTT (0,1 M), 0,5 μL de dNTP mix (10 mM), 1,2 μL de AffinityScript

RNase Block Mix e as amostras foram incubadas a 40°C durante 2 horas, a 70°C durante 15 minutos e no gelo durante 5 minutos.

Para a síntese e amplificação do cRNA e conjugação do mesmo aos fluoróforos, foram adicionados em cada amostra, 0,75 µL de água livre de nuclease, 3,2 µL de 5X Transcription Buffer, 0,6 µL de DTT (0,1 M), 1 µL de NTP mix, 0,21 µL de T7 RNA Polymerase Blend, 0,24 µL de Cyanine 3-CTP (Cy3-CTP) ou Cyanine 5-CTP (Cy5-CTP) e as amostras foram incubadas a 40°C durante 2 horas.

A seguir, as amostras foram purificadas com o kit RNeasy® mini kit (Qiagen), segundo especificações do fabricante. Amostras com rendimento acima de 0,825 µg e atividade específica acima de 6 pmol de Cy3 ou Cy5 por µg de cRNA foram utilizadas para as hibridizações.

As reações de hibridação e lavagem das lâminas foram realizadas de acordo com especificações do fabricante (Agilent Technologies). Resumidamente, 825 ng do cRNA marcado com Cy3-CTP ou Cy5-CTP foram misturados e adicionados de 11 µL de 10X Blocking Agent, água livre de nuclease até um volume de 52,8 µL, 2,2 µL de 25X Fragmentation Buffer e incubados a 60°C durante 30 minutos. As amostras foram transferidas para o gelo, adicionadas de 55 µL de 2X GEx Hybridization Buffer HI-RPM e transferidas para as lâminas de “microarray”.

As reações de hibridização foram conduzidas em forno de hibridização a 65°C, 10 rpm, durante 17 horas. A lavagem das lâminas foi realizada durante 1 minuto a temperatura ambiente, com o tampão GE Wash Buffer 1; durante 1 minuto com o tampão GE Wash Buffer 2, a 37°C; durante 10 segundos a temperatura ambiente, com acetonitrila e durante 30 segundos a temperatura ambiente, com a solução GE de estabilização e secagem.

As lâminas foram imediatamente submetidas à leitura em um scanner óptico GenePix® 4000B (Molecular Devices, USA) com escaneamento simultâneo dos canais Cy3 (532nm) e Cy5 (635nm) a uma resolução de 5 µm. Para cada leitura, a potência do laser foi ajustada para 100% e o ganho do fotomultiplicador para cada comprimento de onda foi ajustado automaticamente usando a ferramenta Auto-PMT do programa GenePix Pro 6.1 (Molecular Device), visando minimizar o “background” e evitar saturação de sinal em diferentes “spots” do “microarray”.

3.2.4.4 Análise dos resultados do “microarray”

O programa GenePix Pro 6.1 gerou imagens em formato .TIFF e estas foram analisadas no software “Agilent Feature Extraction” (versão 9.5.3.1, Agilent) usando o algoritmo linear Lowess para obter as intensidades dos valores subtraídos do “background” e normalizados. Os valores normalizados gerados nos arquivos de dados Feature Extraction foram usados no software Express Converter (versão 2.1, TM4 disponível em <http://www.tm4.org/utilities.html>) o qual converte os arquivos com formato Agilent para arquivos formato mev (multi experiment viewer), compatíveis com os softwares TM4 (John Craig Venter Institute, USA) para análise dos “microarrays” (disponível em <http://www.tm4.org/>).

Os arquivos .mev gerados foram carregados no programa MIDAS (Microarray Data Analysis System) onde os dados resultantes foram as médias das quatro réplicas de cada gene nos “arrays” usando a ferramenta “in slides replicates analysis” existente no software MIDAS. Estes arquivos de dados, gerados no formato mev, foram então carregados no programa MEV (MultiExperiment Viewer, versão 4.8.1) onde genes diferencialmente expressos foram identificados utilizando-se o teste t de uma classe, com $p < 0,0001$. Os genes considerados significativamente diferentes foram aqueles cuja média da razão $\log_2$ da expressão de todos os genes incluídos foi maior que 0,5 ou menor que - 0,5.

3.2.5 Extração de DNA genômico de *A. fumigatus*

Para a construção das curvas de calibração das sondas utilizadas nos experimentos de qPCR e para a obtenção dos fragmentos necessários para a deleção gênica, foi realizada a extração de DNA genômico da linhagem $\DeltaakuB^{ku80}$.

A extração foi feita segundo Raeder; Broda (1985): cerca de 1×10^8 conídios frescos do fungo foram inoculados em 50 mL de meio YG e incubado a 37°C, sob agitação (150 rpm), “overnight”. No dia seguinte, o micélio foi coletado por filtração à vácuo, lavado com água e congelado em nitrogênio líquido. O micélio foi triturado em nitrogênio líquido com auxílio de gral e pistilo e cerca de 500 mg

foram transferidos para microtubo contendo 500 µL de tampão de extração de DNA genômico (anexo B-12). Foi adicionado o mesmo volume de fenol:clorofórmio (1:1) e o microtubo foi homogeneizado em vórtex durante 10 minutos. O tubo foi centrifugado a 16000 xg durante 15 minutos e a fase aquosa (superior) resultante da centrifugação foi transferida para outro microtubo. À fase aquosa, foi adicionado o mesmo volume de clorofórmio, o tubo foi homogeneizado em vórtex e centrifugado a 16000 xg durante 5 minutos. Novamente a fase aquosa foi transferida para outro microtubo, ao qual foram adicionados 540 µL de isopropanol. Após branda homogeneização (apenas inversão), o tubo foi centrifugado a 16000 xg durante 1 minuto. O sobrenadante foi removido, o precipitado lavado com etanol 70% e centrifugado a 16000 xg durante 1 minuto. O sobrenadante foi novamente removido e, após secagem a temperatura ambiente, o precipitado foi ressuspensionado em água estéril. O DNA foi tratado com RNase na concentração de 100 µL/mL, a 37°C durante 10 minutos e armazenado a 4°C.

O DNA foi submetido à eletroforese em gel de agarose para verificar a sua integridade. Amostras que apresentaram degradação tiveram a extração repetida. A dosagem e confirmação da pureza das amostras foram feitas em Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) e amostras que apresentaram A_{260}/A_{280} menor que 1,8 e A_{260}/A_{230} menor que 2,0 tiveram a extração repetida.

3.2.6 Eletroforese de DNA em gel de agarose

A eletroforese de DNA em gel de agarose foi feita de acordo com Sambrook e Russel (2001). O gel de agarose foi feito em tampão TAE 1x (Promega) com 1% de agarose e a eletroforese, realizada em cuba com tampão TAE 1x sob tensão e tempo variáveis. Para a confirmação da integridade do DNA, a coloração do DNA foi feita com Gel Red (Biothium) e para a purificação, 0,1% de brometo de etídeo foi incorporado ao gel no momento do preparo deste. O gel foi documentado em fotodocumentador Photo Doc-It (UVP).

3.2.7 Obtenção de cDNA

Os mesmos RNAs utilizados para a técnica de “microarray” foram utilizados como molde para a obtenção de cDNA. A reação de síntese de cDNA foi feita utilizando-se a enzima ImProm® Reverse Transcriptase (Promega) de acordo com orientações do fabricante. Partiu-se de 10 µg de RNA total contidos em um volume de 10,5 µL, aos quais foram adicionados 1,5 µL de oligo dT na concentração de 100 pmol/µL; a mistura foi incubada a 75°C durante 10 minutos. Após o tempo de incubação, a mistura foi mantida no gelo e foram adicionados os seguintes componentes: 5 µL de Reaction buffer (5X), 5 µL de MgCl₂ (25 mM), 2 µL de dNTP mix (10 mM) e 1 µL de ImProm® Reverse Transcriptase. O tubo foi incubado em banho seco, onde foi submetido aos seguintes ciclos: anelamento (25°C durante 5 minutos), extensão (42°C durante 60 minutos) e inativação da enzima (70°C durante 15 minutos). Após a síntese, os cDNAs foram mantidos a -20°C.

3.2.8 PCR em tempo real

Dos genes identificados nos experimentos de “microarray”, 8 foram escolhidos para a validação através de qPCR: Afu1g03352 (alpha-1,3-glucanase), Afu2g00750 (oxidoreductase), Afu2g14610 (oxalate decarboxylase), Afu3g01070 (tyrosinase), Afu4g09440 (sodium P-type ATPase), Afu5g09330 (CipC-like antibiotic response protein), Afu7g06680 (AAA family ATPase) e Afu8g07210 (hydroxymethylglutaryl-CoA synthase). O gene Afu1g10910 (beta tubulin), um gene constitutivo, foi utilizado como normalizador.

Todas as reações de PCR em tempo real foram realizadas no aparelho 7500 Fast Real Time PCR System utilizando-se o kit Taq-Man® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). As reações foram montadas em duplicata, com os seguintes componentes: 5 µL de Taq-Man® Universal PCR Master Mix, 0,5 µL de sonda TaqMan®, 1 µL de cDNA e 3,5 µL de água. As condições das reações de PCR compreenderam um passo inicial de 2 minutos a 50°C, seguido por 5 minutos a 95°C, para a desnaturação, e 40 ciclos a 94°C por 20 segundos e 60°C

por 1 minuto. As sondas fluorescentes, marcadas com 6-Carboxifluoresceína (6-FAM), foram desenhadas usando o programa File Builder V.3.1, sintetizadas pela Invitrogen (TaqMan®) e baseadas nas sequências dos genes selecionados. As sequências utilizadas nas sondas e os genes escolhidos estão listados na Tabela 3.

Tabela 3 - Detalhes das sondas utilizadas nos ensaios de qPCR

Gene	Sequência do “Primer” (5’ – 3’)	Sequência do “Reporter” (5’ – 3’)
Tipo de estresse	Agente	Diluyente
Afu1g03352	Rv TGTAAGGCTCAACGACAGTGT	TCCGCTGTTTCCCC
	Fw CAGAGGGCCCCAGCAT	
Afu2g00750	Rv GGCCTGCTCGTCGATAGC	CCGGCTCAAGTTCATC
	Fw ACCACCTTTGAGGCGTTCAG	
Afu2g14610	Rv GGCGACTGCGGGTACTT	CTCGCCTCAGAAGTCT
	Fw GTCTTCGACGATGGATCCTTCTC	
Afu3g01070	Rv ACTTCTCTGGGATTGTGTGCAA	TCCGGCCCGTTCAAAA
	Fw CGGAGGTGGCTGTGTCTTC	
Afu4g09440	Rv GCCGAGGTTGACAGTGAAGT	ACGCTCGCCCTTGGTC
	Fw CGGCGCGGTTCAACTG	
Afu5g09330	Rv GGGAACCTCGGCCTTTTGGT	CAGCCACGCTTTTCGC
	Fw GGATCACCAGCGCAAGGA	
Afu7g06680	Rv CTCCGCACCGACAAACC	CCCATCACGGCTCTTC
	Fw TTCGAAGTGGTACCGTTTGGT	
Afu8g07210	Rv GTCACGAATGGATATCTGGTCACTA	ACCGGCTCCAGCACCA
	Fw GCGTGGCCATGCTCATC	
	Rv ATAGACGTGCTTCATGCAAGAAC	
	Fw GCGTGGCCATGCTCATC	

Os valores de log2 obtidos nos experimentos de PCR em tempo real foram comparados aos obtidos nos experimentos de “microarray” por meio do coeficiente de correlação de Pearson.

3.2.9 Deleção gênica

Após a análise dos resultados dos ensaios de “microarray” e qPCR, um gene foi escolhido e deletado. O gene escolhido foi o Afu5g09330, *cipC*, que codifica a proteína cipC, presente somente nas hifas do fungo e que não apresenta função definida, porém já foi apontada como um potencial alvo de drogas por Kubitschek-Barreira et al. (2013).

Para a deleção, foram confeccionados, pela empresa IDT (Integrated DNA Technologies), 3 conjuntos de “primers”: - *cipC* 5’ Fw e Rv, que permitem a

amplificação de um fragmento de 2 Kb que flanqueia a região 5' UTR ("Untranslate Region") do gene; - *cipC* 3' Fw e Rv, que permitem a amplificação de um fragmento de 2 Kb que flanqueia a região 3' UTR; e - *pyrG* Fw e Rv, que permitem a amplificação do gene *pyrG* de *A. fumigatus*. Além destes, "primers" para a confirmação da integração no locus de interesse também foram confeccionados: - *cipC* 2,2 5' Fw, que permite a amplificação de um fragmento de 2200pb, 200 pb anteriores à região 5' do fragmento de 2 Kb anterior ao gene, para que se pudesse confirmar a integração homóloga do cassete de deleção; e - *cipC* ORF Fw e Rv, que permitem a amplificação de um fragmento de 393pb, correspondente ao gene *cipC* na cepa selvagem, e que não deve amplificar nenhum fragmento na cepa mutante, caso a deleção seja bem sucedida. A Tabela 4 traz os "primers" confeccionados e suas respectivas sequências.

Tabela 4 – "Primers" utilizados para deleção e confirmação da deleção do gene Afu5g09330 (*cipC*)

"primer"	Sequência (5' – 3')
<i>cipC</i> 5' Fw	GTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGGATAGCATGGCAGAGGTTCT
<i>cipC</i> 5' Rv	GTGCCTCCTCTCAGACAGAATTTTGAGTTGATCTGGTGAAATC
<i>cipC</i> 3' Fw	GAGCATTGTTTGAGGCGAATTCGACGGCTAGACAACATGTAC
<i>cipC</i> 3' Rv	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCATTGTGTCTGCTGAGGGCG
<i>pyrG</i> Fw	ATTCTGTCTGAGAGGAGGCA
<i>pyrG</i> Rv	AATTCGCCTCAAACAATGCTC
<i>cipC</i> 2,2 5' Fw	ACTGTGAGGTTGGTGGGGA
<i>cipC</i> ORF Fw	ATGGCTTGGGGCTGGG
<i>cipC</i> ORF Rv	TTACCAACGGTCGACAGGGC

3.2.9.1 Construção do cassete de deleção

A construção do cassete de deleção foi realizada segundo Colot e colaboradores (2006), utilizando-se a recombinação homóloga que acontece em *S. cerevisiae*. Abaixo, segue a representação do vetor pRS426 (Figura 3) e o esquema de construção do cassete de deleção (Figura 4).

Figura 3. Representação esquemática do vetor pRS426 (http://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/yeast_plasmids/pRS426/).

Figura 4. Representação esquemática da construção do cassete de deleção em *S. cerevisiae*.

Para a construção do cassete de deleção, todas as reações de amplificação por PCR foram realizadas em volume final de 50 μ L, utilizando-se DNA polimerase de alta fidelidade, “High Fidelity PCR Enzyme Mix” (Fermentas), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA genômico da linhagem $\DeltaakuB^{ku80}$ de *A. fumigatus* foi utilizado como molde para a amplificação dos fragmentos de aproximadamente 2 Kb das regiões 5’ e 3’ que flanqueiam a região aberta de leitura (ORF) do gene de interesse. e o O fragmento contendo o marcador genético de auxotrofia (*pyrG*), de 1,9 Kb, foi obtido utilizando-se como molde o plasmídeo pCDA21. As amplificações foram realizadas utilizando-se 1 μ g de DNA genômico ou 200 ng de DNA plasmidial, 20 pmol dos “primers” específicos, 5 μ L de “High Fidelity PCR buffer” contendo 15 mM de $MgCl_2$, 1,25 unidades de “High Fidelity PCR enzyme” e água livre de nuclease. As reações de PCR foram realizadas em termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf) com os seguintes ciclos: desnaturação inicial (94°C, 1 ciclo, 3 minutos), desnaturação (94°C, 35 ciclos, 30 segundos), anelamento (55°C, 35 ciclos, 30 segundos), extensão (72°C, 35 ciclos, 1minuto/Kb do fragmento a ser amplificado) e extensão final (72°C, 1 ciclo, 10 minutos).

Os fragmentos amplificados apresentam extremidades homólogas entre si para permitir a recombinação homóloga entre si e com o vetor pRS426 “in vivo” em *S. cerevisiae*.

O plasmídeo pRS426 foi digerido com as enzimas BamHI e EcoRI (Promega), seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Na reação de digestão, foram utilizadas 12 unidades de cada enzima, 2 μ L de tampão D (Promega), 0,2 μ L de BSA (100x), 12 μ g do plasmídeo e 12,6 μ L de água. A digestão foi feita em banho seco, a 37°C durante 3 horas.

O plasmídeo e os fragmentos foram fracionados por eletroforese em gel de agarose, corado com brometo de etídeo e purificados com o kit “QIAquick Gel Extraction Kit” (Qiagen), de acordo com instruções do fabricante. As bandas correspondentes aos fragmentos de interesse e ao plasmídeo digerido foram recortadas do gel de agarose e acondicionadas em microtubos. O tampão QG foi adicionado aos microtubos em volume correspondente a 3x a massa dos fragmentos de agarose e os microtubos foram incubados em banho seco a 50°C

durante 10 minutos para a dissolução do gel. O material foi transferido para as colunas do kit e centrifugado a 18800 xg durante 1 minuto. O efluente resultante foi descartado e 500 µL do tampão QG foram adicionados às colunas e novamente centrifugados a 18800 xg durante 1 minuto. O efluente resultante foi descartado mais uma vez e 750 µL de tampão PE foram adicionados e centrifugados a 18800 xg durante 1 minuto. O efluente foi descartado e a centrifugação foi repetida. As colunas foram transferidas para novos tubos coletores, 30 µL de água livre de nuclease foram adicionados e as colunas foram incubadas a temperatura ambiente durante 3 minutos. As colunas foram centrifugadas a 18800 xg durante 1 minuto. Novamente foram adicionados 30 µL de água livre de nuclease e a centrifugação foi repetida.

A recombinação homóloga em *S. cerevisiae* foi realizada utilizando-se a linhagem SC9421 da seguinte maneira: uma colônia isolada da levedura, crescida em meio YPD sólido (anexo A-3), foi inoculada em 10 mL de YPD líquido e incubada a 30°C, 200 rpm, durante 16 horas. Após a incubação, 5 mL foram adicionados a 200 mL de YPD líquido e incubados a 30°C, 200 rpm, durante 4 horas. Após o tempo de incubação, a cultura foi centrifugada a 3000 xg durante 7 minutos e o sobrenadante foi descartado. Foi realizada uma lavagem com água estéril e centrifugação a 5000 xg durante 5 minutos. O precipitado foi ressuspenso em 1 mL solução TE 1x/LiOAc (anexo B-5) e 100 µL dessa suspensão foram adicionados a 100 µg de DNA de esperma de arenque (Promega) e a concentrações equimolares do plasmídeo (digerido com as enzimas BamH1 e EcoR1, Promega) e dos fragmentos 5', 3' e *pyrG*. Foram adicionados 600 µL de solução PEG 3350 40% / LiOAc 1x (anexo B-6) e os tubos foram incubados a 30°C, 200 rpm durante 30 minutos. Após a incubação, 70 µL de DMSO foram adicionados e uma nova incubação foi realizada a 42°C durante 15 minutos. Após os 15 minutos, outra incubação foi realizada em gelo, durante 2 minutos. Após o período de incubação, o conteúdo dos tubos foi lavado com 700 µL de água estéril a 18800 xg durante 30 segundos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado, plaqueado em meio SC URA⁻ (anexo A-4), incubado a 30°C. Como controle positivo foi feita uma reação utilizando-se o plasmídeo não

digerido e, como controle negativo, uma reação sem o plasmídeo e os fragmentos.

Para comprovar a recombinação dos fragmentos e a correta formação do cassete de deleção, o DNA dos transformantes crescidos em meio SC URA⁻ foi extraído conforme descrito em Sambrook e Russel (2001). Resumidamente, uma colônia isolada foi inoculada em 10 mL de meio SC URA⁻ líquido e incubada a 30°C sob agitação (150 rpm) durante 48 horas. Após as 48 horas, o meio foi centrifugado a 2000 xg durante 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado, ressuspendido em 1 mL de tampão de extração de DNA genômico. A extração foi realizada utilizando-se pérolas de vidro tratadas com HCl e agitação em vórtex durante 10 minutos. O material (sem as pérolas de vidro) foi transferido para outro microtubo, o mesmo volume de fenol:clorofórmio (1:1) foi adicionado e o tubo foi homogeneizado em vórtex, durante 10 minutos. O tubo foi centrifugado a 22000 xg durante 15 minutos, a fase aquosa (superior) foi transferida para um novo tubo e, a esta, foram adicionados 540 µL de isopropanol. O tubo foi homogeneizado suavemente (inversão) e novamente centrifugado a 22000 xg durante 5 minutos. O sobrenadante resultante foi descartado e o precipitado lavado com 300 µL de etanol 70% e centrifugado a 22000 xg durante 1 minuto. O sobrenadante foi novamente removido e, após secagem a temperatura ambiente, o precipitado foi ressuspendido em água estéril. O DNA foi tratado com RNase na concentração de 100 µL/mL, a 37°C, durante 10 minutos.

A comprovação da recombinação dos fragmentos de DNA pela levedura no plasmídeo pRS426 foi feita por PCR com a enzima “High Fidelity PCR Enzyme Mix” (Fermentas) seguindo o protocolo descrito anteriormente. O clone positivo escolhido foi submetido a uma PCR com a enzima Takara Ex Taq® (Takara Biotechnology) utilizando-se os primers distais -*cipC* 5’ Fw e -*cipC* 3’ Rv para a amplificação do cassete completo de deleção. A reação foi realizada em volume final de 50 µL utilizando-se 1,25 unidades de Takara Ex Taq®, 5 µL de “Ex Taq Buffer”, 4 µL de “dNTP mixture” (10 mM), 500 ng de DNA molde, 0,5 µM de cada “primer” e água livre de nuclease. A PCR foi realizada em termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf) com os seguintes ciclos: desnaturação inicial (98°C, 1 ciclo, 10 segundos), desnaturação (98°C, 30 ciclos, 10 segundos),

anelamento (58°C, 30 ciclos, 30 segundos), extensão (72°C, 30 ciclos, 6 minutos) e extensão final (72°C, 1 ciclo, 10 minutos).

O material foi fracionado em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo e a banda específica, purificada com o kit “QIAquick Gel Extraction Kit” (Qiagen) conforme descrito anteriormente, para as reações de transformação da linhagem $\DeltaakuB^{ku80}(pyrG-)$ para a produção dos mutantes.

3.2.9.2 Transformação em *A. fumigatus*

A transformação foi feita de acordo com Malavazi; Goldman (2012), com modificações. Cerca de $5 \cdot 10^7$ conídios de *A. fumigatus*, linhagem $\DeltaakuB^{ku80}(pyrG-)$, foram inoculados em 50 mL de meio de cultivo YUU líquido (anexo A-2) e incubados sob agitação (200 rpm) a 37°C, durante 16 horas. Os tubos germinativos foram coletados por centrifugação (1500 xg durante 5 minutos) e ressuspensos em solução de esferoplastização contendo 20 mL de solução 1 (anexo B-7), 20 mL de solução 2 (anexo B-8), 6,5 mL de sulfato de magnésio 1 M, juntamente com 400 mg de albumina de soro bovino e 300 mg de Lallzyme MMX® (Lallemand). Esta mistura foi incubada durante 5 horas, a 30°C, sob lenta agitação (75 rpm) para a digestão parcial da parede celular do fungo. Após este tempo, o material foi filtrado em lã de vidro estéril, centrifugado a 3000 xg durante 10 minutos e lavado por duas vezes com a solução 3 (anexo B-9). Os esferoplastos foram ressuspensos em 1 mL de solução 5 (anexo B-11) e incubados durante 10 minutos no gelo. A seguir, a uma alíquota de 100 µL da suspensão de células, foi adicionado de 4 a 20 µg de DNA (cassete de deleção), 50 µL de solução 4 (anexo B-10) e a mistura foi incubada durante 20 minutos no gelo. Após este período, foi adicionado 1 mL da solução 4, a mistura foi homogeneizada e incubada a temperatura ambiente durante 20 minutos. A suspensão de esferoplastos foi diluída em 10 mL de meio de cultura YAG Top Ágar contendo 0,6 M de KCl e semeada sobre YAG contendo 0,6 M de KCl. Os transformantes foram selecionados pela auxotrofia em meio YAG.

A comprovação da integração do cassete de deleção no “locus” de interesse foi realizada por PCR utilizando-se a enzima “High Fidelity PCR Enzyme Mix” (Fermentas), seguindo o protocolo descrito anteriormente.

3.2.10 Testes de virulência em camundongos

Os testes de virulência foram realizados utilizando-se o modelo murino de baixa dose para aspergilose invasiva descrito por Liebmman et al. (2004) e Ferreira et al. (2006). Para os testes de virulência, foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas com 8 semanas ou mais, pesando entre 20 a 25 gramas. Para cada linhagem testada, foram utilizados 8 camundongos, divididos em 2 gaiolas. Os animais foram submetidos a uma fase de adaptação de uma semana. Estes foram imunossuprimidos por injeção intraperitoneal de ciclofosfamida (150 mg/Kg de peso corporal) nos dias -4, -1, 2 antes e após a infecção no dia 0. Adicionalmente, uma única dose de acetato de cortisona (200 mg/kg de peso corporal) foi administrada subcutaneamente no dia -3. A infecção foi feita via nasal, utilizando-se 5.10^4 conídios frescos em suspensão com PBS (anexo B-13). Para os animais do controle negativo, somente PBS foi administrado. A sobrevivência foi monitorada duas vezes ao dia e os animais, pesados todos os dias, durante 15 dias. Animais moribundos, ou seja, que perderam 20% do peso que possuíam no dia da infecção, foram sacrificados.

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa GraphPad Prism (versão 6) e os testes utilizados foram “Log-rank (Mantel-Cox) test” e “Gehan-Breslow-Wilcoxon test”.

4.1 Microcultivo

A análise microscópica das linhagens de *A. fumigatus* demonstrou que as anidrases carbônicas não interferem na estrutura do fungo. Nos microcultivos, tanto em concentrações ambientais (0,033%) de CO₂, quanto em 5%, as linhagens deletadas ($\Delta cafA$, $\Delta cafB$, $\Delta cafC$, $\Delta cafD$ e $\Delta cafA\Delta cafB$) apresentaram estruturas semelhantes e compatíveis com a linhagem selvagem ($\Delta akuB^{ku80}$), como pode ser observado nas figuras abaixo (Figuras 5 e 6).

Figura 5. Conidióforos de diferentes linhagens com os homólogos da enzima anidrase carbônica deletados e a linhagem selvagem, $\Delta akuB^{ku80}$, observados ao microscópio óptico (40x). Fotos obtidas em microcultivo incubado em concentrações ambientais (0,033%) de CO₂, durante 48 horas. A) $\Delta cafA$, B) $\Delta cafB$, C) $\Delta cafC$, D) $\Delta cafD$, E) $\Delta akuB^{ku80}$.

Figura 6. Conidióforos de diferentes linhagens com os homólogos da enzima anidrase carbônica deletados e a linhagem selvagem, $\Delta akuB^{ku80}$, observados ao microscópio óptico (40x). Fotos obtidas em microcultivo incubado em 5% de CO₂, durante 48 horas. A) $\Delta cafA$, B) $\Delta cafB$, C) $\Delta cafC$, D) $\Delta cafD$, E) $\Delta cafA\Delta cafB$, F) $\Delta akuB^{ku80}$.

4.2 Testes de sensibilidade por “drop-out”

Nos testes de sensibilidade, as linhagens deletadas apresentaram diferença na sensibilidade com relação à linhagem selvagem para alguns compostos testados. Nos testes com ácido acético e peróxido de hidrogênio, as linhagens mutantes apresentaram menor sensibilidade em relação à linhagem selvagem; já nos testes com os demais compostos, as linhagens deletadas apresentaram sensibilidade semelhante à da linhagem selvagem. Como esperado, a linhagem $\Delta cafA\Delta cafB$ não se desenvolveu em concentrações ambientais de CO_2 (0,033%) (HAN et al., 2010). Os resultados são apresentados nas figuras a seguir (Figuras 7-13).

Figura 7. Efeito do promotor de apoptose, ácido acético (25 mM) sobre o crescimento radial das linhagens mutantes $\Delta cafA$ (A), $\Delta cafB$ (B), $\Delta cafC$ (C), $\Delta cafD$ (D), $\Delta cafA\Delta cafB$ (E) e da linhagem selvagem $\Delta akuB^{Ku80}$ (F).

No teste de sensibilidade com ácido acético, todas as linhagens deletadas foram mais resistentes que a selvagem, tanto nas concentrações ambientais

(0,033%) de CO₂ quanto em ambiente com 5% de CO₂. A linhagem $\Delta cafA$, apesar de se desenvolver com maior dificuldade que as outras quando exposta à concentrações ambientais de CO₂, não se apresentou mais sensível. Não houve diferença na sensibilidade entre as duas concentrações de CO₂ (0,033% e 5%).

Figura 8. Efeito do promotor de estresse oxidativo, peróxido de hidrogênio (2,5 mM) sobre o crescimento radial das linhagens mutantes $\Delta cafA$ (A), $\Delta cafB$ (B), $\Delta cafC$ (C), $\Delta cafD$ (D), $\Delta cafA\Delta cafB$ (E) e da linhagem selvagem $\Delta akuB^{Ku80}$ (F).

Para o peróxido de hidrogênio, todas as linhagens deletadas apresentaram maior resistência em relação à linhagem selvagem, nas diferentes concentrações de CO₂ testadas (0,033% e 5%).

Figura 9. Efeito dos antifúngicos (1) anfotericina B (0,1 μ g/mL), (2) anidulafungina (10 ng/mL), (3) cetoconazol (4 μ g/mL), (4) fluconazol (300 μ g/mL), (5) itraconazol (1,5 μ g/mL), (6) nistatina (3,5 UI/mL) e (7) terbinafina (0,2 μ g/mL) sobre o crescimento radial das linhagens mutantes $\Delta cafA$ (A), $\Delta cafB$ (B), $\Delta cafC$ (C), $\Delta cafD$ (D), $\Delta cafA\Delta cafB$ (E) e da linhagem selvagem $\Delta akuB^{Ku80}$ (F).

Os antifúngicos não provocaram nenhuma diferença na sensibilidade entre as linhagens mutantes e a selvagem. Todas apresentaram sensibilidade semelhante aos diversos antifúngicos testados, nas duas concentrações de CO₂ testadas (0,033% e 5%).

Figura 10. Efeito dos agentes promotores de estresse iônico (1) CaCl₂ (400 mM), (2) MgSO₄ (400 mM) e (3) NaCl (500 mM) sobre o crescimento radial das linhagens mutantes $\Delta cafA$ (A), $\Delta cafB$ (B), $\Delta cafC$ (C), $\Delta cafD$ (D), $\Delta cafA\Delta cafB$ (E) e da linhagem selvagem $\Delta akuB^{Ku80}$ (F).

Nos testes com os agentes promotores de estresse iônico, não houve diferença na sensibilidade entre as linhagens mutantes e a selvagem, nem entre as duas concentrações de CO₂ testadas (0,033% e 5%).

Figura 11. Efeito dos agentes promotores de estresse de parede celular (1) calcoflúor (20 $\mu\text{g/mL}$), (2) vermelho congo (75 $\mu\text{g/mL}$) e (3) SDS (0,01%) sobre o crescimento radial das linhagens mutantes ΔcafA (A), ΔcafB (B), ΔcafC (C), ΔcafD (D), $\Delta\text{cafA}\Delta\text{cafB}$ (E) e da linhagem selvagem $\Delta\text{akuB}^{\text{Ku80}}$ (F).

Com relação aos agentes promotores de estresse na parede celular, as linhagens mutantes não apresentaram diferença na sensibilidade com relação à selvagem, nas duas concentrações de CO_2 testadas (0,033% e 5%).

Figura 12. Efeito do promotor de estresse nitroativo, nitroprussiato de sódio (0,3 mM) sobre o crescimento radial das linhagens mutantes $\Delta cafA$ (A), $\Delta cafB$ (B), $\Delta cafC$ (C), $\Delta cafD$ (D), $\Delta cafA\Delta cafB$ (E) e da linhagem selvagem $\Delta akuB^{Ku80}$ (F).

O agente promotor de estresse nitroativo utilizado não provocou nenhuma diferença na sensibilidade entre as linhagens mutantes e selvagem. Somente a linhagem $\Delta cafA$ apresentou maior sensibilidade, porém, esta normalmente se desenvolve com maior dificuldade em 0,033% de CO_2 .

Figura 13. Efeito dos promotores de estresse oxidativo (1) menadiona (10 μ M) e (2) paraquat (2,5 mM) sobre o crescimento radial das linhagens mutantes Δ cafA (A), Δ cafB (B), Δ cafC (C), Δ cafD (D), Δ cafA Δ cafB (E) e da linhagem selvagem Δ akuB^{Ku80} (F).

Os agentes promotores de estresse oxidativo menadiona e paraquat não provocaram nenhuma diferença na sensibilidade entre as linhagens mutantes e selvagem. No entanto, foi possível notar uma diminuição drástica na esporulação nos testes utilizando-se o Paraquat.

4.3 “Microarray”

Foram determinados tempos de crescimento de forma que não houvesse esporulação visível macroscopicamente e pouca ou nenhuma esporulação ao microscópio. Nos tempos fixados, as linhagens se apresentavam, microscopicamente, semelhantes à figura abaixo (Figura 14).

Figura 14. Linhagem analisada ao microscópio óptico durante a padronização.

Assim, foi padronizado o tempo de incubação das diferentes linhagens, mostradas na tabela seguinte (Tabela 5).

Tabela 5 - Padronização dos tempos de incubação para extração de RNA

Linhagem	Tempo de crescimento (horas)
$\Delta cafA$	20
$\Delta cafB$	18
$\Delta cafC$	18
$\Delta cafD$	18
$\Delta cafA \Delta cafB$	23
$\Delta akuB^{ku80}$	18

Os testes de “microarray”, nos tempos e concentrações de CO_2 testados, não apontaram diferenças na expressão gênica entre as linhagens mutantes e selvagem quando analisados com valores de p de 0,0001 e 0,001. Mostrando que, nessas condições, os diversos homólogos da enzima anidrase carbônica não interferem na expressão gênica. Quando analisados com valor de p de 0,01 foram

apontados alguns genes diferencialmente expressos pelas linhagens, porém, a maioria foi de proteínas hipotéticas.

Os experimentos de “microarray” mostraram que, apesar da anidrase carbônica não interferir na expressão gênica nas condições testadas, muitos genes apresentaram mudança significativa em sua expressão quando o fungo se deparou com aumento ou diminuição na concentração de CO₂. Análises com valor de p de 0,0001 mostraram vários genes que tiveram sua expressão alterada quando as concentrações de CO₂ foram modificadas. Os valores de expressão considerados significativos foram aqueles nos quais os “gene means” (razão log2 Cy3/Cy5) foram maiores de 0,5 ou menores que -0,5.

A tabela a seguir mostra os genes que tiveram mudança significativa na expressão quando a concentração de CO₂ foi aumentada de 0,033% para 5% (Tabela 7). Valores negativos indicam que a expressão do gene é maior quando exposto a concentrações ambientais de CO₂ (0,033%), enquanto valores positivos indicam que a expressão é maior quando o fungo é exposto a 5% de CO₂.

Tabela 6 - Genes diferencialmente expressos quando o fungo é exposto a concentrações elevadas de CO₂ (5%).

ORF	Produto do gene	“Gene mean”	Função
Afu1g00500	FMN dependent dehydrogenase	1,083	Reações de óxido-redução
Afu1g00510	D-lactate dehydrogenase	1,025	Produção de piruvato
Afu1g03352	alpha-1,3-glucanase	0,601	Mobilização da mutana
Afu1g15490	MFS multidrug transporter	-0,534	Transporte
Afu2g00750	oxidoreductase	0,658	Reações de óxido-redução
Afu2g05350	MFS transporter	0,893	Transporte
Afu2g09340	fungal specific transcription factor	-0,592	Regulação da transcrição
Afu3g00180	short chain dehydrogenase	0,580	Reações de óxido-redução
Afu3g00650	aminopeptidase Y	-0,678	Degradação de proteínas

Continua

Continuação

ORF	Produto do gene	"Gene mean"	Função
Afu3g01070	tyrosinase	0,763	Produção de piomelanina
Afu3g11790	galactose-proton symport	0,517	Transporte
Afu3g15050	flavin-binding monooxygenase	0,536	Biossíntese de sideróforos
Afu4g01560	MFS myo-inositol transporter	-1,193	Transporte
Afu4g09440	sodium P-type ATPase	-0,596	Controle do efluxo de sódio
Afu4g11260	aldo-keto reductase	0,703	Reações de óxido-redução
Afu5g00710	GABA permease	0,514	Transporte de GABA
Afu5g09330	CipC-like antibiotic response protein	0,704	Função não definida – proteína hifa-específica
Afu5g13180	agmatinase	-0,721	Hidrólise da agmatina
Afu6g13790	flavin-binding monooxygenase	0,521	Biossíntese de sideróforos
Afu7g00390	MFS multidrug transporter	0,662	Transporte
Afu7g05550	sugar transporter family protein	0,574	Transporte
Afu7g06680	AAA family ATPase	-0,600	Degradação de proteínas
Afu8g01850	phosphate-repressible phosphate permease	-1,460	Transporte
Afu8g07210	hydroxymethylglutaryl-CoA synthase	0,702	Biossíntese do ergosterol

A tabela abaixo mostra os genes que tiveram mudança significativa na expressão quando a concentração de CO₂ foi diminuída de 5% de CO₂ para 0,033% (Tabela 8).

Tabela 7 - Genes diferencialmente expressos quando o fungo é exposto a concentrações diminuídas de CO₂ (0,033%).

ORF	Produto do gene	"Gene mean"	Função
Afu1g00500	FMN dependent dehydrogenase	0,983	Reações de óxido-redução
Afu1g00510	D-lactate dehydrogenase	0,814	Produção de piruvato

Continua

Continuação			
ORF	Produto do gene	“Gene mean”	Função
Afu1g12240	MFS peptide transporter	0,696	Transporte
Afu2g05350	MFS transporter	0,688	Transporte
Afu2g14610	oxalate decarboxylase	0,772	Degradação do oxalato
Afu2g15240	small oligopeptide transporter	0,755	Transporte
Afu3g11500	LipA and NB-ARC domain protein	1,431	Função desconhecida
Afu4g02650	MFS alpha-glucoside transporter	1,440	Transporte
Afu4g09440	sodium P-type ATPase	-0,827	Controle do efluxo de sódio
Afu5g01000	oxidoreductase	-1,456	Reações de óxido-redução
Afu6g00590	secreted peptide	1,655	Função desconhecida
Afu6g03540	malate synthase	0,792	Ciclo do glioxilato
Afu6g04500	Snf1 kinase complex beta-subunit Gal83	1,423	Resposta à privação de nutrientes
Afu6g07750	MFS phospholipid transporter	0,523	Transporte
Afu7g00390	MFS multidrug transporter	0,905	Transporte
Afu7g05550	sugar transporter family protein	0,812	Transporte

Além dos genes listados nas tabelas acima, proteínas hipotéticas também apresentaram “gene means” maiores de 0,5 e menores que -0,5, entretanto estas não foram incluídas nas tabelas.

O fungo modulou a expressão de diferentes genes quando submetido a variações na concentração de CO₂ e estes estão envolvidos nas mais variadas funções, tais como transporte, reações de óxido-redução, biossíntese de compostos importantes e até genes que ainda não tiveram sua função elucidada.

4.4 PCR em tempo real

De acordo com os resultados do “microarray”, oito genes foram escolhidos para a validação por qPCR: Afu1g03352, Afu2g00750, Afu2g14610, Afu3g01070,

Afu4g09440, Afu5g09330, Afu7g06680 e Afu8g07210. As sequências das sondas utilizadas para os experimentos de qPCR foram descritas previamente na Tabela 5, presente na seção materiais e métodos. O coeficiente de correlação entre os resultados obtidos por “microarray” e os obtidos por qPCR foi de 0,959, o que indica uma boa correlação e, portanto, validação dos dados. O gráfico abaixo mostra a proximidade entre os valores de expressão (razão log2) obtidos nas duas técnicas.

Gráfico 1 - Valores de expressão dos genes nos experimentos de “microarray” e qPCR.

Avaliando-se o gráfico, foi possível notar que os valores de expressão (razão log2 das intensidades de sinais das amostras em 5% de CO₂ em relação às amostras em 0,033% de CO₂) obtidos nos experimentos de qPCR acompanharam a tendência dos valores obtidos nos experimentos de “microarray”. Com os resultados validados, partiu-se para a escolha do gene a ser deletado.

4.5 Deleção gênica

O gene escolhido para a deleção foi o Afu5g09330, que codifica a proteína cipC. A deleção e sua confirmação foram realizadas utilizando-se os “primers” mostrados, anteriormente, na Tabela 5, presente na seção materiais e métodos. A confirmação da deleção foi feita utilizando-se diversas PCRs: confirmação por diferença de tamanho de fragmento entre linhagem selvagem ($\DeltaakuB^{ku80}$) e

mutante $\Delta cipC$, ausência de amplificação do fragmento correspondente ao gene *cipC* e confirmação da integração homóloga. Para a confirmação por diferença de tamanho, foram utilizados os “primers” *cipC* 5' Fw e *cipC* 3' Rv (Figura 15); para a confirmação por ausência de amplificação utilizou-se os “primers” *cipC* ORF Fw e Rv; e para confirmação da integração homóloga, os “primers” *cipC* 2,2 5' Fw e *pyrG* Rv (Figura 16).

Figura 15. PCR para confirmação da deleção do gene *cipC* na linhagem selvagem $\Delta akuB^{ku80}$, por diferença de tamanho.

Figura 16. PCR para confirmação da deleção do gene *cipC* na linhagem selvagem $\Delta akuB^{ku80}$: A) por ausência de amplificação e B) confirmação da recombinação homóloga.

Após a obtenção da linhagem mutante, chamada então de $\Delta cipC$, partiu-se para a caracterização dessa linhagem.

4.6 Caracterização do gene *cipC*

4.6.1 Caracterização microscópica (microcultivo)

A deleção do gene *cipC* não proporcionou nenhuma alteração nas estruturas dos conidióforos do fungo *A. fumigatus*. A análise microscópica do mutante $\Delta cipC$ e da linhagem selvagem $\Delta akuB^{ku80}$ cultivadas em 0,033% e em 5% de CO₂ demonstrou conidióforos semelhantes, o que pode ser observado nas figuras abaixo (Figuras 17 e 18).

Figura 17. Conidióforos da linhagem mutante, $\Delta cipC$ (A), e selvagem, $\Delta akuB^{ku80}$ (B), observados ao microscópio óptico (40x). Fotos obtidas em microcultivo incubado em concentrações ambientais (0,033%) de CO₂, durante 48 horas.

Figura 18. Conidióforos da linhagem mutante, $\Delta cipC$ (A), e selvagem, $\Delta akuB^{ku80}$ (B), observados ao microscópio óptico (40x). Fotos obtidas em microcultivo incubado em 5% de CO_2 , durante 48 horas.

4.6.2 Testes de sensibilidade por “drop-out”

Nos testes de sensibilidade, o mutante $\Delta cipC$ apresentou diferença na sensibilidade com relação ao selvagem, $\Delta akuB^{ku80}$, para alguns compostos testados. Compostos como o ácido acético, calcoflúor e menadiona provocaram diferenças na sensibilidade. Os testes com os demais compostos não apresentaram diferença na sensibilidade entre as linhagens. Os resultados são apresentados nas figuras seguintes (Figuras 19-26).

Figura 19. Efeito do promotor de apoptose, ácido acético (20 mM) sobre o crescimento radial da linhagem mutante $\Delta cipC$ (A) e da linhagem selvagem $\Delta akuB^{Ku80}$ (B).

A linhagem deletada apresentou menor sensibilidade ao ácido acético em relação à selvagem, independente da concentração de CO_2 .

Figura 20. Efeito do promotor de estresse de parede celular, calcoflúor (20 $\mu g/mL$) sobre o crescimento radial da linhagem mutante $\Delta cipC$ (A) e da linhagem selvagem $\Delta akuB^{Ku80}$ (B).

Nos testes com calcoflúor, o mutante $\Delta cipC$ apresentou maior sensibilidade ao composto que o selvagem, nas duas concentrações de CO_2 testadas.

Figura 21. Efeito do promotor de estresse oxidativo, menadiona (10 μM) sobre o crescimento radial da linhagem mutante $\Delta cipC$ (A) e da linhagem selvagem $\Delta akuB^{Ku80}$ (B).

Os testes com menadiona mostraram diferenças na sensibilidade das linhagens: em concentrações ambientais de CO_2 , a linhagem $\Delta cipC$ apresentou-se mais sensível que a selvagem; já em 5%, as duas linhagens apresentaram sensibilidade semelhante.

Figura 22. Efeito dos antifúngicos, (1) anfotericina B (0,1 $\mu\text{g/mL}$), (2) anidulafungina (10 ng/mL), (3) cetoconazol (4 $\mu\text{g/mL}$), (4) fluconazol (300 $\mu\text{g/mL}$), (5) itraconazol (1,5 $\mu\text{g/mL}$), (6) nistatina (3,5 UI/mL) e (7) terbinafina (0,2 $\mu\text{g/mL}$) sobre o crescimento radial da linhagem mutante ΔcipC (A) e da linhagem selvagem $\Delta\text{akuB}^{\text{Ku80}}$ (B).

Os testes de sensibilidade com antifúngicos não mostraram nenhuma diferença na sensibilidade entre as linhagens, nas duas concentrações de CO₂ testadas.

Figura 23. Efeito dos agentes promotores de estresse iônico, (1) CaCl₂ (400 mM), (2) MgSO₄ (400 mM) e (3) NaCl (500 mM) sobre o crescimento radial da linhagem mutante $\Delta cipC$ (A) e da linhagem selvagem $\Delta akuB^{Ku80}$ (B).

Para os agentes promotores de estresse iônico, não houve diferença na sensibilidade entre as linhagens $\Delta cipC$ e $\Delta akuB^{Ku80}$, nas duas concentrações de CO₂ testadas.

Figura 24. Efeito dos agentes promotores de estresse de parede celular, (1) Vermelho congo (75 µg/mL) e (2) SDS (0,0075%) sobre o crescimento radial da linhagem mutante $\Delta cipC$ (A) e da linhagem selvagem $\Delta akuB^{Ku80}$ (B).

Nos testes com os agentes promotores de estresse na parede celular, vermelho congo e SDS, o mutante $\Delta cipC$ apresentou sensibilidade semelhante ao selvagem, em ambas as concentrações de CO₂.

Figura 25. Efeito do agente promotor de estresse nitroativo, nitroprussiato de sódio (0,3 mM) sobre o crescimento radial da linhagem mutante $\Delta cipC$ (A) e da linhagem selvagem $\Delta akuB^{Ku80}$ (B).

O estresse nitroativo não provocou diferenças na sensibilidade entre as linhagens, em nenhuma das duas concentrações de CO₂ testadas.

Figura 26. Efeito dos agentes promotores de estresse oxidativo, (1) H_2O_2 (2 mM) e (2) paraquat (2,5 mM) sobre o crescimento radial da linhagem mutante $\Delta cipC$ (A) e da linhagem selvagem $\Delta akuB^{ku80}$ (B).

Os testes com os agentes promotores de estresse oxidativo, H_2O_2 e paraquat, não provocaram nenhuma diferença na sensibilidade entre as linhagens. Entretanto, assim como nos testes de sensibilidade com os mutantes com os genes das anidrases carbônicas deletados, foi possível notar uma diminuição drástica na esporulação nos testes utilizando-se o Paraquat.

4.6.3 Testes de virulência

Os testes de virulência em modelo animal demonstraram uma atenuação da virulência da linhagem deletada $\Delta cipC$ em relação à selvagem $\Delta akuB^{ku80}$, como pode ser visualizado no gráfico abaixo (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Curva de sobrevivência relativa aos testes de virulência em modelo animal.

Como já foi descrito anteriormente, o papel das anidrases carbônicas no desenvolvimento e virulência de diversos patógenos tem sido investigado. Já foi demonstrado que a deleção dessas enzimas impede o desenvolvimento de *C. neoformans* em concentrações atmosféricas de CO₂ e mutantes que apresentam essa deleção requerem altas concentrações desse composto para o desenvolvimento. Em *C. albicans*, a deleção destas enzimas também impede o desenvolvimento em 0,033% de CO₂ e afeta o processo de filamentação do fungo (BAHN et al., 2005; HUANG et al., 2009; MOGENSEN et al., 2006).

A linhagem utilizada nesse trabalho, que possui os dois homólogos constitutivos da anidrase carbônica deletados ($\Delta cafA \Delta cafB$), também apresenta a incapacidade de se desenvolver sob concentrações ambientais de CO₂ assim como os organismos citados no parágrafo anterior (BAHN et al., 2005; HAN et al., 2010; HUANG et al., 2009).

Os resultados do microcultivo mostraram que a deleção das anidrases carbônicas não afetou a formação dos conidióforos; entretanto, Bahn e colaboradores (2005) demonstraram que a deleção da principal anidrase carbônica de *C. neoformans*, Can2, interfere no desenvolvimento dos basidiósporos, mas não na filamentação. Em *C. albicans*, a deleção da enzima interfere no processo de filamentação do fungo, como foi demonstrado por Klengel e colaboradores (2005).

No presente trabalho, os testes de sensibilidade evidenciaram algumas diferenças na sensibilidade a alguns compostos. O primeiro deles foi o ácido acético, ácido fraco que induz a apoptose. Sabe-se que a apoptose, ou morte celular programada, é descrita na maioria dos sistemas vivos, incluindo eubactérias, protozoários, fungos e animais. Aparentemente, os sinalizadores que participam deste processo são similares em todos os organismos, porém, algumas diferenças têm sido descritas, o que, no caso de patógenos, é alvo de estudos para o desenvolvimento de novas terapias (PHILLIPS; SUDBERY; RAMSDALE, 2003; RAMSDALE, 2008).

Ludovico e colaboradores (2002) demonstraram que doses entre 20 e 80 mM de ácido acético levam a levedura *S. cerevisiae* à apoptose e que esta indução está relacionada com a ativação da via intrínseca da mesma, com o

envolvimento de mitocôndrias e produção de espécies reativas de oxigênio por esta organela. Philips, Subdery e Ramsdale (2003), em seu estudo com apoptose na levedura patogênica *C. albicans*, constataram que 40 mM de ácido acético levam esta levedura à morte celular programada. Nesta levedura, o gasto energético para manter o pH intracelular parece ser muito alto, o que modifica a razão ADP/ATP e, provavelmente, leva à apoptose. Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que as linhagens que apresentam os homólogos da enzima anidrase carbônica deletados apresentaram reduzida sensibilidade ao ácido acético; como essas enzimas estão envolvidas no processo de regulação do pH intracelular e o ácido acético promove a apoptose justamente pela alteração do mesmo, a deleção das anidrases carbônicas parece favorecer a adaptação à apoptose provocada por esse composto.

Outro composto cujos testes apresentaram diferença na sensibilidade foi o peróxido de hidrogênio, que é um promotor de estresse oxidativo, pró-apoptótico em baixas concentrações e pró-necrótico em altas. Nos testes utilizando-se esse composto, as linhagens mutantes apresentaram sensibilidade diminuída em relação a selvagem (AMIM; MOUSAVI; ROBSON, 2004; HAMANN; BRUST; OSIEWACZ, 2008; RAMSDALE, 2008).

O H_2O_2 é uma espécie reativa de oxigênio capaz de causar vários danos às células através de danos aos lipídeos, DNA e proteínas, e, portanto, existem métodos de proteção contra esse composto, que podem ser não-enzimáticos, consistindo em substâncias antioxidantes, e enzimáticos que, no caso do peróxido de hidrogênio, consiste nas enzimas catalases (ANGELOVA et al., 2005; KREINER; HARVEY; MCNEIL, 2002).

Valiante e colaboradores (2008) demonstraram a importância das proteínas quinases ativadas por mitógenos no processo de resposta ao estresse oxidativo causado por menadiona e peróxido de hidrogênio: o estudo utilizou mutantes de *A. fumigatus* com os genes das proteínas quinases ativadas por mitógenos deletados e estas linhagens demonstraram maior suscetibilidade à menadiona e menor suscetibilidade ao peróxido de hidrogênio. No trabalho foi sugerido que essas proteínas podem ser parte da resposta do fungo ao estresse oxidativo e que o aumento da tolerância ao H_2O_2 pode ser explicado pela parede celular

defeituosa, já que paredes celulares atípicas permitem uma maior secreção de enzimas extracelulares que detoxificam o peróxido de hidrogênio presente no meio de cultura. Os resultados do presente estudo mostraram que a deleção das anidrases carbônicas em *A. fumigatus* diminuiu a sensibilidade do fungo a esse composto, entretanto, a parede celular do fungo aparentemente não foi afetada, já que os testes com compostos que lesam a parede celular não apresentaram diferenças entre as linhagens mutantes e selvagem. Os outros dois compostos geradores de estresse oxidativo testados, menadiona e paraquat, não promoveram diferença na sensibilidade entre as linhagens; fato que pode ser explicado pela diferença entre as vias utilizadas para a produção do estresse oxidativo, já que esses dois compostos se utilizam do ânion superóxido, que, por sua vez, não é produzido pelo peróxido de hidrogênio (ANGELOVA et al., 2005; KREINER; HARVEY; MCNEIL, 2002).

A sensibilidade frente aos outros compostos testados não foi alterada pela deleção das anidrases carbônicas. Nos testes com antifúngicos, agentes promotores de estresse de parede celular e estresse iônico, as linhagens mutantes apresentaram a mesma sensibilidade em relação à selvagem. Esses resultados indicam que a parede celular do fungo não foi afetada pela deleção dos homólogos da enzima anidrase carbônica, já que a maioria dos antifúngicos age na desestabilização da mesma e a resposta ao estresse iônico necessita de parede celular íntegra (DAMVELD et al., 2005; PLAINE et al., 2008).

Os testes com o promotor de estresse nitroativo, nitroprussiato de sódio, também não evidenciaram diferença de sensibilidade entre as linhagens. Estudos indicam que a proteína quinase C e a flavohemoglobina YHB1 são importantes na resposta ao estresse nitroativo, pois induzem proteínas envolvidas nos reparos aos danos causados pelo estresse, como as chaperonas, oxidoredutases e tioredoxinas redutases, e na detoxificação, como a flavohemoglobina denitrosilase e NADPH desidrogenase. Porém nenhum estudo apontou as anidrases carbônicas como parte da resposta a esse tipo de estresse (BROWN; HAYNES; QUINN, 2009; KIM et al., 2001).

Quanto aos experimentos de expressão gênica, foi possível verificar que a deleção das anidrases carbônicas não interferiu significativamente na expressão

gênica global dos mutantes frente às concentrações de CO₂ e tempos testados. Entretanto, foi possível verificar que o fungo modifica a expressão de genes para se adaptar ao aumento ou diminuição na concentração desse composto.

Muitos genes regulados positivamente pelo gene *SrbA*, que coordena e regula os genes responsáveis pela aquisição de ferro e biossíntese do ergosterol na hipóxia, tiveram sua expressão aumentada quando as concentrações de CO₂ foram aumentadas e, com o aumento deste gás, a concentração de oxigênio diminui. Um destes genes foi o *Afu8g07210*, que codifica a enzima HMG-CoA synthase, participante da biossíntese do ergosterol; os genes responsáveis por esse processo são os mais regulados durante a hipóxia. Outro gene, o *Afu2g00750*, que traduz uma oxidoredutase, também está envolvido na adaptação ao aumento de CO₂: essas enzimas estão envolvidas no sistema de captação de ferro do fungo e este é ativado em situações de hipóxia e é importante na colonização (BARKER et al., 2012; BLATZER et al., 2011; HARTMANN et al., 2011).

Além dos genes regulados pelo gene *SrbA*, outros genes tiveram sua expressão regulada positivamente com o aumento de CO₂; é o caso do *Afu1g03352*, que codifica uma α -glucanase, que já foi apontada por Hartl e colaboradores (2011) como responsável pela remodelação da parede celular, juntamente com a enzima β -1,3 glucanase. Sabe-se que *A. fumigatus* pode remodelar sua parede celular de acordo com as necessidades, o que é um processo importante para a colonização (ABAD et al., 2010). O gene que codifica a enzima tirosinase, o *Afu3g01070*, também apresentou aumento de sua expressão em altas concentrações de CO₂. Essa enzima participa do processo de formação de piomelanina, um pigmento semelhante à melanina, que confere proteção ao fungo contra oxidantes, alta temperatura, raios ultravioleta e agentes antifúngicos (SHANG et al., 2012; VALIANTE et al., 2009). Da mesma maneira, no presente trabalho, o gene *Afu5g09330* foi regulado positivamente e foi o escolhido para a deleção. Esse gene codifica a proteína CipC, que é a principal proteína hifa-específica do fungo *A. fumigatus* e é diferencialmente expressa na germinação deste (BAUER et al., 2009). Foi apontada por Kubitschek-Barreira e colaboradores (2013) como potencial alvo de novas drogas.

O gene Afu7g06680, codificador da proteína AAA Family ATPase, teve sua expressão diminuída quando o fungo foi submetido a um aumento na concentração de CO₂. Essa proteína faz parte de uma família presente em todos os reinos e que está envolvida em várias funções, que vão desde a degradação de proteínas até a replicação do DNA. Em *A. fumigatus*, essa proteína é regulada positivamente quando o fungo é exposto ao voriconazol e acredita-se que medeia reações proteína-proteína envolvidas na adaptação do fungo a esse antifúngico (FERREIRA et al., 2006; HANSON; WHITEHEART, 2005).

Quando o fungo foi submetido a uma diminuição da concentração de CO₂, um dos genes que teve a sua expressão negativamente regulada foi o gene Afu2g14610, que codifica a proteína oxalate decarboxylase. Essa enzima é responsável pela degradação do formato, que é tóxico para alguns organismos (IMARAM et al., 2011).

Finalmente, o gene Afu4g09440 teve sua expressão modificada significativamente em duas situações: aumento e diminuição de CO₂, sendo negativamente regulado na primeira e positivamente na segunda. Esse gene codifica a proteína Sodium p-type ATPase, que medeia o efluxo de sódio e é necessária à adaptação de fungos e protozoários ao ambiente. Em *C. neoformans*, sua deleção provoca a anulação da virulência e é apontado como um potencial alvo, já que não apresenta homólogos em células animais (RODRÍGUEZ-NAVARRO; BENITO, 2010).

Após a deleção do gene *cipC*, a caracterização deste novo mutante foi realizada. Pouco se sabe sobre este gene e existe, até o momento somente um trabalho com mutantes com esse gene deletado: um trabalho recentemente publicado por Crespo-Sempere e colaboradores, que caracterizou esse gene no fungo *Aspergillus carbonarius*. Sabe-se que esse gene apresenta homólogos somente no reino fungi e que ocorre, preferencialmente, em fungos filamentosos. Portanto, não apresenta homólogos em células de mamíferos, o que o caracteriza como um possível alvo terapêutico. A proteína codificada por esse gene é expressa somente pelas hifas do fungo, que é a estrutura de disseminação e destruição dos tecidos do hospedeiro. Além disso, foram documentadas superexpressões desta proteína na fase filamentosa de *Ustilago maydis*, um

fitopatígeno, bem como em casos de meningite causada por *C. neoformans* e em *A. nidulans*, em resposta a exposição à concanamicina (BAUER et al., 2009; KUBITSCHKE-BARREIRA et al., 2013).

A caracterização fenotípica microscópica do mutante $\Delta cipC$ não evidenciou mudanças na estrutura dos conidióforos da linhagem mutante de *A. fumigatus*, assim como Crespo-Sempere e colaboradores (2013) não detectaram nenhuma diferença no crescimento e morfologia da colônia em seu mutante.

No teste com o promotor de apoptose, ácido acético, o mutante $\Delta cipC$ apresentou-se mais resistente que a linhagem selvagem $\Delta akuB^{ku80}$, o que entra em conflito com trabalhos anteriores, que afirmam que essa proteína seria uma proteína de resposta ao estresse. Entretanto, os testes com o agente estressante de parede celular, calcoflúor, e o promotor de estresse oxidativo, menadiona, revelaram uma maior sensibilidade do mutante ao composto, o que vai de acordo com a afirmação de resposta ao estresse (CRESPO-SEMPERE et al., 2013).

Quanto aos demais agentes estressantes testados, nenhum outro evidenciou diferenças na sensibilidade entre as linhagens mutante e selvagem.

Um resultado relevante foi o obtido pelo teste de virulência em modelo animal, que demonstrou uma atenuação da virulência do mutante $\Delta cipC$, comparado à linhagem selvagem, reforçando, assim, a indicação de possível alvo terapêutico.

6. CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho levam às seguintes conclusões:

- Não houve alteração nas estruturas de reprodução assexual das linhagens mutantes em relação à linhagem selvagem, o que sugere o não envolvimento das anidrases carbônicas nesse processo.
- As anidrases carbônicas parecem não estar envolvidas na resposta ao estresse causado pelos antifúngicos e por agentes indutores de estresse iônico e na parede celular.
- A expressão gênica do fungo *A. fumigatus* é afetada pelas mudanças na concentração de CO₂, entretanto, as anidrases carbônicas não interferem de modo significativo nesse processo.
- O gene *cipC* está envolvido na adaptação do fungo às mudanças na concentração de CO₂.
- Não houve alteração nas estruturas de reprodução assexual da linhagem mutante $\Delta cipC$ em relação à linhagem selvagem, o que sugere o não envolvimento do gene *cipC* nesse processo. Entretanto, este é importante para a resposta do fungo frente a alguns compostos estressantes e para a virulência do mesmo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

¹ De acordo com a Associação de Normas Técnicas. NBR 6023

ABAD, A. et al. What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 4, n. 27, p. 155-182, 2010.

AGILENT. **Two-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis (Low Input Quick Amp Labeling) Protocol**. Estados Unidos, 2010, 92 p.

ALMAJAN, G.L. et al. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of the cytosolic and tumor-associated carbonic anhydrase isozymes I, II, and IX with a series of 1,3,4-thiadiazole- and 1,2,4-triazole-thiols. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, n. 15, p. 2347-2352, 2005.

AMIM, S.; MOUSAVI, A.; ROBSON G.D. Oxidative and amphotericin B-mediated cell death in the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus* is associated with an apoptotic-like phenotype. **Microbiology**, n.150, p. 1937–1945, 2004.

ANGELOVA, M. B., et al. Oxidative stress response of filamentous fungi induced by hydrogen peroxide and paraquat. **Mycological Research**, n.2, v. 109, p. 150–158, 2005.

ASARE, K.A. et al. Sternal osteomyelitis caused by *Aspergillus fumigatus* following cardiac surgery: Case and review. **Medical Mycology Case Reports**, n. 2, p. 4-6, 2013.

BAHN, Y.S. et al. Carbonic Anhydrase and CO₂ Sensing during *Cryptococcus neoformans* Growth, Differentiation, and Virulence. **Current Biology**, v. 15, p. 2013–2020, 2005.

BARKER, B.M. et al. Transcriptomic and proteomic analyses of the *Aspergillus fumigatus* hypoxia response using an oxygen-controlled fermenter. **BMC Genomics**, v. 13, n. 62, 2012.

BAUER, B. et al. Characterization of the CipC-like protein AFUA_5G09330 of the opportunistic human pathogenic mould *Aspergillus fumigatus*. **Mycoses**, n. 53, p. 296–304, 2009.

BLATZER, M. et al. SREBP Coordinates Iron and Ergosterol Homeostasis to Mediate Triazole Drug and Hypoxia Responses in the Human Fungal Pathogen *Aspergillus fumigatus*. **Plos Genetics**, v. 7, n. 12, 2011.

BROWN, J.P.; HAYNES, K.; QUINN, J. Nitrosative and oxidative stress responses in fungal pathogenicity. **Current Opinion in Microbiology**, n. 12, p. 384–391, 2009.

BUER, J.; BALLING, R. Mice, Microbes and Models of Infection. **Nature Reviews**, v. 4, p. 195-205, 2003.

BUITRAGO, M.J. et al. Detección de *Aspergillus* spp. mediante PCR en tiempo real en un modelo murino de infección pulmonar. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 23, n. 8, p. 464-468, 2005.

CHENG, J.C. Rapid Detection and Identification of Clinically Important Bacteria by High-Resolution Melting Analysis after Broad-Range Ribosomal RNA Real-Time PCR. **Clinical Chemistry**, v. 52, n. 11, p. 1997–2004, 2006.

CRESPO-SEMPERE, A. et al. Characterization and disruption of the *cipC* gene in the ochratoxigenic fungus *Aspergillus carbonarius*. **Food Research International**, v. 54, p. 697-705, 2013.

COLOT, H.V. et al. A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. **PNAS**, v. 103, n. 27, p.10352–10357, 2006.

DAMVELD, R.A. et al. Characterization of CwpA, a putative glycosylphosphatidylinositol anchored cell wall mannoprotein in the Filamentous fungus *Aspergillus niger*. **Fungal Genetics and Biology**, n. 42, p. 873-885, 2005.

ELLEUCHE, S.; PÖGGELER, S. Carbonic anhydrases in fungi. **Microbiology**, n. 156, p.23-29, 2010.

FERREIRA, M.E.S. et al. The *akuBKU80* Mutant Deficient for Nonhomologous End Joining Is a Powerful Tool for Analyzing Pathogenicity in *Aspergillus fumigatus*. **Eukaryotic Cell**, v. 5, n. 1, p. 207–211, 2006.

FERREIRA, M.E.S. et al. Transcriptome analysis of *Aspergillus fumigatus* exposed to voriconazole. **Current Genetic**, n. 50, p. 32-44, 2006.

FORTÚN, J. et al. Aspergillosis. Formas clínicas y tratamiento. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, n.30, v. 4, p.201-208, 2012.

GIBBONS, J.G.; ROKAS, A. The function and evolution of the *Aspergillus* genome. **Trends in Microbiology**, v. 21, n. 1, p. 14-22, 2013.

GONDO, Y. Trends in large-scale mouse mutagenesis: from genetics to functional genomics. **Nature Reviews**, v. 9, p. 803- 810, 2008.

HAMANN, A.; BRUST, D.; OSIEWACZ, H. Apoptosis pathways in fungal growth, development and ageing. **Trends in Microbiology**, n. 16, v. 6, p. 276-283, 2008.

HAN, K.-H.; et al. The conserved and divergent roles of carbonic anhydrases in the filamentous fungi *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus nidulans*. **Molecular Microbiology**, v. 75, n. 6, p. 1372-1388, 2010.

HANSON, P.I.; WHITEHEART, S.W. AAA+ Proteins: Have Engine, Will Work. **Nature Reviews**, v.6, p. 519-529, 2005.

HARTL, L. et al. Characterization of the GPI-anchored endo β -1,3-glucanase Eng2 of *Aspergillus fumigatus*. **Fungal Genetics and Biology**, n. 48, p. 185-191, 2011.

HARTMANN T. et al. Shaping the fungal adaptome – Stress responses of *Aspergillus fumigatus*. **International Journal of Medical Microbiology**, n. 301, p. 408-416, 2011.

HOPE, W.W. et al. The Initial 96 Hours of Invasive Pulmonary Aspergillosis: Histopathology, Comparative Kinetics of Galactomannan and (133)-_D- Glucan, and Consequences of Delayed Antifungal Therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 11, p. 4879-4886, 2010.

HUANG, G. et al. CO₂ Regulates White-Opaque Switching in *Candida albicans*. **Current Biology**, v. 19, n. 4, p. 330-334, 2009.

IMARAM, W. et al. EPR spin trapping of an oxalate-derived free radical in the oxalate decarboxylase reaction. **Free Radical Biology & Medicine**, n. 50, p. 1009-1015, 2011.

INNOCENTI, A. et al. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of the fungal β -carbonic anhydrases from *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* with boronic acids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, n. 19, p. 2642-2645, 2009.

JANUCHOWSKI, R. et al. Microarray-based detection and expression analysis of ABC and SLC transporters in drug-resistant ovarian cancer cell lines. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 67, n. 3, p. 240-245, 2013.

KARAKACH, T.K. et al. An introduction to DNA microarrays for gene expression analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, n. 104, p. 28-52, 2010.

KIM, P.K.M.; et al. The regulatory role of nitric oxide in apoptosis. **International Immunopharmacology**, n.1, p. 1421–1441, 2001.

KLENGEL, T. et al. Fungal Adenylyl Cyclase Integrates CO₂ Sensing with cAMP Signaling and Virulence. **Current Biology**, n. 15, v. 22, p. 2021-2026, 2005.

KNIEMEYER, O. et al. Identification of virulence determinants of the human pathogenic fungi *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* by proteomics. **International Journal of Medical Microbiology**, n. 301, p. 368-377, 2011.

KREINER, M.; HARVEY, L.M.; MCNEIL, B. Oxidative stress response of a recombinant *Aspergillus niger* to exogenous menadione and H₂O₂ addition. **Enzyme and Microbial Technology**, n.30, p. 346–353, 2002.

KUBISTA, M. et al. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, n. 27, p. 95-125, 2006.

KUBITSCHECK-BARREIRA et al. Differential proteomic analysis of *Aspergillus fumigatus* morphotypes reveals putative drug targets. **Journal of Proteomics**, n. 78, p. 522-534, 2013.

LACAZ, C.S. et al. **Tratado de micologia médica Lacaz**. 9 ed. São Paulo: Sarvier, 2002, 1104 p.

LIEBMANN, B. et al. Deletion of the *Aspergillus fumigatus* lysine biosynthesis gene *lysF* encoding homoaconitase leads to attenuated virulence in a low-dose mouse infection model of invasive aspergillosis. **Archives of Microbiology**, n. 181, p. 378-383, 2004.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} Method. **Methods**, n. 25, p. 402–408, 2001.

LÓPEZ-CORTÉS, L.E. et al. Aspergilosis invasora con afectación extrapulmonar: patogenia, características clínicas y pronóstico. **Revista Iberoamericana de Micología**, n. 29, v. 3, p. 139-143, 2012.

LUDOVICO, P. et al. Cytochrome c Release and Mitochondria Involvement in Programmed Cell Death Induced by Acetic Acid in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Biology of the Cell**, n.13, p. 2598–2606, 2002.

MALAVAZI, I.; GOLDMAN, G.H. Gene Disruption in *Aspergillus fumigatus* Using a PCR-Based Strategy and In Vivo Recombination in Yeast. **Methods in Molecular Biology**, v. 845, 2012.

MOGENSEN, E.G. et al. *Cryptococcus neoformans* Senses CO₂ through the Carbonic Anhydrase Can2 and Adenylyl Cyclase Cac1. **Eukaryotic Cell**, v. 5, n. 1, p. 103-111, 2006.

MORISHITA, S. et al. Cloning, polymorphism, and inhibition of β-carbonic anhydrase of *Helicobacter pylori*. **Journal of Gastroenterology**, n. 43, p. 849-857, 2008.

MOUYNA, I. et al. Gene silencing with RNA interference in the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 237, p. 317-324, 2004.

NIERMAN, W.C. et al. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. **Nature**, v. 438, p.22-29, 2005.

NILSSON, J.R.; RESTREPO, C.S.; JARGIDAR, J. Two cases of endobronchial carcinoid masked by superimposed aspergillosis: a review of the literature of primary lung cancers associated with *Aspergillus*. **Annals of Diagnostic Pathology**, n. 17, p. 131-136, 2013.

PAN, W. A comparative review of statistical methods for discovering differentially expressed genes in replicated microarray experiments. **Bioinformatics**, v. 18, n. 4, p. 546-554, 2002.

PARK, J.Y. et al. Application of amplified RNA and evaluation of cRNA targets for spotted-oligonucleotide microarray. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, n. 325, p. 1346-1352, 2004.

PATHAK, E. et al. Use of real-time PCR to discriminate parasitic and saprophagous behavior by nematophagous fungi. **Fungal Biology**, n. 116, p. 563-573, 2012.

PHILLIPS, A. J.; SUDBERY, I.; RAMSDALE, M. Apoptosis induced by environmental stresses and amphotericin B in *Candida albicans*. **PNAS**, v. 100, n. 24, p. 14327-14332, 2003.

PLAINE, A. et al. Functional analysis of *Candida albicans* GPI-anchored proteins: Roles in cell wall integrity and caspofungin sensitivity. **Fungal Genetics and Biology**, n. 45, p. 1404-1414, 2008.

RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, v. 1, p. 17-20, 1985.

RAM, A.F.J.; KLIS, F.M. Identification of fungal cell wall mutants using susceptibility assays based on Calcofluor white and Congo red. **Nature Protocols**, v.1, n. 5, p. 2253-2256, 2006.

RAMSDALE, M. Programmed cell death in pathogenic fungi. **Biochimica et Biophysica Acta**, n.1783, p. 1369–1380, 2008.

RODRÍGUEZ-NAVARRO, A.; BENITO, B. Sodium or potassium efflux ATPase A fungal, bryophyte, and protozoal ATPase. **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 1798, p. 1841-1853, 2010.

SAMBROOK, J., RUSSEL, D.W. 2001. **Molecular Cloning: A laboratory Manual**. Cold Spring Harbour Laboratory Press. New York.

SCHINDLER, H. et al. cRNA target preparation for microarrays: Comparison of gene expression profiles generated with different amplification procedures. **Analytical Biochemistry**, n. 344, p. 92-101, 2005.

SCHLICKER, C. et al. Structure and Inhibition of the CO₂-Sensing Carbonic Anhydrase Can2 from the Pathogenic Fungus *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Molecular Biology**, n. 385, p. 1207-1220, 2009.

SHANG, Y. et al. Improving UV resistance and virulence of *Beauveria bassiana* by genetic engineering with an exogenous tyrosinase gene. **Journal of Invertebrate Pathology**, n. 109, p. 105-109, 2012.

SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, 380p.

STEINBACH, W.J. et al. Clinical epidemiology of 960 patients with invasive aspergillosis from the PATH Alliance registry. **Journal of Infection**, n. 65, p. 453-464, 2012.

TAKAHASHI, T. et al. Development of an efficient gene-targeting system in *Aspergillus luchuensis* by deletion of the non-homologous end joining system. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 112, n. 6, p. 529–534, 2011.

VALIANTE, V. et al. The mitogen-activated protein kinase MpkA of *Aspergillus fumigatus* regulates cell wall signaling and oxidative stress response. **Fungal Genetics and Biology**, n. 45, p. 618–627, 2008.

VALIANTE, V. et al. The MpkA MAP kinase module regulates cell wall integrity signaling and pyomelanin formation in *Aspergillus fumigatus*. **Fungal Genetics and Biology**, n. 46, p. 909-918, 2009.

WALL, R.J.; SHANI, M. Are animal models as good as we think? **Theriogenology**, n. 69, p. 2-9, 2008.

WEZENSKY, S. J.; CRAMER JR, R.A. Implications of Hypoxic Microenvironments During Invasive Aspergillosis. **Medical Mycology**, v. 49, n. 1, 2011.

WILES, S. et al. Modeling infectious disease — time to think outside the box? **Nature Reviews**, v. 4, p.307-312, 2006.

Anexo A – Meios de Cultura

1) Meio mínimo (MM)

Glicose	1% (p/v)
Ágar	2% (p/v)
Solução de sais	0,5% (v/v)
Solução de elementos traços	0,1% (v/v)

Dissolver todos os componentes em água destilada, ajustar o pH para 6,5 com NaOH 4N, esterilizar em autoclave a 121°C, 1kgf/cm², durante 20 minutos.

2) Meio completo (YAG)

Glicose	2% (p/v)
Ágar	1,7% (p/v)
Extrato de levedura	0,5% (p/v)
Solução de elementos traços	0,1% (v/v)

Dissolver todos os componentes em água destilada e esterilizar em autoclave a 121°C, 1kgf/cm², durante 20 minutos. Para os experimentos de deleção gênica, o meio deve ser suplementado com 0,6 M de cloreto de potássio e conter, em sua superfície, o Top Ágar, que é o meio YAG suplementado com 0,6 M de cloreto de potássio e com menor concentração de ágar (1%). O meio completo pode ser suplementado com uridina e uracila quando necessário e, nesse caso, a concentração destes compostos é de 0,12%.

3) Meio YPD

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

Dissolver todos os componentes em água destilada e esterilizar em autoclave a 121°C, 1kgf/cm², durante 20 minutos.

4) Meio SC URA⁻

Glicose	2% (p/v)
Ágar	1,7% (p/v)
Base nitrogenada de levedura	0,7% (p/v)
Leucina	0,01% (p/v)
Lisina	0,01% (p/v)
Triptofano	0,01% (p/v)
Histidina	0,005% (p/v)

Dissolver todos os componentes em água destilada e esterilizar em autoclave a 121°C, 1kgf/cm², durante 20 minutos.

Anexo B – Soluções e Tampões**1) Solução de sais**

Nitrato de sódio	1,4 M
Cloreto de potássio	0,14 M
Dihidrogenofosfato de potássio	0,22 M
Sulfato de magnésio heptahidratado	0,04 M

Dissolver todos os componentes em água destilada.

2) Solução de elementos traços

Sulfato de zinco heptahidratado	75 mM
Ácido bórico	180 mM
Cloreto de manganês tetra hidratado	25 mM
Sulfato de ferro heptahidratado	18 mM
Cloreto de cobalto heptahidratado	6 mM
Sulfato de cobre pentahidratado	6 mM
Molibdato de amônio tetra hidratado	1 mM
EDTA	134 mM

Adicionar os reagentes na ordem listada em 300 mL de água destilada. Aquecer até ferver e resfriar até 60°C. Ajustar o pH para 6,5 a 6,8, com KOH 4M. Resfriar a temperatura ambiente.

3) TE 10x, pH 7,6

TRIS-HCl, 1M, pH 7,6	100 mM
EDTA, 0,5 M, pH 8,0	100 mM

De acordo com o volume desejado, homogeneizar os volumes das soluções de modo que a concentração final de cada um seja 100 mM, completar o volume com água destilada e esterilizar em autoclave a 121°C, 1kgf/cm², durante 20 minutos.

4) LiOAc 10x (1M)

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

De acordo com o volume desejado, pesar o acetato de lítio e dissolver em água destilada. Acertar o pH para 7,5 com ácido acético diluído e esterilizar em autoclave a 121°C, 1kgf/cm², durante 20 minutos.

5) Solução TE 1x/LiOAc 1x

LiOAc 10x	0,1 mL
TE 10x	0,1 mL
Água destilada estéril	0,8 mL

Homogeneizar os componentes. A solução deve ser preparada na hora do uso.

6) Solução PEG 3350 40% / LiOAc 1x

LiOAc 10x	0,1 mL
PEG 3350 40%	0,8 mL
Água destilada estéril	0,1 mL

Homogeneizar os componentes. A solução deve ser preparada na hora do uso.

7) Solução 1 de transformação em *A. fumigatus*

Sulfato de amônio	0,8 M
Ácido cítrico, 1M, pH 6,0	100 mM

Dissolver todos os componentes em água destilada. Esterilizar em autoclave a 121°C, 1kgf/cm², durante 20 minutos.

8) Solução 2 de transformação em *A. fumigatus*

Extrato de levedura	1% (p/v)
Sacarose	2% (p/v)

Dissolver todos os componentes em água destilada. Esterilizar em autoclave a 121°C, 1kgf/cm², durante 20 minutos.

9) Solução 3 de transformação em *A. fumigatus*

Sulfato de amônio	0,4 M
Sacarose	1% (p/v)
Ácido cítrico, 1M, pH 6,0	50 mM

Dissolver todos os componentes em água destilada. Esterilizar em autoclave a 121°C, 1kgf/cm², durante 20 minutos.

10) Solução 4 de transformação em *A. fumigatus*

PEG 6000	25% (p/v)
Cloreto de cálcio	100 mM
Cloreto de potássio	0,6 M
TRIS-HCl, 2 M, pH 7,5	10 mM

Dissolver todos os componentes em água destilada. Esterilizar em autoclave a 121°C, 1kgf/cm², durante 20 minutos.

11) Solução 5 de transformação em *A. fumigatus*

Cloreto de potássio	0,6 M
Cloreto de cálcio	50 mM
MES, pH 6,0	10 mM

Dissolver todos os componentes em água destilada. Esterilizar em autoclave a 121°C, 1kgf/cm², durante 20 minutos.

12) Tampão de extração de DNA genômico

TRIS-HCl, 0,5 M, pH 8,5	200 mM
Cloreto de sódio	250 mM
EDTA, 0,5 M, pH 8,0	25 mM
SDS	0,5%

Dissolver todos os componentes em água destilada.

13) Salina fosfato tamponada (PBS) 10x

Cloreto de sódio	350 mM
Cloreto de potássio	180 mM
Fosfato de sódio dibásico	25 mM
Fosfato de potássio monobásico	18 mM

Dissolver todos os componentes em água destilada e ajustar o pH para 7,4 com HCl. Esterilizar em autoclave a 121°C, 1kgf/cm², durante 20 minutos.