UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Estudo da influência de vesículas extracelulares na resposta imune contra a esporotricose experimental

Renato Massis Souza Campos

Dissertação para obtenção do Título de Mestre
Orientadora: Profa. Dra. Karen Spadari Ferreira

São Paulo
2022

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Estudo da influência de vesículas extracelulares na resposta imune contra a esporotricose experimental

Renato Massis Souza Campos

Versão Original

Dissertação para obtenção do Título de Mestre
Orientadora: Profa. Dra. Karen Spadari Ferreira

São Paulo
2022

Renato Massis Souza Campos

Estudo da influência de vesículas extracelulares na resposta imune contra a esporotricose experimental

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Profa. Dra. Karen Spadari Ferreira

orientador/presidente

_____

1o. examinador

_____

2o. examinador

_____

3o. examinador

_____

4o. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2022.

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletronico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

M417e

Massis, Renato
Estudo da influência de vesiculas extracelulares na resposta imune contra a esporotricose experimental / Renato Massis. - São Paulo, 2020.
89 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Ferreira, Karen Spadari
Coorientador: Batista, Wagner Luiz

1. Sporothrix brasiliensis. 2. HOG1. 3. Agrobacterium tumefaciens . 4. Vesiculas extracelulares. 5. Esporotricose. I. T. II. Ferreira, Karen Spadari, orientador. III. Batista, Wagner Luiz, coorientador.

RESUMO

MASSIS, R. **Estudo da influência de vesículas extracelulares na resposta imune contra a esporotricose experimental** 2022, 89f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

O gênero *Sporothrix* compreende diversas espécies de fungos termo-dimóficos que infectam humanos e felinos no Brasil, levando à esporotricose, uma micose subcutânea crônica que atualmente é endêmica em estados Brasileiros. O número de casos tem aumentado rapidamente em São Paulo e municípios, apontando para um problema de saúde pública. Durante a infecção, a resposta ao estresse nestes micro-organismos é governada, principalmente, pela proteína quinase HOG1, um importante componente da via da HOG e crucial na manutenção da homeostase celular frente a alterações de potencial osmótico, estresse oxidativo, temperatura, entre outros. Neste trabalho, *S. schenckii, S. brasiliensis* 5110 *e S. brasiliensis* M1168 demonstraram diferentes perfis de resistência no ensaio de estresse celular, principalmente em meios contendo NaCl, SDS, Congo Red, Calcofluor-White e H_2O_2, evidenciando as diferenças fisiológicas entre as cepas e a possível atuação da HOG1 nos diferentes cenários. Utilizando o protocolo de transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens,* conseguimos, pela primeira vez, estabelecer uma metodologia confiável para transformar *S. brasiliensis* (*Sb*ATMT). Obtivemos 214 isolados transformantes com a estabilidade mitótica após 5 passagens em meio seletivo de 18% e dois isolados com possível redução da expressão de HOG1 (p38) após análise preliminar. O isolado ΔHOG1-AS2 demonstrou aumento da resistência a calcofluor white (CFW) ao passo que o isolado ΔHOG1-AS4 apresentou crescimento reduzido em meio com cloreto de sódio (NaCl).

Palavras-chave: *Sporothrix brasiliensis*, HOG, *Agrobacterium tumefaciens*, Vesículas extracelulares, Esporotricose.

ABSTRACT

MASSIS, R. **Study of the influence of extracellular vesicles on the immune response against experimental sporotrichosis** 2022, 89f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

The genus Sporothrix comprises several species of thermo-dimorphic fungi that infect humans and felines in Brazil, leading to sporotrichosis, a chronic subcutaneous mycosis that is currently endemic in Brazilian states. The number of cases has increased rapidly in São Paulo and municipalities, pointing to a public health problem. During infection, the stress response in these microorganisms is mainly governed by the HOG1 protein kinase, an important component of the HOG pathway and crucial in the maintenance of cell homeostasis in the face of changes in osmotic potential, oxidative stress, temperature, among others. In this work, *S. schenckii*, *S. brasiliensis* 5110 and *S. brasiliensis* M1168 demonstrated different resistance profiles in the cell stress assay, mainly in media containing NaCl, SDS, Congo Red, Calcofluor-White and H_2O_2, showing the physiological differences between the strains and the possible role of HOG1 in these different scenarios. Using the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation protocol, we were able, for the first time, to establish a reliable methodology to transform and insert genetic material on *S. brasiliensis* (SbATMT). We obtained 214 transforming isolates with mitotic stability after 5 passages of about 18% in selective medium and two isolates with possible reduction of HOG1 (p38) expression after preliminary analysis. The ΔHOG1-AS2 isolate showed increased resistance to calcofluor-White stain (CFW) while the ΔHOG1-AS4 isolate showed reduced growth in medium with sodium chloride (NaCl).

Keywords: *Sporothrix brasiliensis*, HOG, *Agrobacterium tumefaciens*, Extracellular vesicles, Sporotrichosis.

Dedicatória

Dedico este trabalho às pessoas que fazem parte da minha vida e do meu dia-a-dia e me dão o suporte físico e emocional para me manter sempre de cabeça erguida e focado nos meus objetivos. Meus maravilhosos Mãe e Pai, Elaine e João Carlos e claro, minha noiva, Camila.

Sem o apoio de vocês, eu dificilmente estaria escrevendo esta mensagem hoje.

Agradecimentos

*Agradeço à minha orientadora **Profa. Dra. Karen Spadari Ferreira** pela orientação, pelo apoio, pela compreensão e pelo voto de confiança para a execução deste projeto. Seu suporte como orientadora, professora e amiga durante esta jornada foi importantíssimo para que eu obtivesse êxito ao finalizar este trabalho.*

*Agradeço também ao meu coorientador **Professor Dr. Wagner Luiz Batista**, do Laboratório de Imunologia Celular e Bioquímica de Fungos e Protozoários (LICBFP), sediado na Universidade Federal de São Paulo, pelo auxílio durante os experimentos biomoleculares e toda a ajuda com as múltiplas adversidades que surgiram ao longo do caminho.*

Sem vocês este trabalho não seria possível.

*Agradeço ao Professor **Dr. Sandro Rogério de Almeida** por ceder a infraestrutura de seu laboratório no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP bem como o isolado fúngico utilizado, sem o qual, parte deste trabalho não teria sido possível.*

*Agradeço a todos os meus colegas de laboratório e técnicos de laboratório da **UNIFESP** e da **USP** que me auxiliaram por onde passei durante este período. Um agradecimento especial para a **Dra. Marina Valente Navarro**, colega de longa data e que sempre contribuiu e me auxiliou com soluções para os problemas e dúvidas que encontrei durante estes anos.*

*Agradeço à **Elaine Midori** da secretaria da pós-graduação da Farmácia – USP pela ajuda em momentos críticos.*

*Agradeço ao técnico **Wilson Dias Segura** da UNIFESP Campus Diadema por operar e realizar a análise da microscopia confocal de fluorescência.*

Este trabalho contou com o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES / PROEX por meio da bolsa ao aluno (Processo 88887.369940/2019-00).

Recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processos 2021/03672-6 e 2017/26665-0).

Lista de figuras

Figura 1. Fungos do gênero S*porothrix* possuem dimorfismo térmico, exibindo diferentes morfologias em distintas temperaturas de crescimento. **15**

Figura 2. Representação da composição da parede celular dos fungos em geral e microscopia eletrônica da parede celular de *S. brasiliensis.* **17**

Figura 3. Mapa de hospitalizações por esporotricose no Brasil de 1992 a 2015. **21**

Figura 4. Figura com felinos e humanos afetados pela esporotricose e consequências do seu avanço no organismo e seus respectivos quadros clínicos. **23**

Figura 5. Ilustração da biogênese e cargas carreadas pelas vesículas extracelulares. **31**

Figura 6. Infográfico com dados relativos ao número de publicações acerca de vesículas extracelulares de 1940 a 2021. **32**

Figura 7. Via metabólica da HOG ilustrando os sensores osmóticos na membrana celular Sho1 e Sln1, responsáveis pela transdução do sinal inicial para ativação da cascata metabólica. **35**

Figura 8. Plasmídeo de indução de tumor ou plasmídeo Ti de *A. tumefaciens* carreando os genes de virulência responsáveis pela formação da maquinaria de transferência do T-DNA à célula alvo. **37**

Figura 9. Mapa do plasmídeo e detalhamento da construção do vetor e do cassete utilizado neste trabalho. **44**

Figura 10. Morfologia das duas morfologias exibidas por *S. schenckii* e *S. brasiliensis.* As células foram coradas com CFW e observadas em microscopia confocal com aumento de 640x. **53**

Figuras 11 e 12. Ensaio de estresse celular com múltiplos agentes perturbadores de parede e indutores de estresse osmótico. Teste realizado em meio BHI adicionado de SDS, CFW, H_2O_2, Congo Red, $NaNO_2$ e NaCl**.** **55 e 56**

Figura 13. Quantificação das VEs de *S. brasiliensis* cultivados por 7 dias em meio BHI a 37ºC. Amostras quantificadas no equipamento *NanoSight NS3000* exibiram concentração de $1.15x10^9$ células/mL e tamanho variando entre 110 e 435 nm. **58**

Figura 14. Transformação do plasmídeo em *E. coli* DH5α e seleção em meio com antibióticos para confirmação da internalização do plasmídeo pelas células. **59**

Figura 15. A) Gel de eletroforese dos plasmídeos pLUO carreando os $AS_{(n)}$ - representado pelas bandas de aproximadamente 8130 pb. **B)** Gel de eletroforese após reação de PCR para confirmação da presença do inserto na bactéria. **61**

Figura 16. Culturas de *A. tumefaciens* carregando os insertos $AS_{(n)}$ e cultivadas em meio contendo antibiótico canamicina. Colônias que não carreiam o plasmídeo não conseguem crescer no meio. **61**

Figura 17. Teste de resistência do *S. brasliensis* à higromicina B. **63**

Figura 18. Efeito da adição de acetoceringona no pré-cultivo e no co-cultivo de *A. tumefaciens* e *S. brasiliensis.* **65**

Figura 19. Gráfico da padronização do sistema *Sb*ATMT. Foram testadas as temperaturas de 25ºC, 28ºC e 30ºC nos tempos de incubação de 48h e 72h. Os dados foram analisados por *Two-way* ANOVA com múltiplas comparações pelo teste de *Tukey*, para valores considerados significativos de $p < 0.05$. **66**

Figura 20. A) Esquema representando o processo de transformação. B) Placas de petri com meio BHI + Higromicina para seleção e avaliação da estabilidade mitótica dos isolados advindos do co-cultivo. C) Gel de eletroforese dos *amplicons* dos isolados mitoticamente estáveis. Bandas de 464 pares de base indicam a amplificação do fragmento do gene da higromicina B fosfotransferase. **68**

Figura 21. Ensaio de estresse celular. Teste de *spot* com o isolado M1168 WT (controle) e 3 mutantes de HOG1 escolhidos para o teste, *Sb.* ΔHOG1-AS2, *Sb.* ΔHOG1-AS3, *Sb.* ΔHOG1-AS4. Leveduras foram incubadas em meio BHI com concentrações de diferentes agentes estressantes. **70**

Lista de tabelas

Tabela 1. Concentrações dos agentes perturbadores de parede e indutores de estresse osmótico utilizados nos experimentos. **42**

Tabela 2. Oligonucleotideos utilizados neste estudo para amplificação de diversas regiões de interesse. **51**

Índice

Lista de figuras 10
Lista de tabelas 12
1. Introdução 14
1.1 Esporotricose e o complexo *Sporothrix spp.* 14
1.1.2 *Sporothrix* spp 15
1.1.2.1 Morfologia 15
1.1.3 Epidemiologia 18
1.1.4 Apresentações Clínicas 22
1.1.5 Diagnóstico e Tratamento 24
1.1.6 Aspectos imunológicos da Esporotricose 25
1.2 Vesículas extracelulares 29
1.3 Via de Alta Osmolaridade do Glicerol (*High Osmolarity Glicerol Pathway*) 33
1.4 Transformação mediada por *A. tumefaciens* 36
1.4.1 Mecanismos genéticos 36
2. Justificativa 39
3. Objetivos 40
4 Material e métodos 41
4.1 Fungo e preparo do inóculo 41
4.2 Marcação de quitina com Calcofluor-white (CFW) 41
4.3 Ensaio de estresse celular 41
4.4 Vesículas extracelulares de *S. brasiliensis* 42
4.4.1 Isolamento das VEs 42
4.5 Análise por *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA) 43
4.6 Plasmídeos 43
4.7 Protocolo de transformação de *Escherichia coli* DH5α 45
4.8 Protocolo de mini preparação plasmidial 45
4.9 Transformação do *S. brasiliensis* M1168 mediada por *A. tumefaciens* 46
4.9.1 Preparação de células de *A. tumefaciens* competente 46
4.9.2 Eletroporação do *A. tumefaciens* 46
4.9.3 Análise da sensibilidade aos antibióticos para *S. brasiliensis* e *A. tumefaciens* 47
4.9.4 Co-cultivo de *Agrobacterium tumefaciens e Sporothrix brasiliensis* 48
4.9.5 Seleção de transformantes e avaliação da estabilidade mitótica 49
4.10 Extração de DNA genômico 49
4.11 Reação de PCR 50

4.12 Eletroforese em gel de Agarose 51
4.13 Extração de RNA e síntese de cDNA 51
4.14 Tratamento do RNA com *DNAse* I 52
4.15 Análise estatística 52
5 Resultados e Discussão 53
5.1 Morfologia 53
5.2 Ensaio de estresse celular 54
5.3 Caracterização das vesículas extracelulares 57
5.4 Plasmídeo e Clonagem 59
5.5 Padronização do co-cultivo de *A. tumefaciens* e *S. brasiliensis* 62
5.5.1 Resistência do *Sporothrix brasiliensis* M1168 WT à higromicina 62
5.5.2 Co-cultivo com Acetoceringona (ASg) 64
5.5.3 Padronização de temperatura e tempos de incubação 65
5.6 Estabilidade mitótica 67
5.7 Ensaio de estresse com transformantes 68
6. Conclusões 71
7. Referências Bibliográficas 72

1. Introdução

1.1 Esporotricose e o complexo *Sporothrix spp*.

A esporotricose é uma doença cutânea e subcutânea, com manifestação aguda ou crônica, causada por algumas espécies de fungos pertencentes ao gênero *Sporothrix.* A primeira cepa a ser descrita tendo relação com esta micose foi o *Sporothrix schenckii*, uma cepa inicialmente isolada e descrita por Benjamin R. Schenck em 1898 enquanto acompanhava o tratamento de um paciente internado no hospital John Hopkins em Baltimore – EUA. Este foi o primeiro relato sobre um dos fungos que se tornaria a espécie-tipo do gênero *Sporothrix* mais adiante. Dois anos depois, os pesquisadores Hektoen e Perkins isolaram o fungo pela segunda vez de um garoto de cinco anos, onde então propuseram a classificação do agente causador da patologia observada como *Sporothrix schenckii* (HEKTOEN; PERKINS, 1900) pertencendo à Divisão *Ascomycota*, Classe *Sordariomycetes*, Ordem *Ophiostomatales* e Gênero *Sporothrix* (DONADEL et al., 1993).

A este gênero atualmente pertencem cerca de 56 espécies já descritas, onde há relatos de algumas destas espécies apresentando envolvimento com infecções em humanos e animais domésticos, como o *Sporothrix brasiliensis.* As demais espécies relatadas são: *Sporothrix schenckii, Sporothrix globosa, Sporothrix luriei Sporothrix mexicana, Sporothrix chilensis* e *Sporothrix pallida* (LÓPEZ-ROMERO *et al.*, 2011; MARIMON *et al.*, 2007; OROFINO-COSTA; RODRIGUES; *et al.*, 2017; OSTAFIŃSKA *et al.*, 2021).

1.1.2 *Sporothrix* spp.

1.1.2.1 Morfologia

Os fungos deste gênero têm como característica o termo dimorfismo e por conta disso exibem duas morfologias distintas dependendo da temperatura de crescimento (Figura 1).

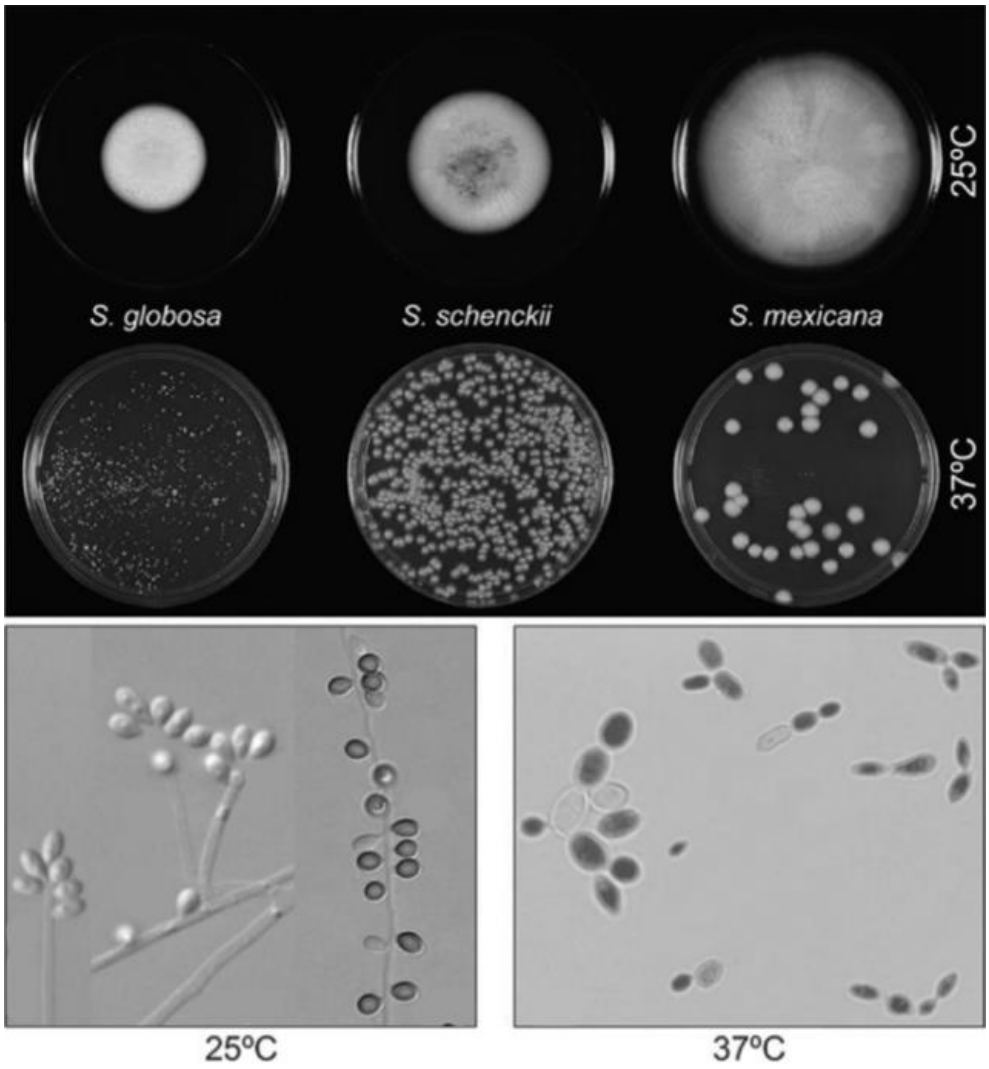

Figura 1. Fungos do gênero *Sporothrix* possuem dimorfismo térmico. Quando crescido em meio *Sabouraud* sólido (25ºC) exibe colônias com superfície rugosa e coloração variando do branco ao creme, com bordas regulares. Ao crescer a 37ºC surgem células leveduriformes também com coloração branca/creme. Nas microscopias à esquerda (25ºC) estão dispostas as hifas, hialinas e septadas, onde os conídios com crescimento simpodial estão fixados. Na imagem à direita observamos as leveduras (37ºC) com formato oval ou de bastão medindo em torno de 5 µm (Rodrigues A.M., Fernandes G.F., de Camargo Z.P. (2017).

A 25ºC é possível observar o crescimento de sua forma filamentosa composta por hifas septadas com 2-5 µm de comprimento. Quando cultivado a 37ºC, observamos a mudança na morfologia celular e o crescimento de células leveduriformes, com formato ovalado ou de bastonete, que geralmente são a forma infectante do fungo e medindo de 1-6 µm dependendo do seu estágio de desenvolvimento e/ou da espécie (DE LIMA BARROS; DE ALMEIDA PAES; SCHUBACH, 2011).

Durante essa troca de morfologia, a parede dos fungos sofre grandes modificações estruturais. De modo geral, esta barreira tem em sua composição diversos carboidratos que unidos formam uma estrutura altamente resistente a danos mecânicos, variações de pH, ataques enzimáticos e diversos outros tipos de estresses quando comparado a outros tipos celulares (Figura 2) (GARCIA-RUBIO *et al.*, 2020). Próximos à membrana, conferindo rigidez estrutural à parede estão a quitina e os β-1-3 e β-1-6-glucanos, sobrepostos e entrelaçados entre si formando uma espécie de matriz aonde os demais componentes da parede se ancoram, como, por exemplo, as proteínas que carreiam resíduos de manose (FREE, 2013). Estes carboidratos e resíduos acoplados às moléculas desempenham papel não só na proteção física do fungo contra o meio externo, mas também no processo de evasão das células fúngicas do sistema, modulando a resposta das células imunes e agindo como uma espécie de “camuflagem”. Sendo esta parede um envoltório, uma “capsula” que protege a célula, a mesma certamente possuirá controle sobre a composição dessa parede por meio da expressão e modulação de uma infinidade de genes por questões básicas de sobrevivência e reprodução (ENE *et al.*, 2015).

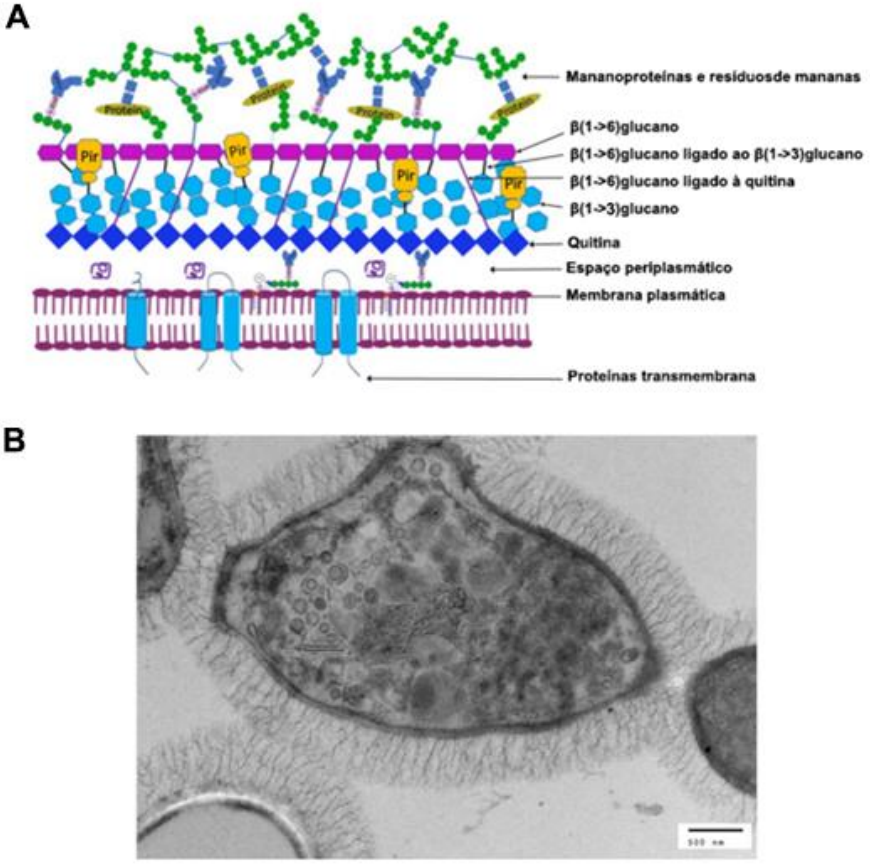

Figura 2. Parede celular dos fungos. A) Exemplificação da rede entrelaçada de quitina e glucanos formando uma matriz que serve de estrutura para proteínas e outros componentes se ancorarem à parede celular. Adaptado de KOMATH et al., 2018. **B)** Microscopia da parede celular das leveduras de *S. brasiliensis* contendo fibrilas (LOPES-BEZERRA *et al.*, 2018).

Logo, é indubitável que venha a ser observada uma mudança na composição da parede ao longo do tempo ou em decorrência de algum estímulo externo recebido. Isto foi de fato observado em *Candida albicans*, onde a levedura passa por mudança na composição da parede durante seus diferentes estágios de desenvolvimento, necessitando tornar a parede mais flexível para que a membrana possa se expandir e assim, a célula crescer. Esta mudança conformacional também ocorre para encobrir os β-glucanos com resíduos de

manose de modo a dificultar o reconhecimento deste carboidrato pelos receptores das células imunes (GARCIA-RUBIO *et al.*, 2020).

1.1.3 Epidemiologia

Por todo o mundo há relatos de casos de esporotricose causada por diferentes fungos do complexo *Sporothrix*, tendo sua distribuição mais ampla pelas regiões de clima tropical úmido e subtropical como Brasil, África, México, China, Índia, Estados Unidos, entre outros (BARROS *et al.,* 2011). Os fungos do complexo *Sporothrix* podem ser encontrados no solo, depositados nos espinhos ou nas folhas das plantas, em matéria orgânica em decomposição e até em musgos (DIXON *et al.*, 1991; MENDOZA *et al.*, 2007; MESA-ARANGO *et al.*, 2002). Por estarem presente na composição natural do solo, ao passo que um agricultor ou jardineiro realiza o manuseio do solo, os fragmentos das hifas ou conídios podem ser lançados ao ar, podendo ocorrer a internalização destas partículas pelo trato respiratório e ultimamente permitindo que o fungo se estabeleça em diversas regiões, mas principalmente no epitélio pulmonar (AUNG *et al.*, 2013). Outra forma ainda mais comum se dá no caso de infecções onde há a inoculação traumática do fungo com o rompimento da barreira epitelial, seja por lesões causadas por espinhos, acúleos, por folhas pontiagudas contaminadas com o fungo ou por animais contaminados (CHAKRABARTI *et al.*, 2015; OROFINO-COSTA; MACEDO; *et al.*, 2017). Por este motivo a doença passou a ser conhecida ao longo dos anos como Doença do Jardineiro, devido ao extenso contato destes trabalhadores com plantas ou solo contaminado (CDC – Epidemiologic notes, 1988). Em 1927, na África do Sul, Pijper e Pullinger relataram um surto abrangendo mais de 3.000 mineradores de ouro diagnosticados com esporotricose após entrarem em contato com conídios do

fungo presentes nas vigas de madeira que realizavam a sustentação das laterais e do teto da mina (PIJPER; PULLINGER, 1927).

No Brasil, o primeiro caso registrado foi descrito pelos Doutores Adolpho Lutz e Alffonso Splendore em 1907 acometendo tanto humanos quanto ratos (LUTZ; SPLENDORE, 2012). Nas décadas de 80 e 90, apesar de haver um notável aumento dos índices de incidência da doença em comparação aos anos anteriores, os números ainda não eram tão expressivos como o que se começou a observar em meados de 2000, quando pesquisadores notaram o afloramento de diversos focos da doença pelo país como nos estados do Rio de Janeiro, Pernambuco e Rio Grande do Sul, o que acabou chamando a atenção das autoridades de saúde para a emergência da doença (BARROS *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2012).

Segundo Barros, Schubach e colaboradores, até 1997 apenas de um a três casos de esporotricose eram diagnosticados por ano no Brasil (BARROS, MONICA BASTOS DE LIMA *et al.*, 2010). Porém, um estudo de revisão realizado por Silva e colaboradores (2012) analisou o banco de dados do Serviço de Vigilância em Saúde do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC) para o período final de 1997 até 2007, constatando que apenas para o estado do Rio de Janeiro fora constatado o diagnóstico de 1.848 novos casos de esporotricose e figurando o sexo feminino, principalmente as donas de animais de estimação, como as mais afetadas (80,3%). Em análise posterior pelo menos grupo, para o período de 2008 a 2011, 2.340 novos casos foram relatados pelo IPEC somando mais de 4.100 casos na totalidade e sendo até o presente momento o maior surto de casos de esporotricose que se tem registro no mundo, principalmente no caso da esporotricose zoonótica com transmissão por felinos e canídeos que tem tomado proporções alarmantes em diversos estados brasileiros (DA SILVA *et al.*, 2012).

A esporotricose zoonótica, causada majoritariamente pelo *Sporothrix brasiliensis*, vem ganhando grande relevância clínica com o passar dos anos em decorrência do aumento brusco de casos (CORDEIRO *et al.*, 2011; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2011). Profissionais da área de veterinária e donos de *pets* figuram entre os mais afetados uma vez que são os indivíduos que tem contato mais próximo e prolongado com o animal e podem sofrer com arranhaduras ou mordeduras dos animais infectados com o agravante de, nos felinos, a carga fúngica ser relativamente maior (BARROS, MÔNICA BASTOS DE LIMA *et al.*, 2001; BOECHAT *et al.*, 2018; DA SILVA *et al.*, 2012; GREMIÃO *et al.*, 2011; REED *et al.*, 1993).

Seguindo o histórico de casos, para o período de 2013 a 2016, o boletim epidemiológico da esporotricose 007/2016 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Rio de Janeiro constatou a notificação de 3.377 casos suspeitos com um índice de confirmação destes casos de mais de 65%. De 2016 a 2018 o estado atingiu a marca de 3.545 pacientes diagnosticados com infecções por *Sporothrix sp.* (Boletim Epidemiológico - Ministério da Saúde - RJ, 2018). Em 2018 a cidade de Salvador - BA registrou 445 casos (Boletim Epidemiológico 06 (SES) - Salvador, 2019). No município de Guarulhos, em São Paulo, somente em 2019 foram encontrados mais de 700 animais contaminados sendo 98,5% deles felinos (1º Boletim do Departamento de Vigilância em Saúde – Guarulhos, 2019).

É necessário mencionar que dentro deste panorama ainda temos uma parcela considerável dos óbitos ligados à doença que estão relacionados aos pacientes que não procuram ou não completam o tratamento. A situação mais delicada se dá em relação aos pacientes que possuem a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e que vêm a ter contato com o fungo. Muitos deles, ainda que sejam hospitalizados e recebam o tratamento adequado, não conseguem resistir ao progresso da infecção e acabam evoluindo a óbito. Falcão e colaboradores criaram um mapa com a distribuição de casos da doença que

resultaram em hospitalização em todos os estados do Brasil baseado em dados do Sistema Único de Saúde (SUS) e do Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM) no período de 1992 a 2015 (Figura 3). Dos 65 óbitos registrados, 32% são referentes à pacientes portadores do HIV (FALCÃO *et al.*, 2019).

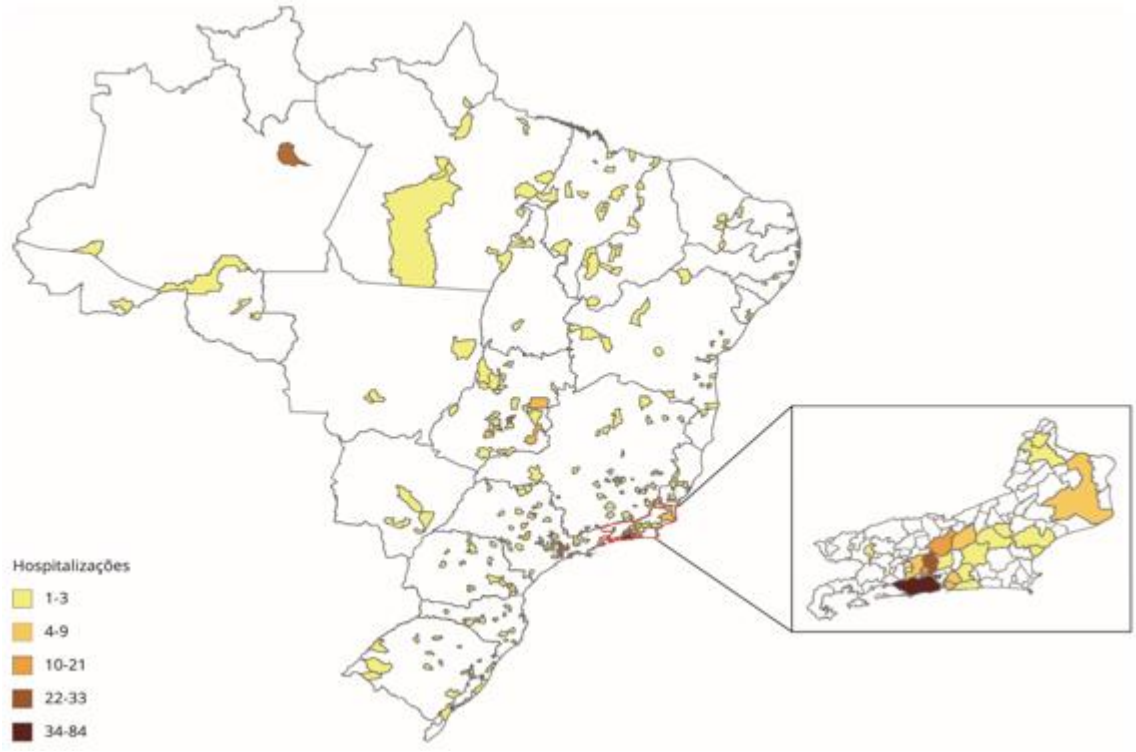

Figura 3. Mapa de hospitalizações por esporotricose no Brasil de 1992 a 2015 (FALCÃO et al., 2019).

É nítido que a doença tem se tornado assunto de importância pública com o aumento expressivo do número de casos registrados e a sua expansão no território brasileiro. Apesar do número de casos ter reduzido ligeiramente em comparação aos anos anteriores por virtude das diversas campanhas de combate à doença que se iniciaram por todo o Brasil, ainda podemos observar aumento no número de casos no RJ e, pior, a expansão da doença para as demais cidades adjacentes. A situação no estado do Rio de Janeiro é particularmente preocupante

pelo cenário socioeconômico em que a população se encontra e a presença de diversas comunidades carentes por todo o Estado. Comunidades as quais, em sua grande maioria, são dominadas por organizações criminosas, o que dificulta imensamente a chegada do agente de saúde até partes mais elevadas e profundas da comunidade já que sua vida fica em risco. Isso acarreta na falta de acolhimento de diversos animais que podem estar infectados e que poderão transmitir a doença para mais indivíduos uma vez que não haverá o tratamento adequado a tempo.

1.1.4 Apresentações Clínicas

A esporotricose é uma doença polimórfica que afeta múltiplas regiões do organismo levando a variados quadros clínicos dependendo da forma de contágio e da carga de células fúngicas com as quais o indivíduo teve contato. Assim que o fungo entra em contato com o indivíduo e se neste se estabelece, a esporotricose será caracterizada clinicamente em três formas distintas dependendo do local da lesão e da intensidade do contato com o material contaminado. A classificação mais comumente vista para os tipos da doença incluem: Esporotricose Cutânea/Linfocutânea, Mucosa e Sistêmica (LOPES-BEZERRA; SCHUBACH; COSTA, 2006; OROFINO-COSTA; MACEDO; *et al.*, 2017). A forma cutânea (Figura 4A) se manifesta através de lesões nodulares ou ulcerativas visíveis causadas por traumas na pele do paciente. O fungo pode se manter no local da lesão ou ocorrer das células fúngicas se infiltrarem pelos vasos linfáticos periféricos ao local da lesão e se disseminarem para outras regiões, caracterizando o subtipo linfocutâneo da doença (Figura 4B); tipo mais recorrente da doença representando até 80% dos casos (LOPES-BEZERRA; SCHUBACH; COSTA, 2006; OROFINO-COSTA; MACEDO; *et al.*, 2017). Uma segunda manifestação pode se dar pela forma mucosa da doença, ainda que seja a menos

comumente relatada. Este quadro clínico é gerado após o contato dos propágulos fúngicos com o muco respiratório ou ocular do indivíduo (Figura 4C). Quando o contato ocorre pelas vias respiratórias, há chance do patógeno alcançar as vias inferiores do trato respiratório e se alojar no pulmão, resultando no que se denomina Esporotricose Pulmonar (SCHUBACH; BARROS; WANKE, 2008).

Figura 4. Imagens de felinos e humanos afetados pela doença e as consequências do seu avanço. A) Caso de esporotricose cutânea; **B)** Esporotricose linfocutânea; **C)** Úlcera granulomatosa na mucosa ocular; **D)** Esporotricose cutânea disseminada; **E)** Esporotricose nas mucosas oculares; **F)** Mucosa nasal afetada. Fontes em ordem: Estrada-Castañón et al., 2018; Mahajan, V.K., 2014; Lopez-Bezerra et al., 2006; Silva et al., 2018; Conselho Regional de Medicina Veterinária – SP; Almeida et al., 2018.

No caso de contato com a mucosa ocular pode haver lesões no interior da pálpebra e, após colonização do fungo, evoluir para a formação de granulomas, desenvolvimento de conjuntivite, uveíte, dentre outras patologias oculares (CURI *et al.*, 2003; OROFINO-COSTA; MACEDO; *et al.*, 2017). Por último, a forma

Sistêmica, pode ser observada quando a doença não se restringe apenas aos vasos linfáticos ou ao local inicial da lesão. Isso pode ser ocasionado devido ao baixo desempenho do sistema imune, seja por uso de medicamentos, tratamentos clínicos ou doenças autoimunes. O fungo, até então contido em certa região, passa a atravessar os tecidos a fim de atingir a corrente sanguínea, onde suas células percorrerão todo o corpo. Esta disseminação sistêmica pode levar ao comprometimento dos ossos, articulações e em alguns casos raros até do sistema nervoso, tendo maior ocorrência relatada em pacientes imunossuprimidos ou portadores do HIV (FREITAS *et al.*, 2015; PAULA *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2015). Há relato de que um isolado de *S. brasiliensis* ainda se mostrou capaz de colonizar a válvula mitral de um paciente com HIV, sendo necessária cirurgia para substituição da válvula e reestabelecimento do paciente (ABDALLA *et al.*, 2012).

Além dos seres humanos, felinos também podem ser severamente afetados pelos diferentes tipos da doença caso não tratados no tempo adequado e com os medicamentos corretos (Figura 1 D, E e F).

1.1.5 Diagnóstico e Tratamento

Os pacientes com suspeita de esporotricose devem passar por um diagnóstico diferencial uma vez que a infecção por *Sporothrix* sp. se assemelha a outros quadros clínicos exibidos em demais patologias que também afetam o tegumento, como, por exemplo: leishmaniose tegumentar, nocardiose cutânea, sífilis, tuberculose pulmonar, entre outras (OROFINO-COSTA; RODRIGUES; *et al.*, 2017; SMEGO; CASTIGLIA; ASPERILLA, 1999). Orofino-costa e colaboradores (2017) comentam em seu trabalho que atualmente o padrão ouro para o diagnóstico de esporotricose é a coleta da amostra de lesões e biópsia para posterior cultivo e isolamento em ágar Mycosel, BHI ou Sabouraud e identificação via métodos moleculares, como a reação em cadeira da polimerase

(PCR) e sequenciamento dos genes da Calmodulina (CAL), beta-tubulina (BT2) ou do fator de alongamento (EF-1α). Também é possível a observação das leveduras via microscopia direta após a preparação das amostras com hidróxido de potássio (KOH) ou coloração de Giemsa, embora sejam menos sensíveis que o método de coleta e cultivo (OROFINO-COSTA; RODRIGUES; *et al.*, 2017).

O tratamento mais comum para a esporotricose é feito com 200 mg por dia de Itraconazol ou com solução saturada de iodeto de potássio, cujo valor é mais acessível e com taxa de eficácia nos pacientes superior a 80% (HABTE-GABR; WALSH, 2000; MAHAJAN, 2014; RESTREPO *et al.*, 1986). Porém, no caso dos pacientes com HIV, geralmente a infecção se torna refratária ao tratamento sendo necessária a inclusão de anfotericina B lipossomal ou terbinafina aliado ao Itraconazol pelo resto da vida em alguns casos, visto que o número de células fúngicas presentes no organismo após o tratamento pode nunca chegar a zero devido à baixíssima capacidade de remoção das células patogênicas pelo sistema imune do hospedeiro (MAHAJAN, 2014).

1.1.6 Aspectos imunológicos da Esporotricose

Assim que o fungo entra em contato com o sistema imune do paciente, uma sequência de eventos se desencadeia, como: recrutamento de células do sistema imune, fagocitose, apresentação de antígeno, produção de anticorpos, entre muitos outros, por meio de uma infinidade de moléculas e diferentes células do hospedeiro. Este contato inicial do *S. brasiliensis* com o sistema imune ocorre após a introdução dos propágulos fúngicos no organismo do hospedeiro de forma traumática na pele, geralmente. Dentro do organismo as hifas transicionam de morfologia até a forma leveduriforme devido à mudança de temperatura do ambiente e dos estímulos recebidos (BARROS et al., 2011). Então, macrófagos e células dendríticas (DCs) serão recrutadas para o local da lesão onde ocorrerá o

primeiro reconhecimento dos Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) presentes na parede celular das leveduras. Estes padrões são moléculas provenientes do patógeno que se ligarão aos receptores de membrana presente nos macrófagos e DCs, denominados Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs), como os receptores do tipo Toll (TLRs), receptores da família da Lectina tipo C (CLRs) (Dectina-1 e *Mincle*), receptores de manose, dentre outros (BARRETO-BERGTER; FIGUEIREDO, 2014; YAMASAKI *et al.*, 2009). A ligação de um PAMP a um PRR leva à ativação das respostas inata e adaptativa; sendo que as células da resposta inata geralmente são as primeiras a responder e chegar ao local, promovendo a eliminação de grande parte das células parasitas através da fagocitose realizada pelos macrófagos, DCs, células NK e do auxílio do sistema complemento (IWASAKI; MEDZHITOV, 2004). Visando analisar como se desencadeia essa ativação de PRRs e suas consequências em *Aspergillus* spp, pesquisadores mostram que os PAMPs são expressos de maneira variada dependendo do estágio de desenvolvimento da célula fúngica e da sua morfologia num dado momento, de modo que o reconhecimento do fungo pelo sistema imune pode ser afetado ou beneficiado dependendo da morfologia exibida e do nível de expressão dos açúcares na parede celular em um dado momento (GOYAL *et al.*, 2018). O sistema complemento por sua vez é responsável por “marcar” objetos não próprios, estranhos ao organismo, por meio de opsonização (cobertura) com opsoninas, componentes do sistema, que resultará na formação do complexo de ataque à membrana (MAC), formação de poros na membrana, rompimento do envoltório celular e eventual morte da célula (DUNKELBERGER; SONG, 2010; RUS; CUDRICI; NICULESCU, 2005).

Ao passo que o patógeno sofrer a ação dos macrófagos com a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS), acontecerá paralelamente o recrutamento de neutrófilos, células NK e DCs em decorrência da liberação TNF-α (Fator de necrose tumoral) pelos macrófagos, promovendo a quimiotaxia e aumentando a

expressão da ICAM-1 (Molécula de Adesão Celular 1), que por sua vez facilita a infiltração dos neutrófilos no tecido vascular (GRIFFIN *et al.*, 2012; VIEIRA *et al.*, 2009). Referente ao perfil de citocinas produzidas durante a infecção fúngica, estudos observaram uma resposta envolvendo as células Th17 e produção de IL-17, caracterizando uma resposta de perfil misto Th1/Th17 que também poderia conferir resistência nas futuras infecções através das células T $CD4^+$ de memória, onde serão produzidas novamente as interleucinas IL-10, IL-17a, IFN-γ, e TNF-α num futuro reencontro com algum antígeno do fungo em questão (GARCÍA-LOZANO *et al.*, 2018; HILDNER *et al.*, 1999).

Com relação aos receptores, há dois que são mais bem descritos durante a resposta frente a patógenos fúngicos: *Toll-like Receptors* (TLR) e receptores de Lectina tipo C. Os TLRs são, principalmente, componentes da resposta imune inata, mas que também atuam em diversos outros cenários. Apesar de não estarem diretamente ligados à fagocitose, eles também desempenham papel importante influenciando a capacidade das células fagocíticas em internalizarem o fungo através de sinalização indireta e *crosstalk* com os demais receptores (FANG *et al.*, 2014). Os principais TLRs responsáveis pela resposta frente a infecções fúngicas são os TLR-2 e o TLR-4 e, em estudos investigando as suas prováveis funções e mecanismos, Rossato e Almeida (2019) analisaram camundongos *knockout* para o receptor TLR-2 onde foi possível observar que as concentrações das citocinas IFN-γ, TNF-α, IL-6 e IL-17 se mostraram alteradas negativamente em comparação ao controle. Ainda, observou-se que houve uma diminuição das leveduras sendo internalizadas pelas células, como consequência da redução do índice fagocítico nos macrófagos dos camundongos desprovidos de TLR-2 e, consequentemente, evidenciando a importância que esta família de receptores tem no papel de reconhecimento e resposta ao *S. brasiliensis* (ROSSATO; SILVANA DOS SANTOS; *et al.*, 2019). O mesmo grupo apresentou resultados semelhantes para o receptor TLR-4, onde houve diminuição da fagocitose, das

unidades formadoras de colônia e queda na produção de IL-6, IL-10 e TNF-α com alteração semelhante nos níveis das citocinas (ROSSATO; DOS SANTOS; *et al.*, 2019). Resultado similar também foi observado por Negrini e colaboradores (2014) envolvendo um camundongo *knockout* para o mesmo gene, porém, para a espécie *S. schenckii*. Fora observado o mesmo padrão de redução de citocinas expressas e diminuição na fagocitose (NEGRINI *et al.*, 2014). Os TLRs não só desencadeiam a ativação de diversos mecanismos de defesa como ainda são responsáveis pela sinalização que leva à ativação da via metabólica responsável pela autofagia de células infectadas, promovendo a maturação do fagossomo e consequente morte do patógeno (SANJUAN *et al.*, 2007; SHI; KEHRL, 2008).

As DCs são outro componente celular de grande importância na imunidade inata e adaptativa, executando o papel de célula apresentadora de antígeno (APC) profissional, realizando fagocitose, além de possuírem diversos PRRs espalhados por toda sua superfície celular. É notório que as DCs estão relacionadas à ativação da resposta imune adaptativa bem como no processo de maturação dos linfócitos T (GUERMONPREZ *et al.*, 2002). Elas têm a capacidade de capturar, processar e apresentar o antígeno fúngico às células T $CD4^+/CD8^+$ *naive,* as quais, após diferenciação em células efetoras ou de memória, atuarão promovendo a resposta adaptativa. Sendo, portando, essenciais para a ativação dos linfócitos T e também para a geração da memória imunológica (TEN BROEKE; WUBBOLTS; STOORVOGEL, 2013; VERDAN *et al.*, 2012). Apesar de conhecermos parte dos mecanismos envolvidos na atuação das DCs em outras patogenias, como as causadas por *Candida albicans* (D'OSTIANI *et al.*, 2000) ou *Aspergillus* spp. (BOZZA *et al.*, 2002), se conhece ainda menos sobre os mecanismos de atuação destas células em infecções por *S. brasiliensis* e tornando de grande relevância a aquisição de conhecimento acerca de seus mecanismos de atuação frente aos *Sporothrix* spp.

1.2 Vesículas extracelulares

Ao longo da evolução, os fungos, bem como praticamente todos os seres vivos, adquiriram a capacidade de produzir e liberar estruturas compostas por uma bicamada lipídica cuja função é transportar para o meio extracelular uma ampla gama de biomoléculas que são produzidas no interior da célula por entre a membrana celular (Brown et al., 2015). As vesículas extracelulares (VEs) são de certo modo transportadores de informação tanto entre as células do próprio fungo quanto entre as células envolvidas nas interações patógeno-hospedeiro, tendo papel relevante na manutenção da infecção dada a complexidade das cargas que carreiam (BAZZAN *et al.*, 2021; SŁOMKA *et al.*, 2018). Seu conteúdo varia amplamente de célula para célula, ainda dependendo da espécie, das condições ambientais, presença de citocinas, fatores de crescimento ou de algum eventual estresse imposto ao organismo (GURUNATHAN; KANG; KIM, 2021). Podemos encontrar alguns componentes que estão presentes na maioria das vesículas, entre eles: lipídeos, ácidos nucleicos (DNA, mRNA, siRNA. miRNA), proteínas (CRUZ *et al.*, 2018), adesinas, fatores de virulência, pigmentos, toxinas, entre muitos outros (BROWN *et al.*, 2015). Os tipos de vesículas mais citados na literatura geralmente são os exossomos (50-100 nm) e as microvesículas (100-1000 nm) (YAMAMOTO; KOSAKA; OCHIYA, 2019). A membrana plasmática é o componente celular responsável pela formação das VEs, modificando sua morfologia e gerando invaginações que vêm a formar os endossomos iniciais (Figura 5). No interior dos endossomos iniciais, haverá a formação das vesículas intraluminais (ILVs) após ocorrer um processo de internalizarão da carga por meio de mecanismos dependes ou independentes do complexo de separação endossomal necessário para o transporte (ESCRT). O ESCRT é considerado uma maquinaria composta por diversas subunidades cuja função é reconhecer moléculas ubiquitinadas (SCHMIDT; TEIS, 2012). Em consequência disso, uma

vez que o endossomo tardio ou corpo multivesicular se forma, já carregando diversas ILVs, estes podem ser encaminhados para a fusão com os lisossomos para a degradação de seu conteúdo ou pode ocorrer sua fusão com a membrana celular e liberação de exossomos para o meio extracelular com auxílio dos receptores de proteína de fixação de fator de fusão sensível a N-etilmaleimida solúvel (SNAREs) e algumas pequenas GTPases pertencentes às proteínas da superfamília RAS (GURUNATHAN; KANG; KIM, 2021; TANG *et al.*, 2020) . Já no caso das microvesículas, sua gênese acontece por meio de brotamento direto da membrana plasmática onde levam consigo parte do conteúdo citoplasmático e receptores presentes na membrana. Este processo provavelmente acontece com o auxílio das tetraspaninas CD9, CD63 e CD81 (YÁÑEZ-MÓ *et al.*, 2015).

Recentemente, em 2018, o primeiro estudo publicado acerca do papel das VEs em infecções por *S. brasiliensis* foi realizado pelo nosso grupo de pesquisa onde observou-se que VEs de *S. brasiliensis* possuem diferentes proteínas em seu interior as quais poderiam estar envolvidas com o escape da resposta imunológica durante a infecção. Neste estudo foram observadas a presença de proteínas “heat-shock”, proteínas transportadoras de moléculas, proteínas de 70 e 100 kDa, quinases, enzimas da parede celular, como a glucanase, entre outras (IKEDA *et al.*, 2018). Diante disso, o estudo mais detalhado das moléculas presentes nas VEs é altamente relevante para o melhor entendimento dos mecanismos de invasão e escape do fungo frente à resposta imune e qual seria a função dessas moléculas identificas neste contexto. Identificá-las é importante já que no processo da infecção fúngica alguns componentes acabam agindo como fatores de virulência, diminuindo a susceptibilidade do fungo à resposta do sistema imune e agindo como “proteção” para as células fúngicas ao modular para o seu benefício a resposta de macrófagos, células dendríticas e células NK (SCHOREY *et al.*, 2015).

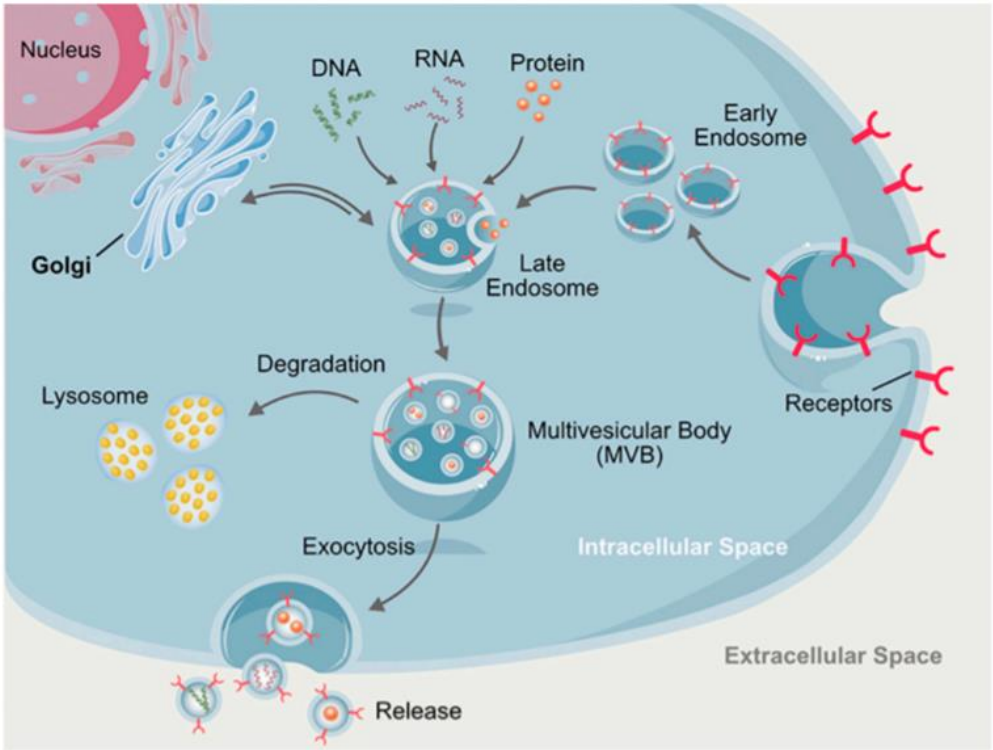

Figura 5. Biogênese e cargas de exossomos. O desenvolvimento do exossomo se inicia com a endocitose para formação dos endossomos iniciais, posteriormente formando endossomos tardios por brotamento interno e, finalmente, gerando corpos multivesiculares (MVBs). Os MVBs podem sofrer degradação gerando lisossomos ou se fundirem com a membrana celular e, por exocitose, liberar vesículas, agora denominadas exossomos, no ambiente extracelular (BAZZAN *et al.*, 2021; GURUNATHAN; KANG; KIM, 2021).

Por estes motivos, estudos vêm surgindo tentando explorar o potencial das VEs e desvendar os mecanismos por trás da doença a fim de convergir, possivelmente, no desenvolvimento de alguma forma de imunoterapia ou vacina contra a esporotricose utilizando estes alguns destes componentes vesiculares (BLISS *et al.*, 2020; CHOI *et al.*, 2015; MARKOV; OSHCHEPKOVA; MIRONOVA, 2019; SHEARS *et al.*, 2018). Há grande interesse da comunidade científica quanto às respostas imunológicas do organismo no contexto de interação com vesículas extracelulares e não só para fungos mas para muitos outros tipos celulares, buscando entender de que forma a resposta estaria sendo modulada, positivamente ou não, pelas VEs; quais seriam as estratégias de evasão do fungo,

as proteínas e moléculas envolvidas nessa comunicação, dentre muitos outros questionamentos (CHAKRABARTI *et al.*, 2015; GARCÍA CARNERO *et al.*, 2018; IKEDA *et al.*, 2018; ROSSATO; SILVANA DOS SANTOS; *et al.*, 2019). Esse recente interesse nos estudos de vesículas extracelulares de modo geral pode ser observado na Figura 6.

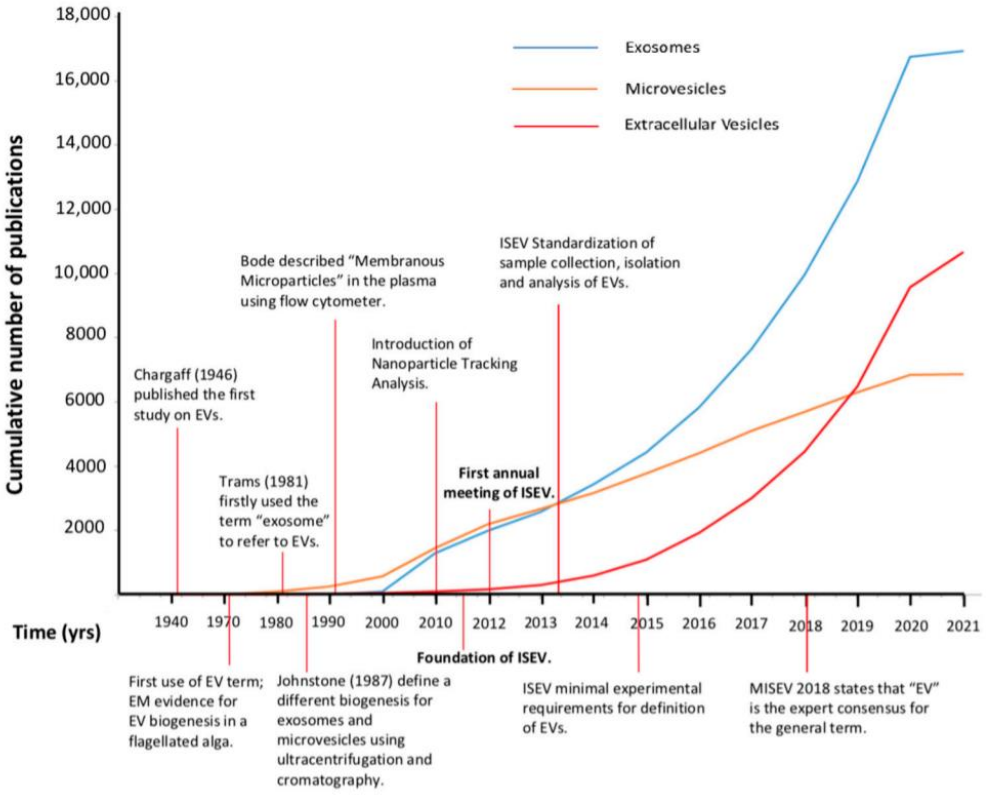

Figura 6. Número cumulativo de publicações. Evolução comparativa do uso de diferentes termos para EVs (exossomos, microvesículas ou vesículas extracelulares) na literatura de 1946 a 2021. EVs: vesículas extracelulares; EM: microscopia eletrônica; ISEV: Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares; MISEV: Informações mínimas para estudos de vesículas extracelulares. Modificado de BAZZAN *et al.*, 2021.

Embora haja interesse em seu estudo, o atual conhecimento sobre as respostas imunes contra o *S. brasiliensis,* seus mecanismos, bem como o envolvimento das VEs nisto ainda é escasso quando comparado ao volume de informações disponíveis para o *S. schenckii* ou outros fungos como *C. albicans*, por exemplo. Parte disso se dá pela distribuição geográfica do *S. brasilensis*,

fazendo com que a patologia seja endêmica do Brasil enquanto as demais espécies possuem, na maioria das vezes, distribuição global (CHAKRABARTI *et al.*, 2015).

1.3 Via de Alta Osmolaridade do Glicerol (*High Osmolarity Glicerol Pathway*)

A HOG1 (UniProtKB - P32485), uma proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), é a principal proteína da via de Alta Osmolaridade do Glicerol (HOG). Seu envolvimento está principalmente na transdução do sinal proveniente de estresses, seja advindo do hospedeiro ou do ambiente, os quais são detectados pelos osmossensores presentes na membrana plasmática. Estes sensores, como Sln1 e Sho1 (Figura 7) detectam mudanças e geram uma cascata de sinalização que ultimamente resultará na mudança transcricional, modulação e expressão de diversos genes que atuarão na célula de modo a contrapor o dano sofrido e manter a homeostase celular sem que haja seu rompimento por conta de alterações na pressão osmótica, por exemplo. Estudos descrevem a presença da sequência genética que codifica a HOG1 em, ao menos: *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Cryptococcus* spp. e *Saccharomyces cerevisiae* (BAHN; JUNG, 2013; BRUDER NASCIMENTO *et al.*, 2016; CHEETHAM *et al.*, 2011; NASUTION *et al.*, 2017).

A atividade da proteína quinase HOG1 foi relatada durante a regulação da homeostase de ferro em *Saccharomyces cerevisiae*, regulando por *feedback* negativo a entrada de íons de ferro na célula (MARTINS *et al.*, 2018), na regulação do estresse por calor em temperaturas a partir de 39ºC (SHIRAISHI *et al.*, 2018; WINKLER *et al.*, 2002a), no estresse osmótico (NADAL-RIBELLES *et al.*, 2012; PROFT *et al.*, 2001), no estresse oxidativo (ALONSO-MONGE, R. *et al.*, 1999; ALONSO-MONGE, REBECA *et al.*, 2003). Ainda desempenha papel regulatório durante a replicação e transcrição do DNA evitando erro nas cópias do

DNA enquanto a célula sofre estresse osmótico, reduzindo a velocidade do ciclo de replicação celular (DUCH *et al.*, 2013; REITER *et al.*, 2013).

A incorreta manutenção da isotonia celular pode resultar em situações onde o conteúdo de água na célula baixa a níveis críticos, tornando-se plasmolisada, ou ainda pode ocorrer a lise da membrana no caso de entrada excessiva de água, levando à morte do micro-organismo. Com o intuito de reestabelecer a homeostase, assim que a mudança na osmolaridade é reconhecida pelos sensores osmóticos SLN1 e SHO1 que compõem as duas rotas principais da via da HOG, há a rápida transdução do sinal que segue com o auxílio de outras proteínas quinases da família PAK (Quinases Ativadas por p21) como a Cdc42 e Ste20 (ZHAO; MANSER, 2012). O sinal segue pela MAPKK Ste11p que, uma vez ativada, fosforila a MAPK Pbs2 sob condições hiper-osmóticas, resultando na ativação da HOG1 e transmissão do sinal até o núcleo para realizar os ajustes necessários à célula (HOHMANN, 2009; RODRÍGUEZ-PENA *et al.*, 2010; WINKLER *et al.*, 2002b). O tempo e a intensidade da ativação pode variar dependendo de qual rota foi ativada (GARCÍA-RODRIGUEZ; DURÁN; RONCERO, 2000). Para propriamente regular a osmolaridade do citoplasma, a via de HOG utiliza o glicerol como agente de proteção osmótica, de modo que, conforme a osmolaridade muda, a HOG1 induz uma mudança transcricional no núcleo que resultará no influxo de glicerol para o citoplasma com o intuito de restaurar a isotonia da célula novamente (ALONSO-MONGE, R. *et al.*, 1999; JOSÉ *et al.*, 1996; SIDERIUS *et al.*, 2002). O glicerol utilizado pela via pode surgir como resultado da ação da glicerol-3-desidrogenase ou da glicerol quinase, proteínas que fosforilam respectivamente o gliceraldeído-3-fosfato (G3P) e a dihidróxiacetona (DHA) gerando glicerol (XUE; CHEN; JIANG, 2017).

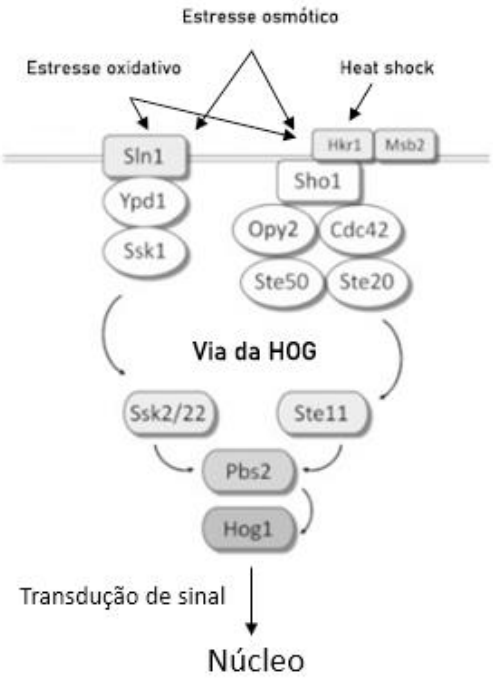

Figura 7. Via metabólica da MAPK HOG com seus dois braços principais: Sho1 e Sln1. Estes são sensores osmóticos presentes na membrana celular e responsáveis por detectar alterações no meio externo e comunicar a célula dessas mudanças afim de produzir uma resposta contra o estresse. Adaptado de (RODRÍGUEZ-PENA *et al.*, 2010).

Além do papel na regulação do estresse, Alonso-Monge e colaboradores observaram ao utilizar leveduras de *Candida albicans* mutantes de HOG1 que as células demonstraram incapacidade de finalizar o ciclo de replicação, no momento da citocinese. As células exibiram diferenças na morfologia das colônias e ainda relataram que camundongos infectados com fungos mutantes para HOG1 exibiram aumento drástico na sobrevivência, apontando para possíveis abordagens clínicas (ALONSO-MONGE, R. *et al.*, 1999).

Tendo em vista este papel amplamente importante da proteína na manutenção da homeostase fúngica, seria interessante analisar que tipos de modificações seriam causadas tanto ao fungo quanto ao quadro infecioso do hospedeiro caso a HOG1 não esteja presente (*knockout*), ou seja, expresso em níveis reduzidos (*knockdown*).

1.4 Transformação mediada por *A. tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens é uma espécie bacteriana pertencente ao gênero *Agrobacterium*, o qual fora descrito pela primeira vez em 1907 como um micro-organismo capaz de gerar tumorações, também conhecido como galhas, em diversas espécies de plantas (SMITH; TOWNSEND, 1907). Em meados de 1980 cientistas começaram a notar a possibilidade de utilizar a maquinaria do *A. tumefaciens* responsável por integrar os fragmentos de material genético para outros seres vivos. Uma possibilidade seria inserir outros fragmentos de DNA que não só os da bactéria por meio de um sistema de transformação bacteriana feito em laboratório, uma ferramenta que simula a interação que ocorre na natureza entre a bactéria e as plantas (COSTANTINO *et al.*, 1980; GARFINKEL *et al.*, 1981; HOEKEMA *et al.*, 1983; THOMASHOW *et al.*, 1980). Este cenário de manipulação e inserção de sequências de DNA em uma planta utilizando esta bactéria foi o início do que viria a se tornar o sistema de Transformação Mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, ou pela sigla em inglês, *ATMT,* como é mais conhecido atualmente.

1.4.1 Mecanismos genéticos

Para que consiga realizar a transferência do material genético para outra célula, o *Agrobacterium* faz uso de uma maquinaria complexa e refinada que envolve diversas moléculas e proteínas. Entre estas, uma soma de proteínas é transcrita a partir das sequências encontradas nos genes de virulência localizados no plasmídeo Ti ou *tumor-inducing plasmid,* como os gene *Vir*: *VirA, VirB, VirC, VirD, VirE, VirF e VirG* (Figura 8). As funções destas proteínas variam bastante, visto que algumas possuem mais de 10 subtipos, como no caso de VirB. Funções estas que vão desde a clivagem do T-DNA no *A. tumefaciens*, passando pela

formação do sistema de secreção do tipo IV e movimentação do T-DNA pela membrana até a célula alvo, finalizando com a ligação do fragmento de DNA transferido com o genoma de interesse (GELVIN, 2003; STACHELT; NESTER, 1986; VERGUNST *et al.*, 2000).

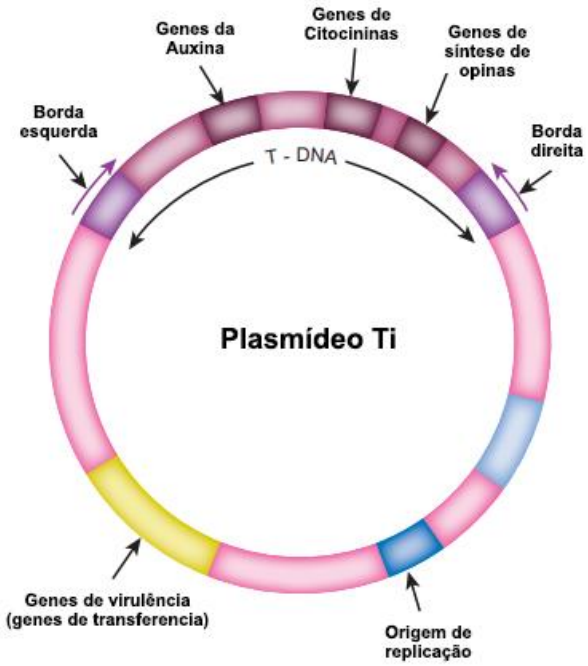

Figura 8. Plasmídeo de indução de tumor ou plasmídeo Ti é o responsável por carrear a informação genética responsável por grande parte do processo de transformação, desde a resistência da bactéria a drogas e os genes *Vir* (em amarelo), quanto diversos genes codificantes de auxinas e fatores de crescimento que irão contribuir para a geração do tumor no tecido vegetal. Traduzido de CLARK; PAZDERNIK; MCGEHEE, 2019.

Uma das potenciais utilizações deste sistema atualmente, a qual foi empregada neste estudo, é gerar modificações nos níveis de expressão de uma dada proteína através da tecnologia de RNA de interferência, onde uma sequência de nucleotídeos complementar ao RNA (*anti-sense*) se pareia à sequência do mRNA naturalmente gerado pela célula, formando o RNA dupla fita (dsRNA). Por haver complementariedade, a maquinaria celular reconhece o dsRNA e por meio de endonucleases como a *Dicer*, um tipo de RNase III, leva esta dupla fita à

degradação, havendo a geração de diversos fragmentos menores também conhecidos como RNA não codificantes; dentre eles os RNAs de interferência (siRNA, *small interfering RNAs*) e os micro RNAs (miRNAs) (TIJSTERMAN; PLASTERK, 2004). Estes fragmentos possuem em torno de 22 pares de bases e são responsáveis por regular de forma pós-transcricional uma parte considerável da expressão gênica. (MEISTER; TUSCHL, 2004; ZAMORE *et al.*, 2000). A função exata destas sequências diminutas de RNA tem sido questionada desde a sua primeira descrição em 1993. Inicialmente fora constatado pelos pesquisadores que havia a presença de alguns fragmentos de RNA que não tinha por finalidade codificar proteínas, os quais eram advindos do gene de controle do desenvolvimento larval *lin-4,* de *C. elegans* (LEE; FEINBAUM; AMBROST, 1993; WIGHTMAN; HA; RUVKUN, 1993). Hoje se sabe que os miRNAs são de suma importância para o funcionamento da célula como um todo, estando envolvidos em um sorte de cenários, como na proliferação celular, morte celular, metabolismo de lipídeos, formação dos padrões neuronais em nematódeos, modulação da diferenciação das linhas hematopoiéticas e ainda controle do desenvolvimento de folhas e flores em vegetais (BARTEL, 2004). Para o gênero *Sporothrix*, especificamente, os dados referentes a este assunto são escassos. Com estes pontos em mente, consideramos que a abordagem escolhida por nós para realizar a transformação (ATMT) e redução da expressão de HOG1 *Sporothrix brasiliensis* (RNAi) detém considerável chance de sucesso, podendo gerar, pela primeira vez, o estabelecimento do protocolo de transformação mediada por *A. tumefaciens* para a espécie *Sporothrix brasiliensis* (*Sb*ATM). Há potencial para a criação de um modelo de estudo utilizando-se das leveduras de *S. brasiliensis* com expressão de HOG1 reduzida para avaliar os prováveis efeitos desta proteína e desta importante via na modulação do processo infeccioso na esporotricose, bem como sua ligação com a resposta das células fúngicas a variados tipos de estresse.

2. Justificativa

Conhecendo a importância da MAPK HOG1 (p38), bem como das VEs de *S. brasiliensis* na resposta imune contra este fungo (IKEDA *et al.*, 2018), nosso projeto visa analisar a participação da HOG1 na infecção causada por isolados de *Sporothrix* WT e mutantes de HOG1, também avaliando se estas VEs poderiam participar juntamente à HOG1 modulando as repostas do hospedeiro durante a propagação do fungo no hospedeiro.

3. Objetivos

Gerais

- Analisar a influência das VEs do fungo na resposta imune contra a infecção causada pelo fungo *S. brasiliensis wild-type* e mutante para HOG1.

Específicos

- Análise do perfil de resistência a diversos agentes perturbadores de parede;
- Executar a padronização do sistema de Transformação Mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT);
- Estudar a diminuição de expressão de proteínas importantes, como a HOG1, por meio de *knockdown* utilizando a técnica de RNA de interferência (RNAi);
- Análise da capacidade de apresentação de antígeno das DCs, frente à interação com as VEs do fungo WT e mutantes;

4 Material e métodos

4.1 Fungo e preparo do inóculo

Foram utilizadas neste estudo leveduras das espécies *S. schenckii, S. brasiliensis* cepa 5110 (*ATCC*® MYA-4823™), gentilmente cedida pela Profa. Dra. Leila Lopes de Bezerra, isolado de esporotricose cutânea felina no Rio de Janeiro e também o isolado *S. brasiliensis* M1168, isolado de esporotricose meníngea em paciente com HIV, cedida gentilmente pelo Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida. As culturas foram mantidas com repiques a cada 20 dias em tubos de ágar inclinado *Brain heart infusion* (BHI) em estufa microbiológica a 37°C. Para os inóculos, as leveduras foram ressuspedidas em tampão PBS 1x estéril e as leveduras foram contadas na câmera de Neubauer, quando necessário, para definir as concentrações de uso de acordo com cada experimento.

4.2 Marcação de quitina com Calcofluor-white (CFW)

Para a marcação da quitina presente na parede celular dos fungos utilizamos o reagente Calcofluor-White (CFW), que tem capacidade de se unir às ligações β-1-3 e β-1-4 dos polissacarídeos que compõem as moléculas de quitina (RASCONI *et al.*, 2009).

Duas culturas foram incubadas a 25ºC para surgimento de hifas e conídios e a 37ºC para crescimento de leveduras. Foi adicionado em cada tubo 25 µL de solução de CFW estoque a 1000 µg/mL em 1 mL de suspensão fúngica para uma concentração final de 25 µg/mL. As suspensões foram homogeneizadas e repousaram por 30 minutos no escuro.

4.3 Ensaio de estresse celular

Para analisar a resposta de nossos isolados a diferentes tipos de estresses, utilizamos um ensaio de estresse celular onde são empregados diversos agentes perturbadores de parede celular como dodecil sulfato de sódio (SDS), $NaNO_2$, alta concentração de NaCl e reagentes como Cong Red ou

Calcofluor-White para analisar os efeitos que estes reagentes podem causar na membrana celular, no DNA e no desenvolvimento dos isolados. Para isso, utilizamos meios de cultivo BHI suplementado com diferentes concentrações dos agentes estressantes (Tabela 1). A partir de uma cultura com 1 x 10^7 células/mL foram feitas seis diluições seriadas com fator de diluição 1:5 e os inóculos foram feitos com uma pipeta multicanal utilizando 5 µL de suspensão fúngica.

Agente estressante	Concentração
NaCl	300 mM, 600 mM
Congo Red	1 µM, 3 µM
SDS	0.001%, 0.0001%
CFW	5 µM, 15 µM
$NaNO_2$	25 mM
H_2O_2	1.5 mM, 3 mM, 5 mM

Tabela 1. Concentrações dos agentes perturbadores de parede e indutores de estresse osmótico ou oxidativo.

4.4 Vesículas extracelulares de *S. brasiliensis*

4.4.1 Isolamento das VEs

O isolamento foi baseado em protocolos anteriores com VEs de outras espécies fúngicas (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Foi realizada uma cultura de leveduras de *S. brasiliensis* em caldo *BHI* à 37°C sob agitação orbital constante (180 rpm) por 6 dias. A cultura foi inicialmente submetida a uma centrifugação a 4.500 x *g* por 15 minutos para remoção das células fúngicas. Em seguida, o sobrenadante foi submetido à nova centrifugação a 15.000 x *g* por 15 minutos para a remoção de *debris* celulares. Em seguida, o sobrenadante foi submetido a uma ultracentrifugação a 100.000 x *g* por 1 hora, para precipitar as VEs. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de VEs formado foi diluído em PBS 1x filtrado em membrana de 0.40 µm e submetido novamente à ultracentrifugação a 100.000 x *g* por 1 hora, para remoção de possíveis impurezas. O sobrenadante foi

descartado novamente e o *pellet* final foi diluído em PBS 1x estéril e estocado à temperatura de – 80°C até o uso.

4.5 Análise por *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA)

Os dados de concentração e tamanho médio das VEs foram gerados após análise pela técnica de *Nanoparticle Tracking Analysis*, no aparelho NS300 (Nanosight® 3.4 Build 3.4.003 – Malvern Instruments Ltd.) presente no departamento de Nefrologia da Universidade Federal de São Paulo, Campus Vila Clementino. As análises foram realizadas na viscosidade ajustada para água (0,9 cP), temperatura de 25°C, com detecção de 749 *frames,* na velocidade de 25 *frames* por segundo.

4.6 Plasmídeos

Os quatro plasmídeos utilizados neste estudo carreiam os insertos com a sequência *anti-sense*, ou seja, uma sequência complementar à fita de RNA mensageiro naturalmente produzido pela célula fúngica (Figura 9A). A partir da sequência do mRNA correspondente à proteína HOG1 em *S. brasiliensis* (SPBR_02713), obtida no *website* https://fungidb.org e conferida via BLAST, foram sintetizadas quatro sequências complementares a esta fita de mRNA de aproximadamente 200 pares de base distribuídas ao longo da sequência original de 1305 pb.

A construção do plasmídeo foi executada pela empresa GENONE, onde, partindo do plasmídeo pLUO-*GFP* (NORA *et al.*, 2019), escolhido como vetor, neste foram adicionadas as sequências dos $AS_{(n)}$ citados acima e do gene codificante para a higromicina B fosfotransferase. Desta forma, o fungo que possuir este fragmento incorporado ao seu genoma passará a exibir resistência ao antibiótico Higromicina B, o qual foi empregado como agente de seleção do fungo em etapas deste trabalho. No vetor pLUO, o cassete carreando os insertos $AS_{(n)}$-*GFP* está sob ação do promotor *CBP1* (*Calcium binding protein*) e terminador *CATB* (Catalase B), ambos de *Histoplasma capsulatum* (TORRES *et al.*, 2013),

flanqueados, respectivamente, pelos sítios de restrição KpnI e BamHI. O gene da *HPH* está sob o controle do promotor URA3 e do terminador ADH1, ambos de *Saccharomyces cerevisiae*.

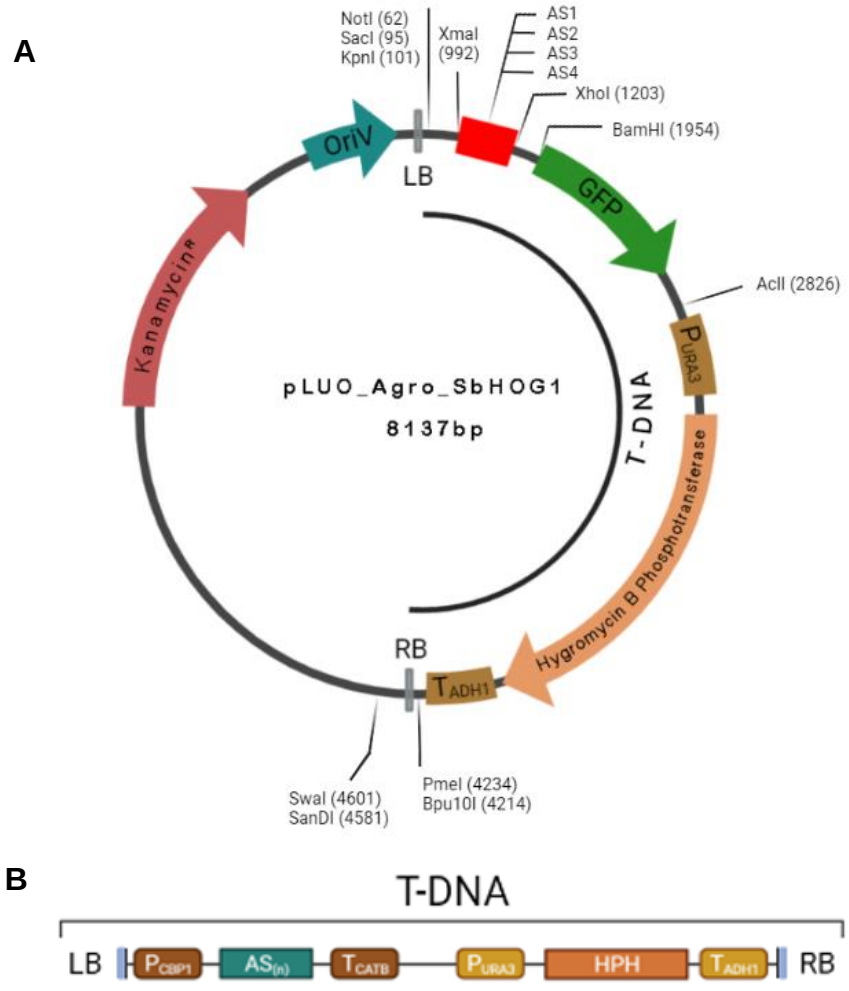

Figura 9. Mapa do plasmídeo. **A)** Para seleção nas bactérias foi escolhido o gene de resistência à canamicina. Para a seleção nos fungos, há a presença do gene da higromicina fosfotransferase (*HPH*). A região em vermelho denota o sítio múltiplo de clonagem onde estão inseridos nossos insertos, flanqueados, dentre outros, por XmaI e XhoI. **B)** O vetor pLUO carreia o cassete *GFP* contendo os insertos *anti-sense* de 1 a 4 e flanqueados pelo promotor *CBP1* (*Calcium binding protein*) e terminador *CATB* (Catalase B). O gene da *HPH* é controlado pelo promotor URA3 e pelo terminador ADH1.

4.7 Protocolo de transformação de *Escherichia coli* DH5α

Em tubos estéreis foram adicionados 5 µL dos plasmídeos contendo o inserto de interesse e adicionados 50 µL de células de *E. coli* DH5α. O tubo foi colocado no gelo por 30 minutos e logo em seguida passado para o termo bloco a 42ºC por 1 minuto. Os tubos foram colocados novamente no gelo por 5 minutos. Foram pipetados 500 µL de meio SOC (Triptona 5g/L, Extrato de levedura 20 g/L, NaCl 0.5 g/L, KCl 0.186 g/L, $MgSO_4$. $7H_2O$ 10 mM, $MgCl_2$. $6H_2O$ 10 mM, Dextrose 20 mM) no tubo e este foi incubado em agitadora a 37ºC por 1 hora a 180 rpm. Após uma hora, foi plaqueado 300 µL da solução em meio ágar Luria Bertani (LB) contendo canamicina (30 µg/mL) e outros 200 µL em meio LB sem antibiótico (controle positivo). As placas cresceram durante a noite a 37ºC até o surgimento de colônias visíveis ("Bacterial Transformation Workflow–4 Main Steps | Thermo Fisher Scientific - BR")

4.8 Protocolo de mini preparação plasmidial

Após o crescimento das bactérias na etapa anterior, três colônias isoladas foram selecionadas. As colônias crescidas foram transferidas para um tubo Falcon de 50 mL contendo meio LB + ampicilina (100 µg/mL) e cresceram *overnight* a 37ºC com agitação (180 rpm). Em cada tubo foi adicionado 200 µL da solução 1 (Glicose 50 mM, TRIS-HCl 25 mM pH 8.0, EDTA 10 mM) e homogeneizados no vórtex. A solução irá adquirir aspecto leitoso. A seguir, adicionou-se 400 µL da solução 2 (NaOH 0.2M, SDS 1%) em cada tubo e homogeneizado gentilmente até a solução se tornar translúcida. Por último, foram adicionados 300 µL da solução 3 (CH_3CO_2K 3M, CH_3COOH 5M) em cada tubo e homogeneizados gentilmente. Ao final, os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 14500 x g. Os tubos contendo o DNA plasmidial foram mantidos a -20ºC até o uso (DULK-RAS; HOOYKAAS, 1995).

4.9 Transformação do *S. brasiliensis* M1168 mediada por *A. tumefaciens*

O procedimento de inserção do T-DNA por meio da transformação fúngica mediada por *Agrobacterium tumefaciens* foi realizado com base no protocolo estabelecido por Michielse e colaboradores com modificações (MICHIELSE *et al.*, 2008).

4.9.1 Preparação de células de *A. tumefaciens* competente

Uma cultura estoque de A*grobacterium tumefaciens* LBA1100 mantida a -80ºC foi incubada em ágar LC (NaCl 8 g/L, Triptona 10 g/L, Extrato de levedura 5g/L, Ágar 1.5%) sem antibióticos por 3 dias a 28ºC. Após crescimento, uma única colônia isolada foi coletada e transferida para um tubo Falcon de 15 mL contendo 2 mL de meio LC a 28ºC por 12 horas sob agitação a 180 rpm. Desta cultura, 100 µL foram transferidos para um frasco estéril contendo 100 mL de meio LC suplementado com 0.1% de dextrose e incubadas *overnight* a 28ºC sob forte agitação (220 rpm) até atingirem a densidade ótica DO_{660} de 1 - 1.5. Passado este tempo, o tubo foi resfriado em gelo por 15 minutos antes de ser centrifugado a 4.000 x g por 20 minutos. O *pellet* de células foi coletado e ressuspendido em 10 mL de HEPES 1 mM (pH 7) e centrifugado novamente para lavar as células. Esta lavagem seguida de centrifugação foi repetida mais duas vezes. Em seguida, a amostra foi lavada a quarta e última vez com 10 mL de solução de glicerol 10% e centrifugado a 4.000 x g por 20 minutos. O *pellet* final contendo o *A. tumefaciens* competente foi ressus0pendido em 750 µL de glicerol 10% e foram feitas alíquotas de 40 µL em tubos estéreis e congelados em -80ºC até posterior uso (DULK-RAS; HOOYKAAS, 1995).

4.9.2 Eletroporação do *A. tumefaciens*

De início foram colocados para descongelar lentamente (10-15 minutos) os tubos contendo 40 µL de suspensão de *A. tumefaciens* competentes produzidos no passo anterior. As cubetas de eletroporação também foram colocadas em gelo

para resfriarem. Com os tubos descongelados, adiciona-se de 1 - 5 µL (10 ng) de cada plasmídeo contendo o inserto de RNA *anti-sense* no tubo com 40 µL de cultura e misturamos gentilmente. A suspensão foi transferida para a cubeta resfriada e inserida no aparelho (Gene Pulser Xcell – Bio-rad) com o cuidado de que ambos os eletrodos estejam em contato com a suspensão de células e que a parte externa da cubeta esteja totalmente seca. É aplicado um pulso elétrico com tensão de 2.5 kV, capacitância de 25 µF e resistência de 200Ω. Isso resultará em um pulso de 12.5 kV / cm com uma constante de tempo de 5.2 milissegundos. Imediatamente após o fim do pulso, adiciona-se 1mL de meio SOC (Triptona 5g/L, Extrato de levedura 20 g/L, NaCl 0.5 g/L, KCl 0.186 g/L, $MgSO_4 . 7H_2O$ 10 mM, $MgCl_2 . 6H_2O$ 10 mM, Dextrose 20 mM) e rapidamente, mas gentilmente, a amostra foi homogeneizada com uma pipeta Pasteur estéril. A suspensão foi transferida para um tubo estéril de 1.5 mL e incubadas a 28ºC por 1 - 1.5 h a 190 rpm. Foram plaqueados 100 µL do cultivo em placa com ágar LC contendo 100 µg/mL de canamicina e incubados por 2 dias a 28ºC para seleção das células eletroporadas com sucesso (DULK-RAS; HOOYKAAS, 1995). Manter as células com repiques a cada 5 dias em meio LC sólido contendo 100 µg/mL de Canamicina ou armazená-las em glicerol 10% a -80ºC.

4.9.3 Análise da sensibilidade aos antibióticos para *S. brasiliensis* e *A. tumefaciens*

Para determinar as concentrações de Higromicina B a serem utilizadas neste estudo, foram testadas as concentrações mínimas necessárias para inibir o crescimento do isolado *S. brasiliensis* M1168: 50 µg/mL, 70 µg/mL, 100 µg/mL e 150 µg/mL. As placas foram crescidas à 37ºC por 7 dias em meio BHI suplementado com higromicina B Gold (InvivoGen). As concentrações de rifampicina, canamicina e cefotaxima sódica para a seleção do *A. tumefaciens* também foram avaliadas.

4.9.4 Co-cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* e *Sporothrix brasiliensis*

Primeiramente as células de *A. tumefaciens* eletroporadas com os plasmídeos contendo os insertos *anti-sense* para a sequência do mRNA da HOG1 cresceram por 15 horas em tubo Falcon de 50 mL com meio LC líquido e acetoceringona (ASg) (200 µM), rifampicina (20 µg/mL) e canamicina (100 µg/mL). Um mililitro da cultura foi centrifugado (4000 x g, 10 minutos), o *pellet* lavado com meio de indução (IM) (BUNDOCK *et al.*, 1995) também contendo antibióticos e centrifugado uma última vez. As células de *A. tumefaciens* foram diluídas em 5 mL de IM, a concentração ajustada na DO_{660nm} em 0,3 e re-incubadas a 28°C até atingir uma DO_{660nm} de aproximadamente 0,8.

Paralelamente, leveduras de *S. brasiliensis* foram cultivadas em Erlenmeyer de 200 mL contendo 50 mL meio líquido BHI suplementado com 1% de glicose por 5 dias a 37°C sob agitação (180 rpm). Após o crescimento, as células foram centrifugadas a 4,000 x g por 10 minutos e o *pellet* foi lavado com IM com acetoceringona sem antibióticos. As células devem ser contadas em câmara de Neubauer e a suspensão ajustada para 1 x 10^7 células/mL.

Em um tubo estéril foram preparadas as suspensões com diferentes proporções de células de *A. tumefaciens* e *S. brasiliensis* M1168, respectivamente: 1:1, 1:10, 10:1. Também foi necessário testar diferentes tempos de incubação (48 e 72h) em diferentes temperaturas (25ºC, 28ºC e 30ºC). Em placas de petri com ágar IM contendo acetoceringona (200 µM), rifampicina (20 µg/mL) e canamicina (100 µg/mL) foi colocada, com o auxílio de uma pinça esterilizada, uma membrana Millipore S-Pak Type HA, 47 mm, 0.45 µm. Nesta membrana foram plaqueados 200 µL das suspensões microbianas e as mesmas permaneceram abertas em capela de fluxo laminar com as luzes apagadas por aproximadamente 20 minutos para secarem, uma vez que a acetoceringona é um composto sensível à luz. As placas foram incubadas a 25ºC, 28ºC ou 30ºC por 48h ou 72h. É importante que não haja flutuação da temperatura durante o processo de co-cultivo das células.

Após o tempo estabelecido, com o auxílio de pinça estéril, as membranas foram transferidas para tubos Falcon de 50 mL contendo 7.5 mL de meio BHI

adicionado de cefotaxima sódica (350 µg/mL) para selecionar os transformantes e eliminas as células bacterianas. Com uma alça de cultivo estéril, as células aderidas à membrana foram descoladas e o tubo agitado por alguns segundos em agitador tipo vórtex. Após, a tampa dos tubos permaneceu levemente solta para permitir a correta aeração do meio durante a incubação. Permitir que as células se recuperem incubando-as a 37ºC por 48 horas e agitação a 200 rpm. Os tubos foram centrifugados a 2.500 x g por 5 minutos e as células plaqueadas em ágar BHI contendo 100 µg/mL de higromicina B Gold (InvivoGen ant-gh-1) por 10-15 dias a 37ºC monitorando a formação de colônias fúngicas. A concentração adequada de higromicina pode variar, portanto deve ser padronizada previamente dependendo da espécie de fungo utilizado e do fabricante do antibiótico.

4.9.5 Seleção de transformantes e avaliação da estabilidade mitótica

Observando o crescimento de colônias após a recuperação das células transformadas, estas foram isoladas com alça estéril de 1 µL em nova placa com meio sólido BHI contendo 100 µg/mL de higromicina B. Estas colônias foram plaqueadas novamente em meio BHI seletivo por ao menos 3 vezes para garantir que a o processo de incorporação do fragmento de T-DNA se consolidou e não houve perda do fragmento durante a reprodução celular.

4.10 Extração de DNA genômico

Os transformantes selecionados foram coletados do meio sólido com alça de cultivo estéril com cuidado para não raspar o meio de cultivo. Esta extração pode ser realizada também a partir de cultivo em meio líquido. As amostras foram transferidas para um tubo de 1.5 mL contendo aproximadamente 300 µL de pérolas de vidro de 600 µm, 200 µL de solução de lise (10 mM Tris · Cl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA 1% (p/v), SDS 2% (v/v), Triton X-100) e 200 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamilico (UltraPure™ Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol 25:24:1, Invitrogen™). Os tubos são colocados no agitador vórtex por 25 minutos em velocidade alta. Após a lise mecânica, adicionar 200 µL de buffer TE (10 mM

Tris · Cl, pH 8.0, 1 mM EDTA), homogeneizar os tubos no agitador e centrifugar os tubos a 14.300 x g por 15 minutos a 4ºC. Transferindo a fase aquosa superior para um novo tubo, deve-se sacrificar certa quantidade para não aspirar a fase orgânica e garantir a pureza da extração. Adiciona-se 40 µL de acetato de sódio 3 M e faz-se a homogeneização delicadamente por inversão. Em seguida adiciona-se 1 mL de etanol absoluto (EMSURE® - Merck) e deixamos o DNA precipitando a -80ºC por pelo menos 1 hora ou a -20ºC *overnight*. Os tubos foram centrifugados por 30 minutos a 14.300 x g, o sobrenadante foi descartado e adicionados 500 µL etanol 70% mantido a -20ºC. Os tubos foram centrifugados novamente a 14.300 x g por 5 minutos e o sobrenadante removido. Repetir a centrifugação anterior, agora por 30 segundos, e utilizar uma ponteira de 10 uL para remover o resíduo do etanol nos tubos, deixando os mesmos secando a temperatura ambiente por 5 minutos para que os traços finais de etanol evaporem. Ressuspender o *pellet* de DNA genômico em 50 uL de água ultrapura *nuclease-free*. As amostras foram quantificadas no espectrofotômetro NanoDrop™ 2000/2000c (Thermo Scientific™) com rendimento superior a 1ug/uL e pureza estimada na $DO_{260/280}$ entre 2,31 – 5,17.

4.11 Reação de PCR

As reações de PCR para amplificar os fragmentos correspondentes à região do DNA que codifica para a HOG1 foram realizadas utilizando os *primers* contidos na Tabela 2. As reações de PCR foram feitas em tubos estéreis com: 5 uL Master Mix 2x (Thermo Scientific™), 1 µL do *primer forward* (1 µM), 1 µL do *primer reverse* (1 µM), 1 µL da amostra (100 ng/µL) e água ultrapura para totalizar o volume final de 10 µL. As condições da reação foram um ciclo inicial de 95ºC por 2 minutos seguido de 35 ciclos a 95ºC por 30s para desnaturação, 42s a 57ºC para anelamento dos *primers* e 1 minuto a 72ºC para extensão e extensão final a 72ºC por 2 minutos (LORENZ, 2012).

Oligonucleotídeo	Sentido	Sequência (5'→3')	Amplicon (pb)
HPH F	*Sense*	TAT GTA CTG CGG GTG AAT AGC	434
HPH R	*Anti-sense*	TCG GGA CAG TCT TCG GC	
(CAL) SPBR_08013 F	*Sense*	CGC AAG ATG AAG GAC ACC GA	73
(CAL) SPBR_08013 R	*Anti-sense*	CGT TGT TAT CGC GGT CGA AG	
RT Sb 5110 Hog-1 F	*Sense*	GTT TAC CAA CGC CGA TGA TTC	149
RT Sb 5110 Hog-1 R	*Anti-sense*	CTC GGT AGC CGT TAT TCT CTT C	
pLUO.Hog1-AS1-F	*Sense*	GCT AGC TCA CGG TAG GT	217
pLUO.Hog1-AS1-R	*Anti-sense*	GAG ATG GCC GAG TTC ATT C	
pLUO.Hog1-AS2-F	*Sense*	CTA GCT TCG GAG TGG ACA TA	209
pLUO.Hog1-AS2-R	*Anti-sense*	CGA GAA ACA CTT ACG GCA TG	
pLUO.Hog1-AS3-F	*Sense*	GGC TAG CAC AAA CCG CAA	218
pLUO.Hog1-AS3-R	*Anti-sense*	AGG ATC ATG CTC ACA TGG C	
pLUO.Hog1-AS4-F1	*Sense*	GGG CTA GCT TAT TGG GCA G	220
pLUO.Hog1-AS4-R	*Anti-sense*	AGT TGC CCA CGA GTA CCT	

Tabela 2. Oligonucleotideos utilizados neste estudo para amplificação de diversas regiões de interesse.

4.12 Eletroforese em gel de Agarose

A integridade das amostras de DNA e RNA foi analisada por meio de eletroforese em gel de agarose. Para tal, foi preparado um gel de agarose 1% fundido em tampão TBE 1x e acrescido brometo de etídeo (EtBr). A corrida foi realizada sob uma voltagem de 100 Volts por 45 minutos. Após a corrida, o gel foi exposto à luz UV em fotodocumentador (UVITEC, Cambridge) para visualização das bandas de DNA ou RNA em virtude da presença do EtBr. Apenas amostras íntegras foram utilizadas nos experimentos.

4.13 Extração de RNA e síntese de cDNA

Leveduras de *S. brasiliensis* M168 com 7 dias de crescimento foram centrifugadas a 4.500 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em PBS. Para lisar as células foram utilizadas pérolas de

vidro de 600 µm e 800 µL de reagente TRizol™. Os tubos foram colocados em vórtex durante 25 minutos para rompimento das células. Após o término da lise mecânica, foram adicionados 200 µL clorofórmio aos tubos e os mesmos centrifugados a 12000 x g por 15 minutos a 4ºC. Nesta etapa ocorre o aparecimento de uma fase inferior vermelha (fenol + clorofórmio), uma fase intermediária, e a fase aquosa superior que contém o RNA. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo ao qual foi adicionado igual volume de etanol 70% livre de RNase. Das amostras, 700 µL foram transferidos para as colunas do kit de extração de RNA RNeasy mini kit #70104 (Qiagen). A síntese do cDNA foi realizada utilizando o kit Protoscript® First Strand cDNA Synthesis Kit #E63005 seguindo as instruções do fabricante. O produto de cDNA foi armazenado a -80ºC até o uso.

4.14 Tratamento do RNA com *DNAse* I

Para remover o DNA genômico das amostras, 500 ng de RNA total foram tratados com 2 unidades DNase I + buffer ($MgCl_2$) (Thermo Scientific) e incubados por 30 minutos a 37ºC em um volume final de 50 µL. Após o tempo, foi adicionado 1 µL de EDTA 0.5 M para cessar a reação; seguidos de uma última incubação a 75ºC por 10 minutos.

4.15 Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo método Two-*Way ANOVA* com múltiplas comparações pelo teste de Tukey (ZAR, 2010), utilizando o *software GraphPad Prism* 9. Foram considerados estatisticamente significantes os resultados com $p < 0.05$.

5 Resultados e Discussão

5.1 Morfologia

Primeiramente decidimos analisar a morfologia celular de hifas e leveduras de *S. schenckii, S. brasiliensis* 5110 e *S. brasiliensis* M1168 para confirmar se as células estavam íntegras e se haviam diferenças entre elas. Na figura 10A temos as hifas das três espécies, aonde todas apresentam tamanhos similares, com cada septo de suas hifas medindo cerca de 2 µm.

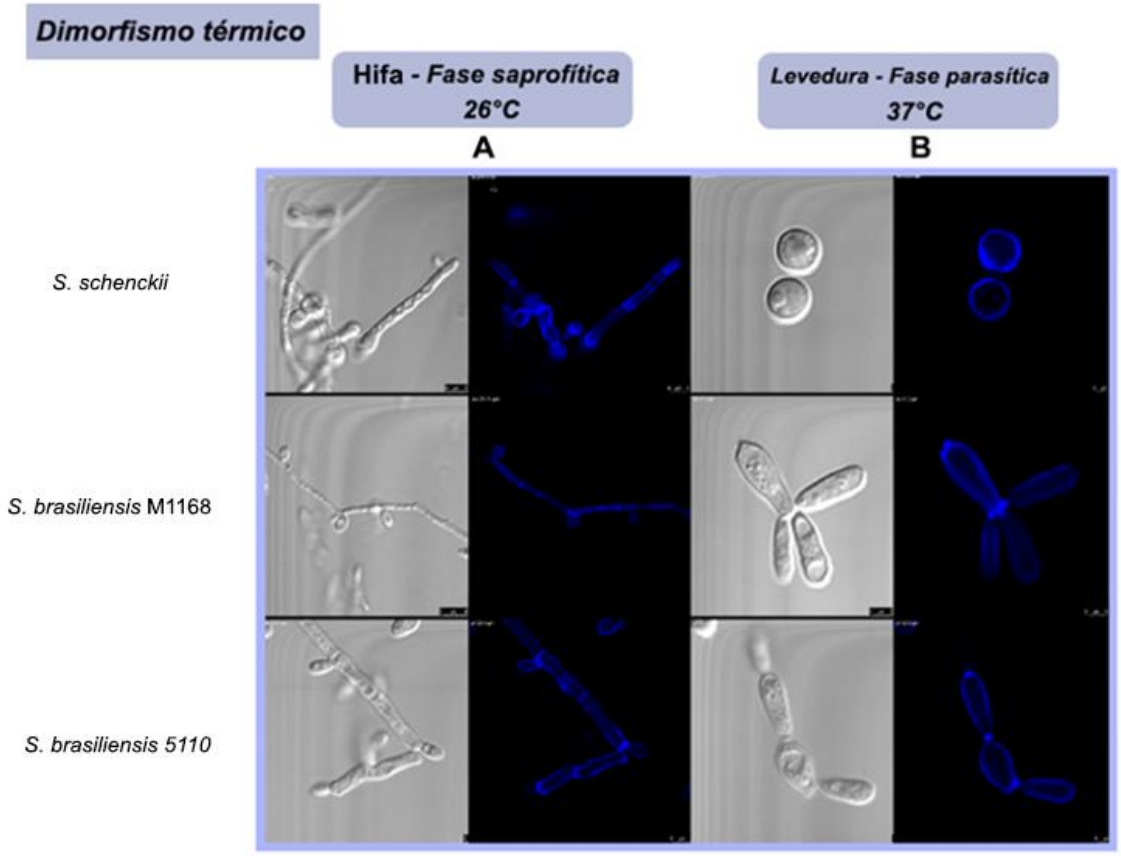

Figura 10. Morfologia das hifas **(A)** e leveduras **(B)** dos fungos *S. schenckii*, *S. brasiliensis* 5110 *e S. brasiliensis* M1168 cultivados em diferentes temperaturas. A parede celular dos fungos foi corada com calcofluor-White gerando as imagens com fluorescência no espectro azul. Microscopia confocal com aumento de 640x. Imagens obtidas no Laboratório de Imunologia Celular & Bioquímica de fungos e protozoários (**LICBfp**) da Universidade Federal de São Paulo – Campus Diadema.

Ao lado (Figura 10B) é possível observar as leveduras das três espécies e também visualizamos as leveduras de *S. schenckii* apresentando forma circular/ovoide enquanto as leveduras de *S. brasiliensis* 5110 e M1168 possuem um formato mais cilíndrico e alongado. As leveduras medem por volta de 1-3 µM. Todas as células estavam íntegras. Podemos ver a presença dos anéis de quitina no ápice das leveduras próximo do local de cisão, provenientes resultante do processo de citocinese na divisão celular, durante a reprodução assexuada. Após a divisão desigual do material citoplasmático, o anel de quitina se fecha formando uma nova levedura, menor que a progenitora original.

5.2 Ensaio de estresse celular

Como foi dito anteriormente, a HOG1 atua no controle de diversos tipos de estresse. A fim de analisarmos a capacidade de crescimento dos três isolados em diferentes meios de cultura e a consequente atuação da HOG1, utilizamos diferentes agentes indutores de estresse na parede do fungo para os três isolados: *S. brasiliensis* M1168 (M1168), *S. brasiliensis* 5110 (5110) e *S. schenckii* (Ss). Os fungos foram cultivados por 7 dias a 37ºC. Podemos observar inicialmente que, de modo geral, o isolado M1168 se mostrou capaz de crescer até as últimas diluições na maioria dos meios como Congo Red, $NaNO_2$, H_2O_2, NaCl e SDS (Figura 11 B, C, D e Figura 12 F e G). Observamos também que, até em meio altamente estressante como o suplementado com 600 mM de NaCl, o isolado M1168 ainda conseguiu crescer e formar colônias visíveis. O mesmo já não foi observado para o *S. schenckii e S. brasiliensis* 5110. Relacionado ao CFW, com concentração de 5 µg/mL todos os fungos apresentaram crescimento, destacando *S. brasiliensis* M1168 que cresceu uma diluição além das demais. No meio contendo 15 µg/mL nenhum dos fungos conseguiu crescer em nenhuma diluição.

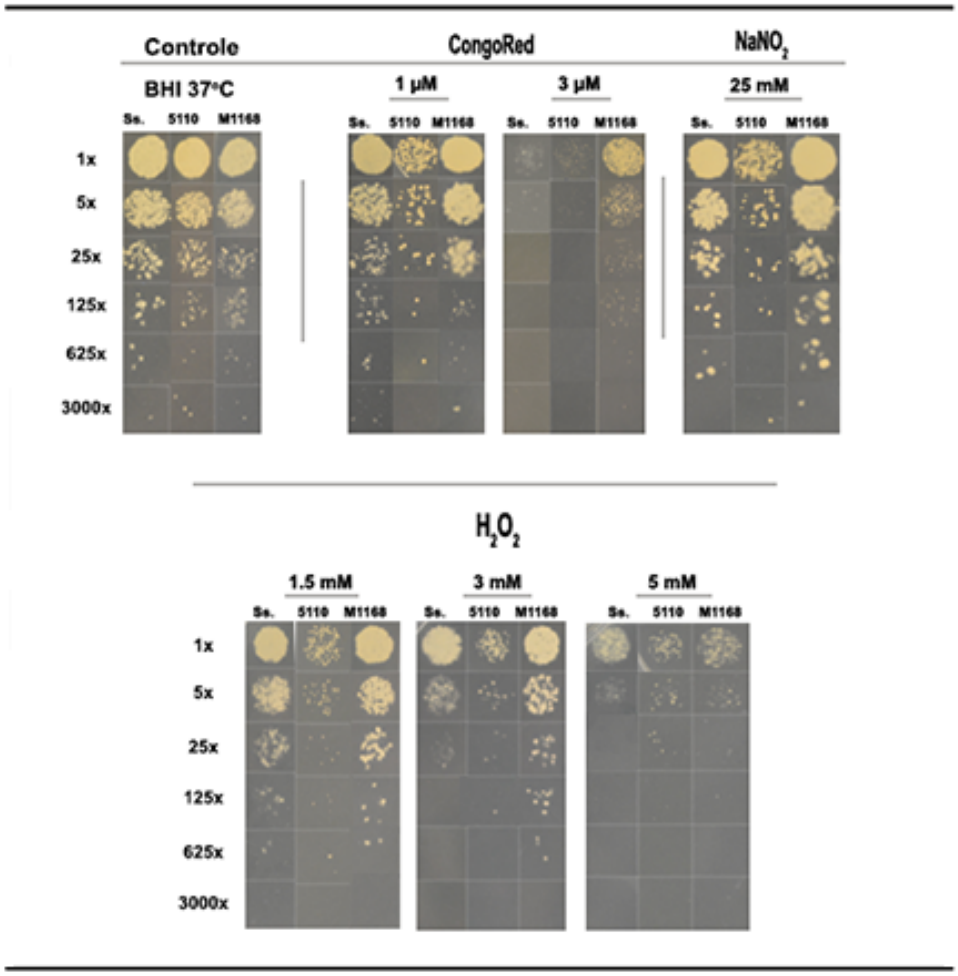

Figura 11. Ensaio estresse celular com múltiplos agentes perturbadores de parede e indutores de estresse em diferentes diluições. Os fungos foram cultivados em meio BHI a 37ºC por 7 dias. **A)** Controle; **B)** Congo Red; **C)** Nitrito de sódio; **D)** Peróxido de hidrogênio; **E)** Calcofluor-White; **F)** Cloreto de sódio; **G)** Dodecil sulfato de sódio.

S. schenckii teve condições de crescer em diversos meios (Figura 11 B, C, D e Figura 12 F e G) porém, incapaz de acompanhar o crescimento vigoroso do isolado M1168 em meios com concentrações mais altas como Congo Red 3 µM, H_2O_2 3 mM e 5 mM e NaCl 600 mM. Observamos que, somente nos testes com concentrações mais baixas, tanto *S. schenckii* quanto *S. brasiliensis* 5110 conseguem crescer até diluições semelhantes ao isolado *Sb* M1168.

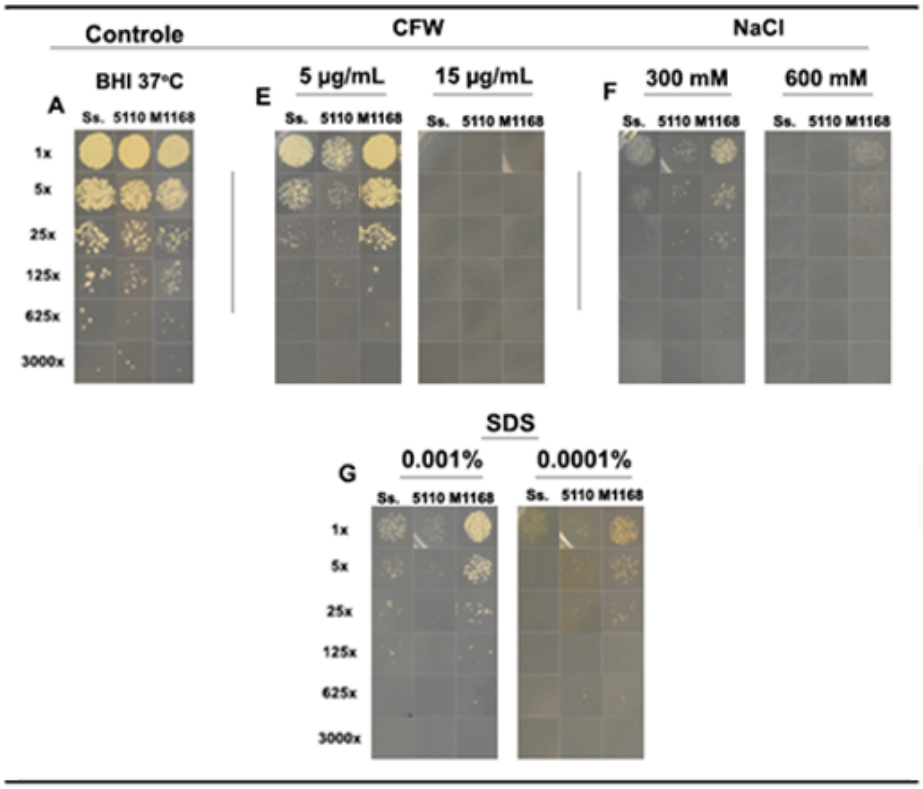

Figura 12. Ensaio estresse celular com múltiplos agentes perturbadores de parede e indutores de estresse em diferentes diluições. Os fungos foram cultivados em meio BHI a 37ºC por 7 dias. **A)** Controle; **B)** Congo Red; **C)** Nitrito de sódio; **D)** Peróxido de hidrogênio; **E)** Calcofluor-White; **F)** Cloreto de sódio; **G)** Dodecil sulfato de sódio.

Escolhemos cultivar os fungos *S. brasiliensis* 5110 e M1168 junto com o *S. schenckii* visto que na literatura temos evidencias que os isolados de *S. brasiliensis* exibem maior virulência em comparação ao *S. schenckii* (ROMERO-MARTINEZ et al., 2000; ARRILLAGA-MONCRIEFF *et al.*, 2009). Entretanto, quando observamos a Figura 12G podemos observar que o perfil resistência demonstrado pelo *S. brasiliensis* 5110 foi menor para o SDS em ambas as concentrações quando comparado a *S. schenckii* e *S. brasiliensis* M1168. Era esperado que um fungo que exibe maior virulência (*S. brasiliensis* 5110) viesse a refletir num perfil de resistência mais elevado que os demais, o que não se mostrou totalmente correto. Imaginamos que a característica de virulência mais elevada da cepa 5110 se dê dentro de um contexto complexo de interações com o hospedeiro, suas células e citocinas produzidas. Em um experimento

relativamente simples como esse, comparado à complexidade das interações durante uma infecção, por alguma razão ainda não clara, a cepa 5110 demonstrou perfil de resistência menos agressivo que *Sb* M1168. Apesar disso, já é estabelecido em nosso grupo que, em experimentos *in vivo,* a cepa *S. brasiliensis* 5110 e o isolado M1168 se mostram muito mais virulentas que o *S. schenckii,* e *Sb* M1168 mais que *Sb* 5110. É importante salientar que este crescimento mais vigoroso em meios contendo sais, muito provavelmente se faz possível pela atuação da HOG1, auxiliando na manutenção do potencial osmótico dentro da célula e permitindo que as leveduras cresçam até em concentrações altas de sais e outros agentes perturbadores.

Na Figura 11 ainda podemos notar certa resistência ao estresse induzido por NaCl, Congo Red e peróxido de hidrogênio para o isolado M1168 do *S. brasiliensis* em comparação ao *S. schenckii* e a cepa *S. brasiliensis* 5110. Para o cloreto de sódio, outro importante indutor da atividade da HOG1, o resultado do isolado M1168 é o mais surpreendente, sendo a única capaz de crescer até a terceira diluição. Resultados semelhantes foram obtidos para *Candida albicans* por Alonso-Monge et al. (1999), onde mutantes para HOG1 obtiveram crescimento abaixo do controle nos meios contendo H_2O_2, NaCl e KCl (ALONSO-MONGE, REBECA *et al.*, 2003; ENJALBERT *et al.*, 2006; HERNANDEZ-LOPEZ; RANDEZ-GIL; PRIETO, 2006). Em estudo avaliando os perfis de resistência de cepas de *S. brasiliensis* e *S. schenckii,* pesquisadores constataram que, assim como observamos nas figuras 11 e 12, os isolados de fato apresentam perfis de resistência diferenciado, mencionando a possível ligação entre a falta de 14 aminoácidos e a presença de um resíduo de cisteína conservado na região N-terminal na sequência da HOG1 de *S. brasiliensis* (ORTEGA *et al.*, 2015).

5.3 Caracterização das vesículas extracelulares

Para realizarmos a caracterização das VEs, a sua obtenção foi feita pela centrifugação da cultura de *Sporothrix brasiliensis* 5110 e *Sporothrix brasiliensis* M1168 como mostrado no item 4.4. A quantificação foi realizada para ambas as

amostras no equipamento *Nanosight*® NS300. Os resultados da análise podem ser observados na Figura 13.

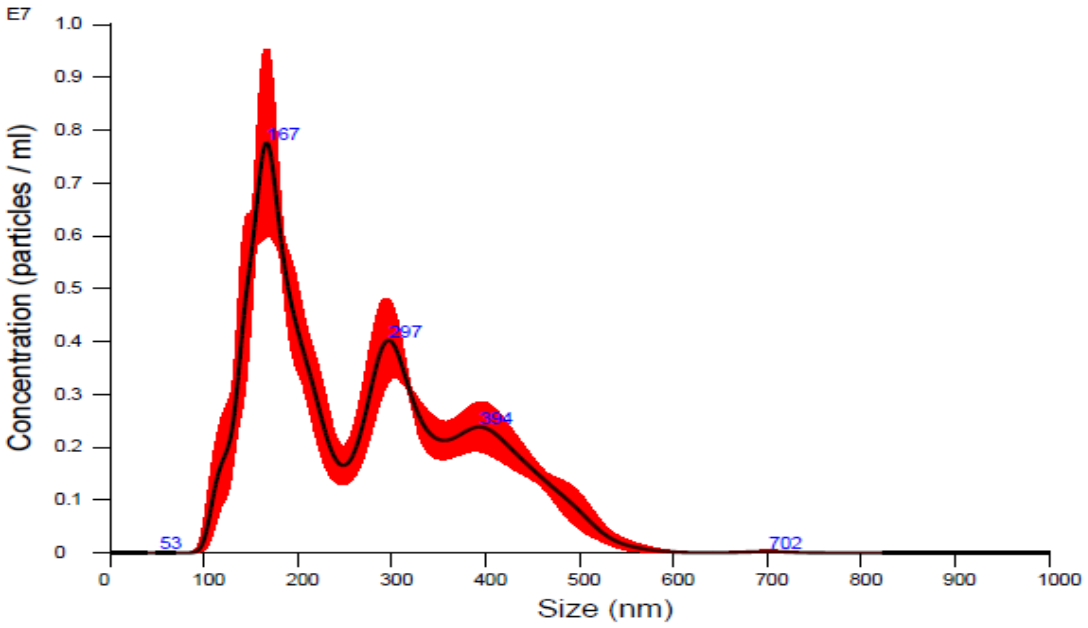

Figura 13. Quantificação das VEs. As leveduras de *S. brasiliensis* foram cultivadas em caldo BHI por 6 dias, o sobrenadante foi centrifugado e analisado pelo equipamento de NTA. A linha preta no centro do gráfico indica o valor médio de VEs enquanto a faixa vermelha se refere ao erro padrão da medição. Obtivemos 1.15 x 10^9 células/mL com tamanho de 110 a 435 nm.

A concentração registrada de VEs foi 1.15 x 10^9 partículas/mL com o tamanho das partículas variando entre 110 nm e 435 nm, resultando em um média dos diversos valores obtidos de 271 nm. As VEs obtidas pelo método de ultracentrifugação e quantificadas no *NanoSight*® mostraram uma concentração de vesículas/mL similares aos dados de extrações anteriores realizadas pelo nosso grupo de pesquisa, porém, o tamanho médio das VEs de *Sporothrix* encontradas variava entre 50 e 150 nm (IKEDA et al., 2018). Isso pode ocorrer pois o método de isolamento de VEs por ultracentrifugação não separa microvesículas de exossomos com eficiência. Exossomos possuem de 30 – 150 nm enquanto microvesículas exibem tamanhos de 100 – 1000 nm (COLOMBO; RAPOSO; THÉRY, 2014) e, por este motivo, o peso de cada vesícula acaba sendo próximo uma da outra. Quando submetemos uma amostra contendo os dois tipos de

vesícula, ambas sofrerão praticamente a mesma força G, se agregando juntas no *pellet*. Assim, é bem provável que nestas centrifugações tenham sido coletado um *pool* de exossomos e microvesículas.

5.4 Plasmídeo e Clonagem

Os quatro plasmídeos *anti-sense* (HOG1_AS1, HOG1_AS2, HOG1_AS3 e HOG1_AS4) foram criados utilizando o plasmídeo pLUO como novo vetor (NORA *et al.*, 2019). Os fragmentos de aproximadamente 200pb estão flanqueados pelos sítios de restrição para as enzimas Xmal (CCC GGG) e Xhol (CTC GAG), presentes uma única vez em todo o plasmídeo, evitando a inserção indesejada da nossa sequência em mais de um local. Os quatro plasmídeos *anti-sense* (pLUO-Agro - SbHOG1_AS1, SbHOG1_AS2, SbHOG1_AS3 e SbHOG1_AS4) foram criados utilizando o plasmídeo pLUO como vetor binário e foram analisados por sequenciamento pela mesma empresa. Em sequência, realizamos a transformação dos plasmídeos carreando o inserto em bactérias *E. coli* DH5α conforme o item 4.7. Após a transformação, as culturas foram plaqueadas em meio LB com Canamicina (30 µg/mL) para seleção das bactérias transformadas. Para todos os insertos houve crescimento indicando a inserção do plasmídeo na bactéria com sucesso (Figura 14).

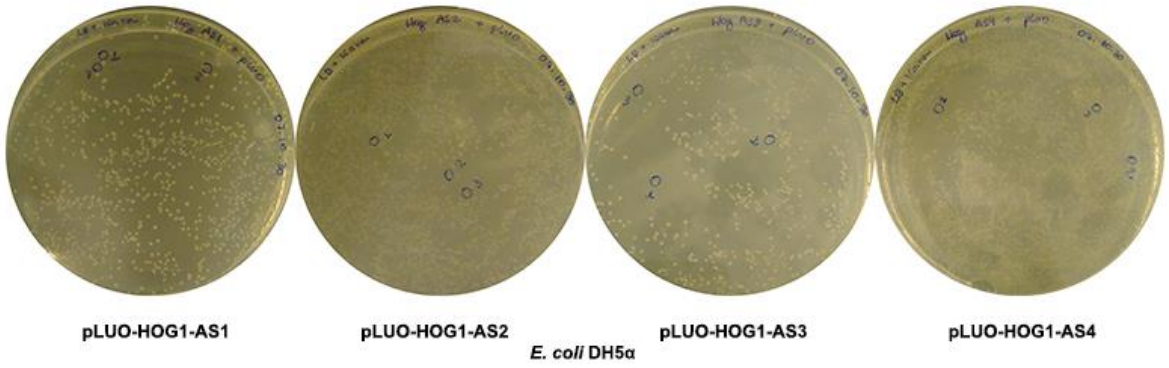

Figura 14. Cultivo de *E. coli* DH5α em placas de ágar LB suplementado com Canamicina (30 µg/mL). Bactérias que cresceram incorporaram o plasmídeo contendo o gene de resistência à Canamicina, indicando o sucesso do processo de transformação e inserção do plasmídeo. Numerais indicam as colônias a serem utilizadas na mini preparação plasmidial.

Duas culturas de cada placa foram escolhidas para realização do protocolo de mini preparação plasmidial (Item 4.8).

A partir destes plasmídeos, utilizando os *primers* e as condições citadas anteriormente (Item 4.11, Tabela 2), foi realizada uma reação de PCR para confirmação da presença do fragmento nas bactérias selecionadas e os amplicons foram corridos em gel de agarose 2% com brometo de etídio (Figura 15). Da esquerda para a direita, as *ladders* de 1kB e 100pb, onde vemos as bandas correspondentes ao tamanho do fragmento. No gel vemos que para as diferentes amostras houve amplificação dos AS1, AS2, AS3 e AS4 que possuem de 210 a 220pb. Os experimentos seguiram com as amostras vindas das colônias número 1 de HOG-AS1, AS2, AS3 e AS4. Uma vez confirmada a presença dos insertos nos plasmídeos e tendo o material amplificado, o próximo passo foi inserir os plasmídeos das colônias nº1 de AS1, AS2, AS3 e AS4 em *A. tumefaciens* através do procedimento de eletroporação, conforme descrito no item 4.9.2.

O crescimento positivo após a seleção em meio contendo antibiótico pode ser observado na Figura 16 e indica o sucesso na inserção do plasmídeo contendo o gene de resistência à canamicina. As células não eletroporadas não têm a capacidade de crescer em meio com canamicina haja vista a falta de genes de resistência.

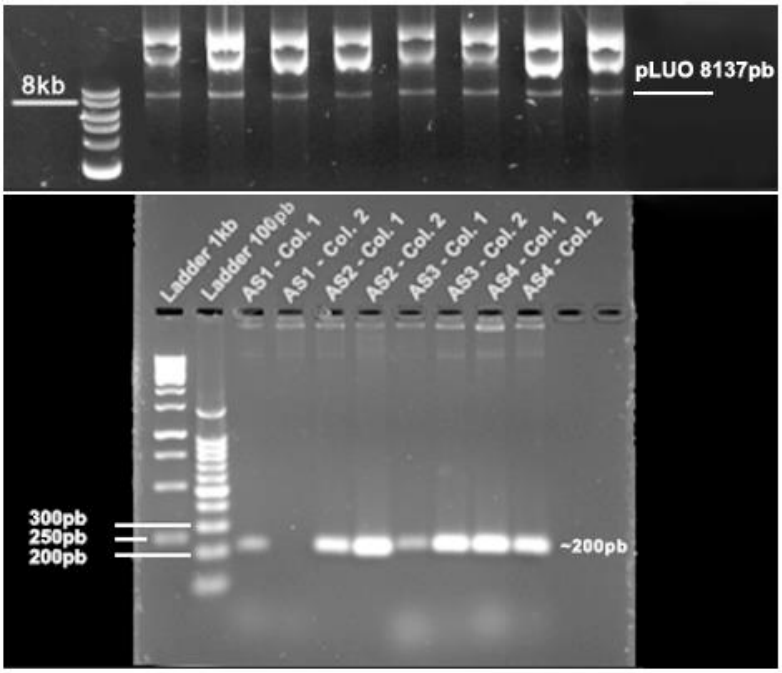

Figura 15. Confirmação da transformação revelado em gel de eletroforese 2% + EtBr contendo os amplicons dos insertos pLUO-HOG1-AS1, AS2, AS3 e AS4. Os insertos têm de 210 a 220pb, confirmando sua presença tanto no plasmídeo pLUO como na bactéria. As colônias Nº 1 foram selecionadas para utilização nos experimentos.

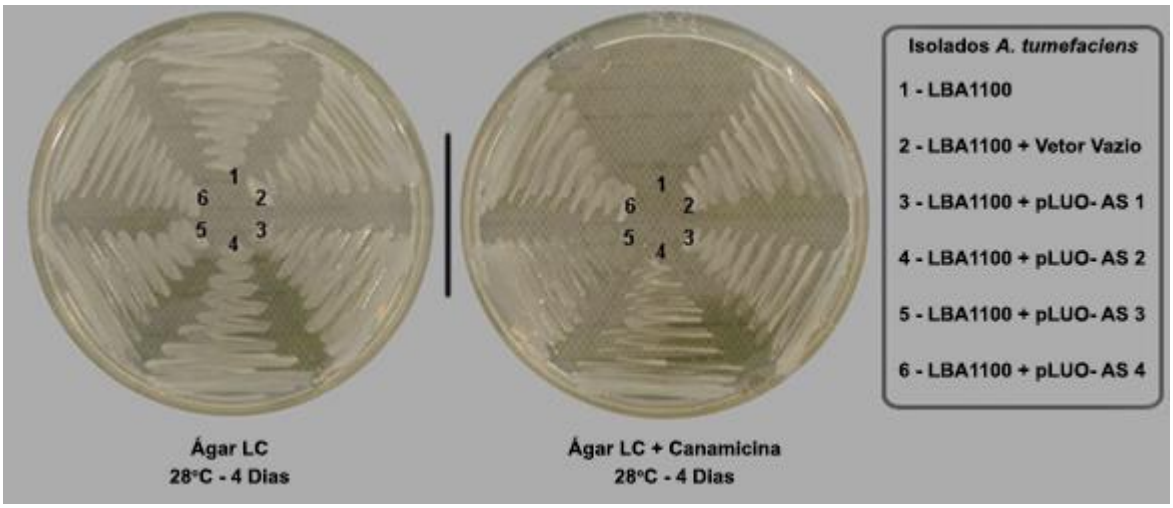

Figura 16. Culturas de *A. tumefaciens* carreando os AS 1-4 e o vetor vazio (pLUO-*GFP*) mostraram crescimento em meio LC + canamicina (100 µg/mL), indicando sucesso na eletroporação e inserção efetiva do plasmídeo na célula.

5.5 Padronização do co-cultivo de *A. tumefaciens* e *S. brasiliensis*

Tendo em vista a complexidade do processo como um todo, é altamente recomendado pelas publicações que seja realizada uma padronização antes de se iniciar os experimentos. Portanto, foram executados uma série de experimentos para avaliar as quantidades mínimas de antibióticos necessários para seleção tanto da bactéria quanto do fungo, temperaturas de crescimento, tempos de incubação, proporção de células bacterianas e fúngicas na suspensão celular para plaqueamento na membrana de co-cultivo e o efeito da presença e ausência de acetoceringona durante a transformação. A padronização teve início com o isolado *S. brasiliensis* M1168. A transformação também foi testada utilizando-se conídios, porém, devido ao baixíssimo número de transformantes e ausência de crescimento em diversas placas, descartamos esta possibilidade e optamos por trabalhar com a forma leveduriforme do fungo.

5.5.1 Resistência do *Sporothrix brasiliensis* M1168 WT à higromicina

A higromicina B é um antibiótico da classe dos aminoglicosídeos, produzido pelo fungo *Streptomyces hygroscopicus,* cujo mecanismo de ação é atuar no ribossomo afetando diversos passos do ciclo de tradução do RNA mensageiro e impedindo a translocação deste mRNA e do RNA transportador, tanto em bactérias quanto em eucariotos (BOROVINSKAYA *et al.*, 2008). Neste estudo foram testadas as concentrações mínimas para inibir o crescimento do *S. brasiliensis*: 50 µg/mL, 70 µg/mL, 100 µg/mL e 150 µg/mL. As placas foram crescidas à 37ºC por 7 dias em meio BHI suplementado com higromicina B.

Figura 17. Teste de resistência à higromicina B. Foram testadas quatro concentrações do antibiótico higromicina B para determinar a concentração mínima para inibição do crescimento de leveduras de *Sporothrix brasiliensis* isolado M1168 w*ild-type* em uma concentração de 1 x 10^7 células/mL em meio BHI por 7 dias a 37ºC. Nos três testes realizados, a concentração mínima de antibiótico foi 100 µg/mL.

Encontramos que a concentração mínima necessária para inibir o crescimento das leveduras de *S. brasiliensis* foi de 100 µg/mL (Figura 17).

Durante os experimentos, ao plaquear as células em meio com higromicina, foi possível notar que as colônias isoladas de *S. brasiliensis* M1168 cresciam com dificuldade, fato que não ocorria quando havia muitas células próximas umas das outras, indicando uma possível cooperação entre estas células quando há um grande número de colônias agregadas. Estas células isoladas mostraram dificuldade de realizar a transição de hifa para levedura, muitas vezes crescendo na forma micelial mesmo sendo incubadas a 37ºC. Somente em regiões com grande quantidade de células era possível observar a morfologia da colônia representando a levedura, com coloração branca e aspecto cremoso e brilhante.

5.5.2 Co-cultivo com Acetoceringona (ASg)

A Acetoceringona é um composto fenólico natural encontrado em plantas e está presente, geralmente, em locais onde houve ferimento e rompimento do tecido vegetal. É provável que esta molécula haja como sinalizador, atraindo o *Agrobacterium* para o local da lesão, facilitando sua entrada no tecido e início da indução do tumor (CLARK; PAZDERNIK; MCGEHEE, 2019).

Foram feitas placas de co-cultivo contendo meio de indução com 100 µg/mL de canamicina e, com ou sem ASg. Após o crescimento da suspensão de *Agrobacterium* e *S. brasiliensis* em meio de indução, não houve surgimento de colônias enegrecidas (Figura 18), características do processo de transformação mediada por *A. tumefaciens* (ATMT), independente do tempo de cultivo ou temperatura de incubação. Tendo em vista que a ASg é descrita como fator de ativação da transcrição dos genes de virulência presentes no plasmídeo de indução de tumor, que por sua vez são os componentes da maquinaria de transferência de T-DNA, é possível supor que este enegrecimento poderia estar ligado à efetividade da transformação. Michielse e colaboradores relatam que a ausência de ASg leva à redução do número de transformantes obtidos, tendo em vista o panorama da ativação dos genes *Vir* citados anteriormente por esta substância (MICHIELSE *et al.*, 2005).

É de fato possível observar que houve crescimento de microrganismos na placa desprovida de ASg, porém, após as membranas serem transferidas e as células se recuperarem crescendo em meio BHI líquido, não há crescimento visível de colônias no período de 20 dias nas placas para seleção dos transformantes contendo higromicina. Sendo assim, ao menos para o isolado *Sporothrix brasiliensis* M1168, a presença de ASg durante a transformação foi essencial para a transferência eficiente do T-DNA contendo o gene de resistência à higromicina B e decorrente isolamento dos transformantes.

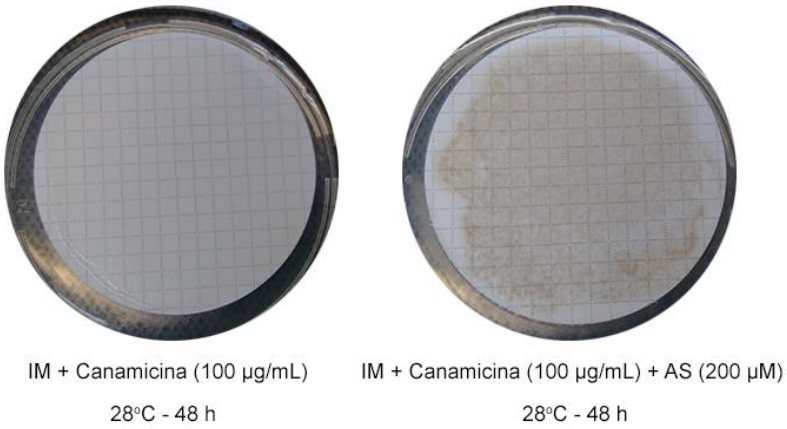

Figura 18. Efeito da adição de ASg. Crescimento da suspensão de *Agrobacterium* e *S. brasiliensis* em meio de indução com ou sem adição de ASg.

5.5.3 Padronização de temperatura e tempos de incubação

O processo de transformação é, como já foi dito, de grande complexidade e envolve uma multitude de etapas, moléculas e genes. Ao se tentar replicar em laboratório um evento de tal magnitude que ocorre naturalmente no meio ambiente, temos que levar em conta todas as variáveis ambientais (temperatura, umidade, luz) que atuam ou poderiam estar atuando na modulação do processo. A temperatura, e sua estabilidade, é um fator de grande importância para o sucesso da ATMT realizada em laboratório, assim como o período de tempo no qual a suspensão celular permanece na membrana de co-cultivo. O contato entre as células é essencial para o sucesso do transporte do T-DNA de um organismo ao outro.

Por estas razões decidimos executar a padronização do sistema de transformação media por *Agrobaterium tumefaciens* para *Sporothrix brasiliensis* (*Sb*ATMT) com 6 condições de crescimento, envolvendo o tempo de co-cultivo e a temperatura de incubação das placas, além de diferentes proporções de levedura e bactéria na suspensão para plaqueamento. Na literatura geralmente se encontram padronizações de temperatura entre 22ºC e 28ºC e de tempo entre 16h

e 48h, sendo a maior parte deles realizadas com conídios (MENINO; ALMEIDA; RODRIGUES, 2012; MICHIELSE *et al.*, 2008; MULLINS *et al.*, 2001; SUGUI; CHANG; KWON-CHUNG, 2005). Alguns destes trabalhos também mencionam a utilização de diferentes concentrações da suspensão de células, variando a proporção Bactérias:Leveduras em 1:1, 1:10 e 10:1. Após a padronização, os dados foram plotados e gerado o gráfico da Figura 19. Podemos notar que em temperaturas mais baixas (25ºC) houve ausência total de crescimento para as proporções de 1:10 e 10:1 de bactérias:leveduras independente do tempo de co-cultivo, seja pela baixa concentração de bactérias para realizar a transformação no primeiro caso ou leveduras insuficientes para apresentar crescimento em meio seletivo no segundo caso. Quando elevamos a 28ºC o aumento no crescimento de colônias em meio seletivo é maior para todas as condições estudadas, com destaque para a condição de 1:1, 28ºC – 72h, da qual obtivemos o maior número de transformantes positivos.

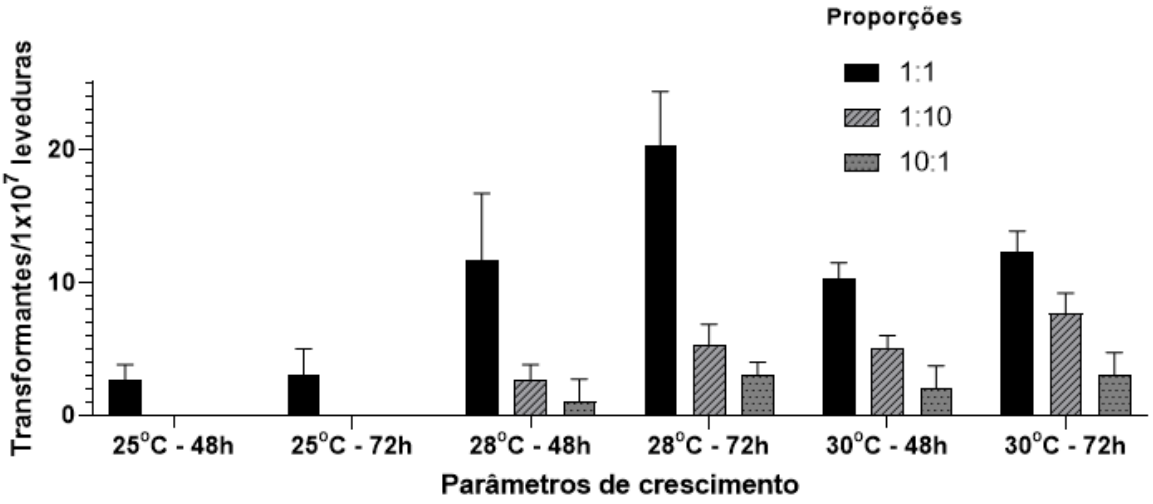

Figura 19. Gráfico da padronização do sistema *Sb*ATMT. Neste teste foram analisadas diferentes temperaturas de incubação (25ºC, 28ºC e 30ºC), tempo de crescimento (48h e 72h) bem como as proporções da suspensão de microrganismos (1:1, 1:10 e 10:10; Bactérias:Leveduras). A condição de 28ºC, 72h com suspensão celular 1:1 rendeu o maior número de transformantes a cada $1x10^7$ leveduras em suspensão. Análise feita por *Two-way* ANOVA com múltiplas comparações pelo teste de *Tukey* e valor de significância de $p < 0.05$.

5.6 Estabilidade mitótica

Após realizar a padronização e estabelecer as melhores condições para a transformação do *Sporothrix brasiliensis*, foi feita uma última transformação para a obtenção dos transformantes contendo as quatro sequências de interesse (Figura 20ª). Após a eletroporação dos quatro plasmídeos, foram feitas 4 transformações em paralelo, uma para cada inserto contendo 3 placas para cada. Ao todo foram obtidas 214 colônias de *S. brasiliensis* transformadas carreando os insertos *anti-sense* (Figura 20B). Foram 46 isolados carreando o inserto 1, 59 carreando o inserto 2, 37 carreando o inserto 3, 43 carreando o inserto 4 e 29 carreando o vetor vazio. Todas as 214 colônias foram repicadas em novas placas com meio BHI + higromicina com auxílio de palitos de dente estéreis autoclavados a 121ºC por 20 minutos. Após os repiques, nos encontramos com um total de 39 isolados que mantiveram suas cópias do T-DNA inseridas no genoma após 5 repiques (Figura 20C), alcançando aproximadamente 18% de estabilidade nos transformantes após os repiques.

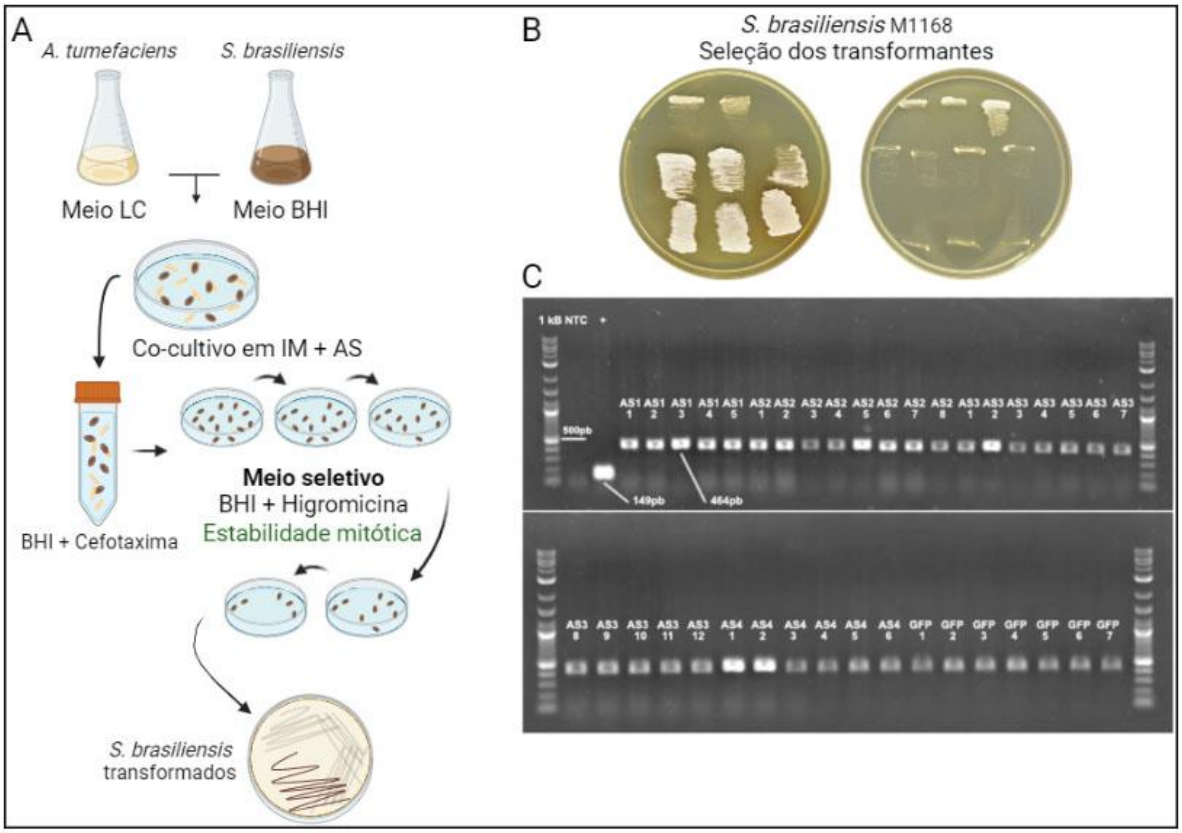

Figura 20. A) Esquema representando o processo de transformação. **B)** Placas de petri com meio BHI + Higromicina para seleção e avaliação da estabilidade mitótica dos isolados advindos do co-cultivo. **C)** Das 214 colônias isoladas, 39 transformantes continuaram com crescimento em meio seletivo com higromicina após 7 passagens para novas placas. Bandas de 464 pares de base indicam a amplificação do fragmento do gene da higromicina B fosfotransferase. Banda de 149 pb, controle positivo. NTC, *No template control*. *Ladder* 1kb Plus (New England Biolabs) em ambas as extremidades.

5.7 Ensaio de estresse com transformantes

Como método preliminar de investigar a possível presença de transformantes que de fato possuem expressão reduzida da proteína HOG1, foi realizado um ensaio de estresse celular utilizando como controle de crescimento o isolado *S. brasiliensis* M1168 *wild-type* e os isolados mutantes que passaram pelo processo de transformação e estabilidade mitótica. Foram escolhidos 3 isolados, com crescimento visualmente diferenciado dos demais, para executar esta confirmação preliminar: *Sb.* ΔHOG1-AS2, *Sb.* ΔHOG1-AS3, *Sb.* ΔHOG1-AS4.

Após o plaqueamento de $1x10^7$ células em diluições seriadas de 1:5 e crescimento por 7 dias em estufa microbiológica a 37ºC, foram capturadas as imagens que compõem a figura 21. De forma geral, houve mudança nos perfis de resistência observados para os isolados ΔHOG1-AS2 e ΔHOG1-AS4. Tratando de cada agente estressante separadamente, no topo da figura, observamos que em meio com o reagente Congo Red na concentração de 2.5 µM não houve mudança perceptível no crescimento de nenhum dos isolados, podendo ser interessante a repetição do teste utilizando 4 µM ou 5 µM para melhor observação. Também não houve diferença significativa de crescimento entre os meios contendo $NaNO_2$. Em relação ao calcofluor white, o isolado ΔHOG1-AS2 demonstrou certa tolerância ao calcofluor em comparação ao controle e aos demais isolados. Relativo ao cloreto de sódio, um dos principais indutores da atividade da HOG1, houve significativa redução no crescimento apenas para o isolado ΔHOG1-AS4 em meio com 300 mM de NaCl.

O papel da via da HOG para o gênero *Sporothrix* ainda não é completamente elucidado, de forma que certos passos da via e a forma exata que o sinal é transmitido ao núcleo ainda são desconhecidos. O único estudo disponível na literatura acerca da HOG1 de *S. brasiliensis* investigou o papel da proteína ativadora AP-1, porém, referente somente ao estresse oxidativo induzido por H_2O_2 entre diferentes cepas de *S. schenckii* e *S. brasiliensis* selvagens (ORTEGA *et al.*, 2015). Já relativo à resistência ao calcofluor, em alguns estudos é observado que quando a expressão da HOG1 é reduzida, há o aumento da resistência ao CFW (ALONSO-MONGE, R. *et al.*, 1999; ARANA *et al.*, [S.d.]; CHEETHAM *et al.*, 2007; DAY *et al.*, 2018). Ao passo que outros observam diminuição dessa resistência ou sugerem a não relação da resistência ao calco flúor com a via da HOG (GARCÍA-RODRIGUEZ; DURÁN; RONCERO, 2000).

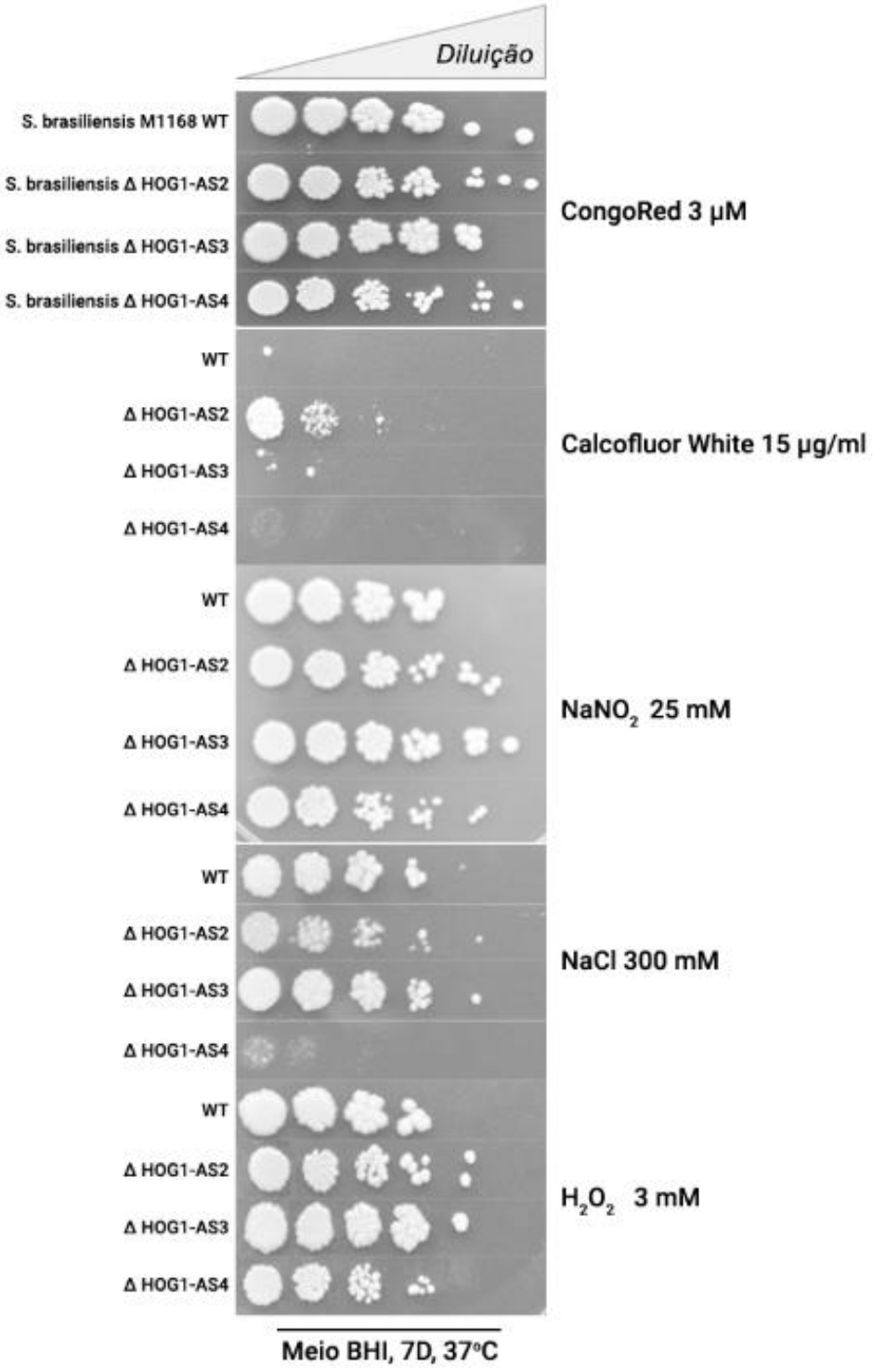

Figura 21. Ensaio de estresse celular. Teste de *spot* com o isolado M1168 WT (controle) e 3 mutantes de HOG1 escolhidos para o teste, *Sb.* ΔHOG1-AS2, *Sb.* ΔHOG1-AS3, *Sb.* ΔHOG1-AS4. Leveduras foram incubadas em meio BHI com concentrações de diferentes agentes estressantes, como: Congo Red, calcofluor white, nitrito de sódio ($NaNO_2$), cloreto de sódio (NaCl) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 37ºC por 7 dias.

6. Conclusões

- Estabelecemos, com sucesso, e de forma inédita, a Transformação Mediada por *Agrobacterium tumefaciens* para o fungo patogênico causador da esporotricose, *S. brasiliensis* (*Sb*ATMT), ampliando o leque de possibilidades ao se manipular o genoma de *S. brasiliensis* para uma diversidade de genes utilizando a técnica de RNA de interferência com o objetivo de reduzir a expressão de proteínas alvo.

- Após padronização, em nova transformação foram obtidos 214 transformantes dos quais 39 mantiveram as cópias do T-DNA em seu genoma, atingindo uma taxa de eficiência de transformação em torno de 18% e tendo um aumento em torno de 10% em comparação aos resultados presentes na literatura para a transformação em outras espécies de fungos;

- Em análise preliminar sobre a eficiência do *knockdown* de HOG1, encontramos dois isolados com diferença significativa nos perfis de resistência a NaCl e CFW.

7. Referências Bibliográficas

ABDALLA, Michel Reis *et al.* Disseminated Sporothrix brasiliensis Infection with Endocardial and Ocular Involvement in an HIV-Infected Patient. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 86, n. 3, p. 477–480, 1 mar. 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22403321>. Acesso em: 22 abr. 2019.

ALONSO-MONGE, R. *et al.* Role of the mitogen-activated protein kinase hog1p in morphogenesis and virulence of candida albicans. *Journal of Bacteriology*, v. 181, n. 10, p. 3058–3068, 1999. Disponível em: </pmc/articles/PMC93760/?report=abstract>. Acesso em: 21 dez. 2020.

ALONSO-MONGE, Rebeca *et al.* The Hog1 mitogen-activated protein kinase is essential in the oxidative stress response and chlamydospore formation in Candida albicans. *Eukaryotic Cell*, v. 2, n. 2, p. 351–361, abr. 2003. Disponível em: </pmc/articles/PMC154845/?report=abstract>. Acesso em: 30 dez. 2020.

ARANA, David M *et al.* The Pbs2 MAP kinase kinase is essential for the oxidative-stress response in the fungal pathogen Candida albicans. [S.d.]. Disponível em: <http://mic.sgmjournals.org>. Acesso em: 4 jan. 2022.

ARRILLAGA-MONCRIEFF, I. *et al.* Different virulence levels of the species of Sporothrix in a murine model. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 15, n. 7, p. 651–655, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19624508/>. Acesso em: 31 ago. 2020.

AUNG, Ar Kar *et al.* Pulmonary sporotrichosis: case series and systematic analysis of literature on clinico-radiological patterns and management outcomes. *Medical mycology*, v. 51, n. 5, p. 534–544, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23286352/>. Acesso em: 14 dez. 2021.

Bacterial Transformation Workflow–4 Main Steps | Thermo Fisher Scientific - BR. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/molecular-cloning/transformation/bacterial-transformation-workflow.html>. Acesso em: 22 nov. 2021.

BAHN, Yong-Sun; JUNG, Kwang-Woo. Stress signaling pathways for the

pathogenicity of Cryptococcus. *Eukaryotic cell*, v. 12, n. 12, p. 1564–77, dez. 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24078305>. Acesso em: 12 jun. 2019.

BARRETO-BERGTER, Eliana; FIGUEIREDO, Rodrigo T. *Fungal glycans and the innate immune recognition*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. [S.l.]: Frontiers Media S.A. Disponível em: <www.frontiersin.org>. Acesso em: 31 ago. 2020. , 14 out. 2014

BARROS, M. B. d. L.; DE ALMEIDA PAES, R.; SCHUBACH, A. O. Sporothrix schenckii and Sporotrichosis. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 24, n. 4, p. 633–654, 1 out. 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21976602>. Acesso em: 22 abr. 2019.

BARROS, Monica Bastos de Lima *et al.* Sporotrichosis: development and challenges of an epidemic. *Pan American journal of public health*, v. 27, n. 6, p. 455–60, jun. 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20721446>. Acesso em: 31 ago. 2020.

BARROS, Mônica Bastos de Lima *et al.* Sporotrichosis: an emergent zoonosis in Rio de Janeiro. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 96, n. 6, p. 777–779, ago. 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762001000600006&lng=en&tlng=en>. Acesso em: 22 abr. 2019.

BARTEL, David P. Review MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function ulation of hematopoietic lineage differentiation in mam-mals (Chen et al., 2004), and control of leaf and flower development in plants (Aukerman and Sakai, 2003. *Cell*, v. 116, p. 281–297, 2004.

BAZZAN, Erica *et al.* Critical Review of the Evolution of Extracellular Vesicles' Knowledge: From 1946 to Today. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms22126417>. Acesso em: 5 dez. 2021.

BLISS, Carly M. *et al.* Targeting Antigen to the Surface of EVs Improves the In Vivo Immunogenicity of Human and Non-human Adenoviral Vaccines in Mice. *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development*, v. 16, p. 108–125, 13 mar. 2020.

BOECHAT, Jéssica Sepulveda *et al.* Feline sporotrichosis: Associations between

clinical-epidemiological profiles and phenotypic-genotypic characteristics of the etiological agents in the Rio de Janeiro epizootic area. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 113, n. 3, p. 185–196, 1 mar. 2018. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762018000300185&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 31 ago. 2020.

BOROVINSKAYA, Maria A. *et al.* Structural basis for hygromycin B inhibition of protein biosynthesis. *RNA*, v. 14, n. 8, p. 1590, ago. 2008. Disponível em: </pmc/articles/PMC2491480/>. Acesso em: 22 dez. 2021.

BOZZA, Silvia *et al.* Dendritic cells transport conidia and hyphae of Aspergillus fumigatus from the airways to the draining lymph nodes and initiate disparate Th responses to the fungus. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 168, n. 3, p. 1362–71, 1 fev. 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11801677>. Acesso em: 2 abr. 2019.

BROWN, Lisa *et al.* Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nature reviews. Microbiology*, v. 13, n. 10, p. 620–30, out. 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26324094>. Acesso em: 2 abr. 2019.

BRUDER NASCIMENTO, Ariane Cristina Mendes de Oliveira *et al.* Mitogen activated protein kinases SakA HOG1 and MpkC collaborate for Aspergillus fumigatus virulence. *Molecular Microbiology*, v. 100, n. 5, p. 841–859, 1 jun. 2016. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/mmi.13354>. Acesso em: 12 jun. 2019.

BUNDOCK, P *et al.* Trans-kingdom T-DNA transfer from Agrobacterium tumefaciens to Saccharomyces cerevisiae. *The EMBO journal*, v. 14, n. 13, p. 3206–14, 3 jul. 1995. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7621833>. Acesso em: 22 abr. 2019.

CHAKRABARTI, A. *et al.* Global epidemiology of sporotrichosis. *Medical Mycology*, v. 53, n. 1, p. 3–14, 1 jan. 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25526781>. Acesso em: 2 abr. 2019.

CHEETHAM, Jill *et al.* A Single MAPKKK Regulates the Hog1 MAPK Pathway in the Pathogenic Fungus Candida albicans □ D. *Molecular Biology of the Cell*, v. 18, p. 4603–4614, 2007. Disponível em:

<http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E07-06>. Acesso em: 4 jan. 2022.
CHEETHAM, Jill *et al.* MAPKKK-independent Regulation of the Hog1 Stress-activated Protein Kinase in *Candida albicans*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 286, n. 49, p. 42002–42016, 9 dez. 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21994942>. Acesso em: 12 jun. 2019.
CHOI, Seng Jin *et al.* Active Immunization with Extracellular Vesicles Derived from Staphylococcus aureus Effectively Protects against Staphylococcal Lung Infections, Mainly via Th1 Cell-Mediated Immunity. *PLOS ONE*, v. 10, n. 9, p. e0136021, 2 set. 2015. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0136021>. Acesso em: 2 jul. 2020.
CLARK, David P.; PAZDERNIK, Nanette J.; MCGEHEE, Michelle R. Plasmids. *Molecular Biology*, p. 712–748, 1 jan. 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128132883000239>. Acesso em: 22 dez. 2021.
COLOMBO, Marina; RAPOSO, Graça; THÉRY, Clotilde. *Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles*. *Annual review of cell and developmental biology*. [S.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326>. Acesso em: 21 dez. 2020. , 11 out. 2014
CORDEIRO, Fernanda Nóbrega *et al.* Ocorrência familiar de esporotricose zoonótica. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 86, n. 4 suppl 1, p. 121–124, ago. 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962011000700032&lng=pt&tlng=pt>. Acesso em: 22 abr. 2019.
COSTANTINO, P *et al.* Tumor formation and rhizogenicity ofAgrobacterium rbizogenes carrying Ti plasmids (Transconjugants; incRh-1 incompatibility; octopine; aberrant tumors and roots). *Gene*, v. 11, p. 79, 1980.
CRUZ, Lilian *et al.* Extracellular Vesicles: Decoding a New Language for Cellular Communication in Early Embryonic Development. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 6, p. 94, 28 ago. 2018. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2018.00094/full>. Acesso em: 2 abr. 2019.

CURI, André L L *et al.* Retinal granuloma caused by Sporothrix schenckii. *American journal of ophthalmology*, v. 136, n. 1, p. 205–7, jul. 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12834701>. Acesso em: 22 abr. 2019.
D'OSTIANI, C F *et al.* Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus Candida albicans. Implications for initiation of T helper cell immunity in vitro and in vivo. *The Journal of experimental medicine*, v. 191, n. 10, p. 1661–74, 15 maio 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10811860>. Acesso em: 2 abr. 2019.
DA SILVA, Margarete Bernardo Tavares *et al.* Esporotricose urbana: Epidemia negligenciada no Rio de Janeiro, Brasil. *Cadernos de Saude Publica*, v. 28, n. 10, p. 1867–1880, 2012. Disponível em: <http://www.ibge.>. Acesso em: 19 dez. 2020.
DAY, Alison M *et al.* Hog1 Regulates Stress Tolerance and Virulence in the Emerging Fungal Pathogen Candida auris. *mSphere*, v. 3, n. 5, 2018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30355673>. Acesso em: 11 jun. 2019.
DE LIMA BARROS, Mônica Bastos; DE ALMEIDA PAES, Rodrigo; SCHUBACH, Armando Oliveira. *Sporothrix schenckii and sporotrichosis*. *Clinical Microbiology Reviews*. [S.l.]: American Society for Microbiology (ASM). Disponível em: </pmc/articles/PMC3194828/?report=abstract>. Acesso em: 31 ago. 2020. , out. 2011
DIXON, D M *et al.* Isolation and characterization of Sporothrix schenckii from clinical and environmental sources associated with the largest U.S. epidemic of sporotrichosis. *Journal of clinical microbiology*, v. 29, n. 6, p. 1106–13, jun. 1991. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1864926>. Acesso em: 22 abr. 2019.
DONADEL, KÁTHIA *et al.* Esporotricose: revisão. *An Bras Dermatol*, v. 68, 1993. Disponível em: <http://www.anaisdedermatologia.org.br//detalhe-artigo/1041>.
DUCH, Alba *et al.* Coordinated control of replication and transcription by a SAPK protects genomic integrity. *Nature*, v. 493, n. 7430, p. 116–121, 3 jan. 2013. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nature11675>. Acesso em: 30 dez. 2020.
DULK-RAS, Amke Den; HOOYKAAS, Paul J. J. Electroporation of Agrobacterium tumefaciens. *Plant Cell Electroporation And Electrofusion Protocols*. New Jersey:

Humana Press, 1995. v. 55. p. 63–72. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8528423>. Acesso em: 22 abr. 2019.
DUNKELBERGER, Jason R.; SONG, Wen Chao. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Research*, v. 20, n. 1, p. 34–50, 15 jan. 2010. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/cr2009139>. Acesso em: 28 dez. 2020.
ENE, Iuliana V. *et al.* Cell wall remodeling enzymes modulate fungal cell wall elasticity and osmotic stress resistance. *mBio*, v. 6, n. 4, 28 jul. 2015. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/mBio.00986-15>. Acesso em: 14 dez. 2021.
ENJALBERT, Brice *et al.* Role of the Hog1 stress-activated protein kinase in the global transcriptional response to stress in the fungal pathogen Candida albicans. *Molecular Biology of the Cell*, v. 17, n. 2, p. 1018–1032, fev. 2006. Disponível em: </pmc/articles/PMC1356608/?report=abstract>. Acesso em: 30 dez. 2020.
FALCÃO, Eduardo Mastrangelo Marinho *et al.* Hospitalizações e óbitos relacionados à esporotricose no Brasil (1992-2015). *Cadernos de saude publica*, v. 35, n. 4, p. e00109218, 2 maio 2019. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2019000406002&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 20 dez. 2020.
FANG, Lei *et al.* TLR2 mediates phagocytosis and autophagy through JNK signaling pathway in Staphylococcus aureus-stimulated RAW264.7 cells. *Cellular Signalling*, v. 26, n. 4, p. 806–814, abr. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24412754/>. Acesso em: 28 dez. 2020.
FREE, Stephen J. Fungal Cell Wall Organization and Biosynthesis. *Advances in Genetics*. [S.l.]: Academic Press Inc., 2013. v. 81. p. 33–82. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124076778000026>. Acesso em: 30 dez. 2020.
FREITAS, Dayvison F. S. *et al.* Sporotrichosis in the Central Nervous System Caused by Sporothrix brasiliensis. *Clinical Infectious Diseases*, v. 61, n. 4, p. 663–664, 15 ago. 2015. Disponível em: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1093/cid/civ361>. Acesso em: 22 abr. 2019.
GARCÍA-LOZANO, Alberto *et al.* Sporothrix schenckii Immunization, but Not

Infection, Induces Protective Th17 Responses Mediated by Circulating Memory CD4+ T Cells. *Frontiers in microbiology*, v. 9, p. 1275, 2018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29946313>. Acesso em: 22 abr. 2019.
GARCÍA-RODRIGUEZ, L. J.; DURÁN, A.; RONCERO, C. Calcofluor Antifungal Action Depends on Chitin and a Functional High-Osmolarity Glycerol Response (HOG) Pathway: Evidence for a Physiological Role of the Saccharomyces cerevisiae HOG Pathway under Noninducing Conditions. *Journal of Bacteriology*, v. 182, n. 9, p. 2428, maio 2000. Disponível em: </pmc/articles/PMC111304/>. Acesso em: 4 jan. 2022.
GARCIA-RUBIO, Rocio *et al. The Fungal Cell Wall: Candida, Cryptococcus, and Aspergillus Species*. *Frontiers in Microbiology*. [S.l.]: Frontiers Media S.A. Disponível em: <www.frontiersin.org>. Acesso em: 30 dez. 2020. , 9 jan. 2020
GARCÍA CARNERO, Laura Cristina *et al.* Immunity and Treatment of Sporotrichosis. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, v. 4, n. 3, 20 ago. 2018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30127270>. Acesso em: 2 abr. 2019.
GARFINKEL, DJ *et al.* Genetic analysis of crown gall: fine structure map of the T-DNA by site-directed mutagenesis. *Cell*, v. 27, n. 1 Pt 2, p. 143–153, 1981. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6276020/>. Acesso em: 31 out. 2021.
GELVIN, Stanton B. Agrobacterium-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the “Gene-Jockeying” Tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 67, n. 1, p. 16, mar. 2003. Disponível em: </pmc/articles/PMC150518/>. Acesso em: 31 out. 2021.
GOYAL, Surabhi *et al.* The Interaction of Human Pathogenic Fungi With C-Type Lectin Receptors. *Frontiers in immunology*, v. 9, p. 1261, 2018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29915598>. Acesso em: 2 abr. 2019.
GRASIENE M. SILVA, Julio Cesar F. Howes *et al.* Surto de esporotricose felina na região metropolitana do Recife. *Pesq. Vet. Bras*, v. 38, n. 9, p. 1767–1771, 2018. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/pvb/v38n9/1678-5150-pvb-38-09-1767.pdf>.
GREMIÃO, I. D.F. *et al.* Treatment of refractory feline sporotrichosis with a

combination of intralesional amphotericin B and oral itraconazole. *Australian Veterinary Journal*, v. 89, n. 9, p. 346–351, set. 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21864307/>. Acesso em: 19 dez. 2020.
GRIFFIN, Gabriel K. *et al.* IL-17 and TNF-α Sustain Neutrophil Recruitment during Inflammation through Synergistic Effects on Endothelial Activation. *The Journal of Immunology*, v. 188, n. 12, p. 6287–6299, 15 jun. 2012. Disponível em: </pmc/articles/PMC3370121/?report=abstract>. Acesso em: 28 dez. 2020.
GUERMONPREZ, Pierre *et al.* Antigen presentation and T cells stimulation by dendritic cells. *Annual Review of Immunology*, v. 20, n. 1, p. 621–667, abr. 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11861614>. Acesso em: 2 abr. 2019.
GURUNATHAN, Sangiliyandi; KANG, Min Hee; KIM, Jin Hoi. A Comprehensive Review on Factors Influences Biogenesis, Functions, Therapeutic and Clinical Implications of Exosomes. *International Journal of Nanomedicine*, v. 16, p. 1281, 2021. Disponível em: </pmc/articles/PMC7898217/>. Acesso em: 5 dez. 2021.
HABTE-GABR, E.; WALSH, W. Cutaneous sporotrichosis: the old iodide treatment remains effective. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 6, n. 1, p. 53–55, 1 jan. 2000. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X14636387>. Acesso em: 20 dez. 2020.
HEKTOEN, Ludvig; PERKINS, C. F. REFRACTORY SUBCUTANEOUS ABSCESSES CAUSED BY SPOROTHRIX SCHENCKII. A NEW PATHOGENIC FUNGUS. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 5, n. 1, p. 77, 1900. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2117997/>. Acesso em: 22 abr. 2019.
HERNANDEZ-LOPEZ, María José; RANDEZ-GIL, Francisca; PRIETO, José Antonio. Hog1 mitogen-activated protein kinase plays conserved and distinct roles in the osmotolerant yeast Torulaspora delbrueckii. *Eukaryotic Cell*, v. 5, n. 8, p. 1410–1419, ago. 2006. Disponível em: </pmc/articles/PMC1539137/?report=abstract>. Acesso em: 30 dez. 2020.
HILDNER, K *et al.* Tumour necrosis factor (TNF) production by T cell receptor-primed T lymphocytes is a target for low dose methotrexate in rheumatoid arthritis.

Clinical and experimental immunology, v. 118, n. 1, p. 137–46, out. 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10540171>. Acesso em: 22 abr. 2019.

HOEKEMA, A. *et al.* A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the Agrobacterium tumefaciens Ti-plasmid. *Nature 1983 303:5913*, v. 303, n. 5913, p. 179–180, 1983. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/303179a0>. Acesso em: 31 out. 2021.

HOHMANN, Stefan. *Control of high osmolarity signalling in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*. [S.l: s.n.]. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1016/j.febslet.2009.10.069>. Acesso em: 21 dez. 2020. , 17 dez. 2009

IKEDA, Marcelo Augusto Kazuo *et al.* Extracellular Vesicles From Sporothrix brasiliensis Are an Important Virulence Factor That Induce an Increase in Fungal Burden in Experimental Sporotrichosis. *Frontiers in microbiology*, v. 9, p. 2286, 2018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30333803>. Acesso em: 2 abr. 2019.

IWASAKI, Akiko; MEDZHITOV, Ruslan. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature Immunology*, v. 5, n. 10, p. 987–995, 28 out. 2004. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/ni1112>. Acesso em: 2 abr. 2019.

JOSÉ, C San *et al. The Mitogen-Activated Protein Kinase Homolog HOG1 Gene Controls Glycerol Accumulation in the Pathogenic Fungus Candida albicans*. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*. [S.l: s.n.], 1996.

KOMATH, Sneha Sudha *et al.* Generating anchors only to lose them: The unusual story of glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis and remodeling in yeast and fungi. *IUBMB Life*, v. 70, n. 5, p. 355–383, 20 maio 2018. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/iub.1734>. Acesso em: 30 dez. 2020.

LEE, Rosalind C; FEINBAUM, Rhonda L; AMBROST, Victor. The C. elegans Heterochronic Gene lin-4 Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to &II-14. *Cell*, v. 75, p. 843–854, 1993.

LOPES-BEZERRA, Leila M. *et al.* Cell walls of the dimorphic fungal pathogens Sporothrix schenckii and Sporothrix brasiliensis exhibit bilaminate structures and sloughing of extensive and intact layers. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 12,

n. 3, p. e0006169, 9 mar. 2018. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0006169>. Acesso em: 31 ago. 2020.
LOPES-BEZERRA, Leila M; SCHUBACH, Armando; COSTA, Rosane O. Sporothrix schenckii and sporotrichosis. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, v. 78, n. 2, p. 293–308, jun. 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16710567>. Acesso em: 22 abr. 2019.
LÓPEZ-ROMERO, Everardo *et al.* Sporothrix schenckii complex and sporotrichosis, an emerging health problem. *Future Microbiology*, v. 6, n. 1, p. 85–102, jan. 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21162638>. Acesso em: 22 abr. 2019.
LORENZ, Todd C. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, v. 63, n. 63, p. 3998, 22 maio 2012. Disponível em: </pmc/articles/PMC4846334/>. Acesso em: 12 dez. 2021.
LUTZ, A.; SPLENDORE, A. *Sobre uma micose observada em homens e ratos: contribuição para o conhecimento das assim chamadas esporotricoses.* . [S.l: s.n.], 2012.
MAHAJAN, Vikram K. *Sporotrichosis: An overview and therapeutic options*. *Dermatology Research and Practice*. [S.l.]: Hindawi Limited. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25614735/>. Acesso em: 20 dez. 2020. , 28 dez. 2014
MARIMON, R. *et al.* Sporothrix brasiliensis, S. globosa, and S. mexicana, Three New Sporothrix Species of Clinical Interest. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 45, n. 10, p. 3198–3206, 1 out. 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17687013>. Acesso em: 22 abr. 2019.
MARKOV, Oleg; OSHCHEPKOVA, Anastasiya; MIRONOVA, Nadezhda. Immunotherapy based on dendritic cell-targeted/-derived extracellular vesicles — A novel strategy for enhancement of the anti-tumor immune response. *Frontiers in Pharmacology*, v. 10, p. 1152, 11 out. 2019. Disponível em: <www.frontiersin.org>. Acesso em: 2 jul. 2020.
MARTINS, Telma S. *et al.* The Hog1p kinase regulates Aft1p transcription factor to control iron accumulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and*

Cell Biology of Lipids, v. 1863, n. 1, p. 61–70, jan. 2018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29032057>. Acesso em: 12 jun. 2019.
MEISTER, Gunter; TUSCHL, Thomas. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature 2004 431:7006*, v. 431, n. 7006, p. 343–349, 15 set. 2004. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature02873>. Acesso em: 24 nov. 2021.
MENDOZA, Mireya *et al.* Aislamiento de Sporothrix schenckii del medio ambiente en Venezuela. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 24, n. 4, p. 317–319, 1 dez. 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1130140607700645>. Acesso em: 22 abr. 2019.
MENINO, João F.; ALMEIDA, Agostinho J.; RODRIGUES, Fernando. Gene knockdown in paracoccidioides brasiliensis using antisense rna. *Methods in Molecular Biology*. [S.l.]: Humana Press Inc., 2012. v. 845. p. 187–198. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22328375/>. Acesso em: 21 dez. 2020.
MESA-ARANGO, Ana Cecilia *et al.* Phenotyping and genotyping of Sporothrix schenckii isolates according to geographic origin and clinical form of Sporotrichosis. *Journal of clinical microbiology*, v. 40, n. 8, p. 3004–11, ago. 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12149366>. Acesso em: 22 abr. 2019.
MICHIELSE, Caroline B. *et al.* Agrobacterium-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. *Current genetics*, v. 48, n. 1, p. 1–17, jul. 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15889258/>. Acesso em: 22 dez. 2021.
MICHIELSE, Caroline B *et al.* Agrobacterium-mediated transformation of the filamentous fungus Aspergillus awamori. 2008.
MULLINS, E. D. *et al.* Agrobacterium-Mediated Transformation of Fusarium oxysporum: An Efficient Tool for Insertional Mutagenesis and Gene Transfer. *Phytopathology*, v. 91, n. 2, p. 173–180, 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18944391/>. Acesso em: 23 dez. 2021.
NADAL-RIBELLES, Mariona *et al.* Hog1 bypasses stress-mediated down-regulation of transcription by RNA polymerase II redistribution and chromatin

remodeling. *Genome Biology*, v. 13, n. 11, p. R106, 18 nov. 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23158682>. Acesso em: 12 jun. 2019.
NASUTION, Olviyani *et al.* Overexpression of *OLE1* enhances stress tolerance and constitutively activates the MAPK HOG pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 114, n. 3, p. 620–631, mar. 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27596631>. Acesso em: 12 jun. 2019.
NEGRINI, Thais de C. *et al.* Influence of TLR-2 in the immune response in the infection induced by fungus *Sporothrix schenckii*. *Immunological Investigations*, v. 43, n. 4, p. 370–390, 31 maio 2014. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/08820139.2013.879174>. Acesso em: 22 abr. 2019.
NORA, Luísa Czamanski *et al.* Synthetic and minimalist vectors for agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of fungi. *Genetics and Molecular Biology*, v. 42, n. 2, p. 395–398, 1 abr. 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/0.1590/1678-4685-GMB-2018-0221>. Acesso em: 28 dez. 2020.
OLIVEIRA, Débora L *et al.* Extracellular vesicles from Cryptococcus neoformans modulate macrophage functions. *Infection and immunity*, v. 78, n. 4, p. 1601–9, abr. 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20145096>. Acesso em: 22 abr. 2019.
OROFINO-COSTA, Rosane; MACEDO, Priscila Marques De; *et al.* Sporotrichosis: an update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 92, n. 5, p. 606–620, out. 2017. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962017000500606&lng=en&tlng=en>. Acesso em: 2 abr. 2019.
OROFINO-COSTA, Rosane; RODRIGUES, Anderson Messias; *et al.* Sporotrichosis: An update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 92, n. 5, p. 606–620, 1 set. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/abd1806-4841.2017279>. Acesso em: 31 ago. 2020.
ORTEGA, Ivy *et al.* Peroxide sensing and signaling in the Sporothrix schenckii complex: an in silico analysis to uncover putative mechanisms regulating the Hog1 and AP-1 like signaling pathways. *Medical Mycology*, v. 53, n. 1, p. 51–59, 1 jan.

2015. Disponível em: <https://academic.oup.com/mmy/article/53/1/51/993370>. Acesso em: 4 jan. 2022.
OSTAFIŃSKA, Agnieszka *et al.* Six new species of Sporothrix from hardwood trees in Poland. *MycoKeys*, v. 82, p. 1, 2021. Disponível em: <https://mycokeys.pensoft.net/article/66603/>. Acesso em: 14 set. 2021.
PAULA, Ana *et al. Esporotricose pulmonar: relato de caso. Pulmonay sporotrichosis: a case report*. . [S.l: s.n.], 2008. Disponível em: <http://www.sopterj.com.br/wp-content/themes/_sopterj_redesign_2017/_revista/2008/n_02-04/08.pdf>. Acesso em: 7 maio 2019.
PIJPER, Adrianus; PULLINGER, B.Davidine. An outbreak os sporotrichosis among South African native miners. *The Lancet*, v. 210, n. 5435, p. 914–916, 29 out. 1927. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673601351760>. Acesso em: 22 abr. 2019.
PROFT, Markus *et al.* Regulation of the Sko1 transcriptional repressor by the Hog1 MAP kinase in response to osmotic stress. *EMBO Journal*, v. 20, n. 5, p. 1123–1133, 1 mar. 2001. Disponível em: </pmc/articles/PMC145460/?report=abstract>. Acesso em: 30 dez. 2020.
QUEIROZ-TELLES, Flavio *et al.* Mycoses of implantation in Latin America: an overview of epidemiology, clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Medical Mycology*, v. 49, n. 3, p. 225–236, abr. 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21128710>. Acesso em: 22 abr. 2019.
RASCONI, Serena *et al.* Use of calcofluor white for detection, identification, and quantification of phytoplanktonic fungal parasites. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 75, n. 8, p. 2545–2553, abr. 2009. Disponível em: </pmc/articles/PMC2675195/?report=abstract>. Acesso em: 21 dez. 2020.
REED, K. D. *et al.* Zoonotic Transmission of Sporotrichosis: Case Report and Review. *Clinical Infectious Diseases*, v. 16, n. 3, p. 384–387, 1 mar. 1993. Disponível em: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1093/clind/16.3.384>. Acesso em: 22 abr. 2019.
REITER, W. *et al.* Yeast Protein Phosphatase 2A-Cdc55 Regulates the

Transcriptional Response to Hyperosmolarity Stress by Regulating Msn2 and Msn4 Chromatin Recruitment. *Molecular and Cellular Biology*, v. 33, n. 5, p. 1057–1072, 1 mar. 2013. Disponível em: </pmc/articles/PMC3623084/?report=abstract>. Acesso em: 30 dez. 2020.

RESTREPO, Angela *et al.* Itraconazole Therapy in Lymphangitic and Cutaneous Sporotrichosis. *Archives of Dermatology*, v. 122, n. 4, p. 413–417, 1 abr. 1986. Disponível em: <https://jamanetwork.com/journals/jamadermatology/fullarticle/547067>. Acesso em: 20 dez. 2020.

RIBEIRO, Bruno Niemeyer de Freitas *et al.* Bone involvement by Sporothrix schenckii in an immunocompetent child. *Pediatric Radiology*, v. 45, n. 9, p. 1427–1430, 17 ago. 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25686870>. Acesso em: 22 abr. 2019.

RODRÍGUEZ-PENA, Jose Manuel *et al. The high-osmolarity glycerol (HOG) and cell wall integrity (CWI) signalling pathways interplay: A yeast dialogue between MAPK routes*. *Yeast*. [S.l: s.n.]. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/yea.1792>. Acesso em: 21 dez. 2020. , 2 ago. 2010

ROSSATO, Luana; SILVANA DOS SANTOS, Suelen; *et al.* The impact of the absence of Toll-like receptor-2 during Sporothrix brasiliensis infection. *Journal of Medical Microbiology*, v. 68, n. 1, p. 87–94, 1 jan. 2019. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30451650>. Acesso em: 2 abr. 2019.

ROSSATO, Luana; DOS SANTOS, Suelen Silvana; *et al.* The importance of toll-like receptor 4 during experimental sporothrix brasiliensis infection. *Medical Mycology*, v. 57, n. 4, p. 489–495, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30085101/>. Acesso em: 31 ago. 2020.

RUS, Horea; CUDRICI, Cornelia; NICULESCU, Florin. *The role of the complement system in innate immunity*. *Immunologic Research*. [S.l: s.n.]. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1385/IR:33:2:103>. Acesso em: 28 dez. 2020. , nov. 2005

SANJUAN, Miguel A. *et al.* Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. *Nature*, v. 450, n. 7173, p. 1253–1257, 20 dez. 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18097414>.

Acesso em: 2 abr. 2019.
SCHMIDT, Oliver; TEIS, David. The ESCRT machinery. *Current Biology*, v. 22, n. 4, p. R116–R120, 21 fev. 2012. Disponível em: <http://www.cell.com/article/S0960982212000292/fulltext>. Acesso em: 13 dez. 2021.
SCHOREY, Jeffrey S *et al.* Exosomes and other extracellular vesicles in host–pathogen interactions. *EMBO reports*, v. 16, n. 1, p. 24–43, jan. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25488940/>. Acesso em: 31 ago. 2020.
SCHUBACH, Armando; BARROS, Mônica Bastos de Lima; WANKE, Bodo. Epidemic sporotrichosis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v. 21, n. 2, p. 129–133, abr. 2008. Disponível em: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00001432-200804000-00004>. Acesso em: 22 abr. 2019.
SHEARS, R. K. *et al.* Extracellular vesicles induce protective immunity against *Trichuris muris*. *Parasite Immunology*, v. 40, n. 7, p. e12536, 1 jul. 2018. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/pim.12536>. Acesso em: 2 jul. 2020.
SHI, Chong-Shan; KEHRL, John H. MyD88 and Trif Target Beclin 1 to Trigger Autophagy in Macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, v. 283, n. 48, p. 33175–33182, 28 nov. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18772134>. Acesso em: 2 abr. 2019.
SHIRAISHI, Kosuke *et al.* Yeast Hog1 proteins are sequestered in stress granules during high-temperature stress. *Journal of Cell Science*, v. 131, n. 1, p. jcs209114, 1 jan. 2018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29183915>. Acesso em: 12 jun. 2019.
SIDERIUS, Marco *et al.* The control of intracellular glycerol in Saccharomyces cerevisiae influences osmotic stress response and resistance to increased temperature. *Molecular Microbiology*, v. 36, n. 6, p. 1381–1390, 18 jan. 2002. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2958.2000.01955.x>. Acesso em: 21 dez. 2020.
SŁOMKA, Artur *et al.* Large Extracellular Vesicles: Have We Found the Holy Grail of Inflammation? *Frontiers in immunology*, v. 9, p. 2723, 13 dez. 2018.
SMEGO, Raymond A.; CASTIGLIA, Mary; ASPERILLA, Marianito O.

Lymphocutaneous syndrome. A review of non-sporothrix causes. *Medicine*, v. 78, n. 1, p. 38–63, jan. 1999. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9990353/>. Acesso em: 14 dez. 2021.
SMITH, EF; TOWNSEND, CO. A PLANT-TUMOR OF BACTERIAL ORIGIN. *Science (New York, N.Y.)*, v. 25, n. 643, p. 671–673, 1907. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17746161/>. Acesso em: 31 out. 2021.
STACHELT, Scott; NESTER, Eugene W. The genetic and transcriptional organization of the vir region of the A6 Ti plasmid of Agrobacterium tumefaciens. *The EMBO Journal*, v. 5, n. 7, p. 1445–1454, 1986.
SUGUI, Janyce A.; CHANG, Yun C.; KWON-CHUNG, K. J. Agrobacterium tumefaciens-Mediated Transformation of Aspergillus fumigatus: an Efficient Tool for Insertional Mutagenesis and Targeted Gene Disruption. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 4, p. 1798, abr. 2005. Disponível em: </pmc/articles/PMC1082565/>. Acesso em: 23 dez. 2021.
TANG, Yanyan *et al.* The Biogenesis, Biology, and Clinical Significance of Exosomal PD-L1 in Cancer. *Frontiers in Immunology*, v. 11, p. 604, 7 abr. 2020.
TEN BROEKE, Toine; WUBBOLTS, Richard; STOORVOGEL, Willem. MHC class II antigen presentation by dendritic cells regulated through endosomal sorting. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, v. 5, n. 12, p. a016873, 1 dez. 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24296169>. Acesso em: 2 abr. 2019.
THOMASHOW, MF *et al.* Integration and organization of Ti plasmid sequences in crown gall tumors. *Cell*, v. 19, n. 3, p. 729–739, 1980. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7363328/>. Acesso em: 31 out. 2021.
TIJSTERMAN, Marcel; PLASTERK, Ronald H.A. Dicers at RISC; the mechanism of RNAi. *Cell*, v. 117, n. 1, p. 1–3, 2 abr. 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15066275/>. Acesso em: 23 nov. 2021.
TORRES, Isaura *et al.* Inhibition of PbGP43 Expression May Suggest that gp43 is a Virulence Factor in Paracoccidioides brasiliensis. *PLoS ONE*, v. 8, n. 7, 11 jul. 2013. Disponível em: </pmc/articles/PMC3708949/>. Acesso em: 1 jan. 2022.
VERDAN, F.F. *et al.* Dendritic cell are able to differentially recognize Sporothrix schenckii antigens and promote Th1/Th17 response in vitro. *Immunobiology*, v.

217, n. 8, p. 788–794, ago. 2012. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0171298512000897>. Acesso em: 2 abr. 2019.

VERGUNST, AC *et al.* VirB/D4-dependent protein translocation from Agrobacterium into plant cells. *Science (New York, N.Y.)*, v. 290, n. 5493, p. 979–982, 3 nov. 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11062129/>. Acesso em: 31 out. 2021.

VIEIRA, S. M. *et al.* A crucial role for TNF-α in mediating neutrophil influx induced by endogenously generated or exogenous chemokines, KC/CXCL1 and LIX/CXCL5: RESEARCH PAPER. *British Journal of Pharmacology*, v. 158, n. 3, p. 779–789, out. 2009. Disponível em: </pmc/articles/PMC2765597/?report=abstract>. Acesso em: 28 dez. 2020.

WIGHTMAN, Bruce; HA, Llho; RUVKUN, Gary. Posttranscriptional Regulation of the Heterochronic Gene lin-14 by W-4 Mediates Temporal Pattern Formation in C. elegans. v. 75, p. 855–862, 1993.

WINKLER, Astrid *et al.* Heat stress activates the yeast high-osmolarity glycerol mitogen-activated protein kinase pathway, and protein tyrosine phosphatases are essential under heat stress. *Eukaryotic cell*, v. 1, n. 2, p. 163–73, abr. 2002a. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12455951>. Acesso em: 12 jun. 2019.

WINKLER, Astrid *et al.* Heat stress activates the yeast high-osmolarity glycerol mitogen-activated protein kinase pathway, and protein tyrosine phosphatases are essential under heat stress. *Eukaryotic Cell*, v. 1, n. 2, p. 163–173, abr. 2002b. Disponível em: </pmc/articles/PMC118028/?report=abstract>. Acesso em: 30 dez. 2020.

XUE, Lu Lu; CHEN, Hao Hong; JIANG, Jian Guo. *Implications of glycerol metabolism for lipid production*. *Progress in Lipid Research*. [S.l.]: Elsevier Ltd. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163782717300139>. Acesso em: 30 dez. 2020. , 1 out. 2017

YAMAMOTO, Tomofumi; KOSAKA, Nobuyoshi; OCHIYA, Takahiro. Latest advances in extracellular vesicles: from bench to bedside. *Science and Technology of Advanced Materials*, v. 20, n. 1, p. 746, 31 dez. 2019. Disponível em:

</pmc/articles/PMC6691912/>. Acesso em: 13 dez. 2021.
YAMASAKI, Sho *et al.* C-type lectin Mincle is an activating receptor for pathogenic fungus, Malassezia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 106, n. 6, p. 1897–902, 10 fev. 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19171887>. Acesso em: 2 abr. 2019.
YÁÑEZ-MÓ, María *et al.* Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of extracellular vesicles*, v. 4, p. 27066, 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25979354>. Acesso em: 2 abr. 2019.
ZAMORE, Phillip D. *et al.* RNAi: Double-Stranded RNA Directs the ATP-Dependent Cleavage of mRNA at 21 to 23 Nucleotide Intervals. *Cell*, v. 101, n. 1, p. 25–33, 31 mar. 2000. Disponível em: <http://www.cell.com/article/S0092867400806200/fulltext>. Acesso em: 23 nov. 2021.
ZHAO, Zhuo-shen; MANSER, Ed. PAK family kinases. *Cellular Logistics*, v. 2, n. 2, p. 59–68, abr. 2012. Disponível em: </pmc/articles/PMC3490964/?report=abstract>. Acesso em: 21 dez. 2020.