

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO

**Caracterização funcional do mutante *pkcA*<sup>G579R</sup>  
que codifica o homólogo da proteína quinase C,  
no fungo patogênico *Aspergillus fumigatus***

**Marina Campos Rocha**

**São Carlos  
Setembro 2013**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO

**Caracterização funcional do mutante *pkcA*<sup>G579R</sup>  
que codifica o homólogo da proteína quinase C,  
no fungo patogênico *Aspergillus fumigatus***

**Marina Campos Rocha**

Orientador: Prof. Dr. Iran Malavazi

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular (PPGGEv) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) como requisito parcial a obtenção do título de MESTRE EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR

Área de concentração: Bioquímica e Biologia Molecular

**São Carlos**  
**Setembro 2013**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

R672cf

Rocha, Marina Campos.

Caracterização funcional do mutante  $pkcA^{G579r}$  que codifica o homólogo da proteína quinase C, no fungo patogênico *aspergillus fumigatus* / Marina Campos Rocha. -- São Carlos : UFSCar, 2014.

114 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Genética. 2. *Aspergillus fumigatus*. 3. Proteína quinase C. 4. Integridade da parede celular. 5. Termotolerância. I. Título.

CDD: 575.1 (20<sup>a</sup>)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR

“Caracterização funcional do mutante  $pkcA^{G579R}$  que codifica o homólogo da proteína quinase C, no fungo patogênico *Aspergillus fumigatus*”

Dissertação de Mestrado de

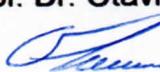
**MARINA CAMPOS ROCHA**

**Banca Examinadora**

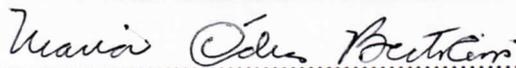
Prof. Dr. Iran Malavazi

.....  


Prof. Dr. Otávio Henrique Thiemann

.....  


Profa. Dra. Maria Célia Bertolini

.....  


### *Dedico*

*Aos meus pais, Luciene e Élcio, pelo apoio nos momentos difíceis, pela compreensão, amor, educação e apoio em todas as minhas decisões.*

*Ao Roger, meu noivo que tem sido meu suporte, meu companheiro e minha certeza nos momentos de dúvida, com todo meu amor dedico esta conquista.*

*Ao meu orientador Iran pela confiança depositada, e por sempre me auxiliar exercendo sua função de modo incontestável.*

*Disse a flor para o pequeno príncipe: é preciso que eu suporte  
duas ou três lagartas se quiser conhecer as borboletas  
(Antoine Saint Exupéry)*

## **Agradecimentos**

A CAPES, FAPESP e CNPq pelo auxílio financeiro.

Ao Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha pelo auxílio em diversas partes deste trabalho.

A minhas companheira de trabalho, Krissia , que se tornou especial, pelo auxílio durante a realização deste trabalho e pelos excelentes momentos de convívio proporcionado.

Aos companheiros de trabalho do LBGA Carla, Natália, Mayra, Marina B., e Eloá pelo auxílio.

A Andressa, por ter se tornado uma grande amiga presente em todos os momentos desta etapa.

Aos meus avós Dadinha e Carlito pelo carinho.

Ao meu irmão Igor pela amizade.

As minhas amigas afastadas pela distância, Milleny e Nathálie, porém sempre presentes no coração. Obrigado por tudo.

A todos que de alguma forma contribuirão para a realização deste trabalho.

## RESUMO

ROCHA, M. C. **Caracterização funcional do mutante, *pkcA*<sup>G579R</sup> que codifica o homólogo da proteína quinase C, no fungo patogênico *Aspergillus fumigatus*.** 133 f. Dissertação. Departamento de Genética e Evolução – Universidade Federal de São Carlos, 2013.

Ao longo dos últimos anos, a ocorrência de infecções fúngicas humanas vem apresentando um aumento expressivo. *Aspergillus fumigatus* é um fungo filamentosamente patogênico oportunista responsável por diversas doenças respiratórias humanas, incluindo aspergilose pulmonar invasiva, que é a forma de infecção mais grave. Estudos demonstram que o *A. fumigatus* possui um processo de virulência multifatorial associado a sua estrutura, capacidade de crescimento, adaptação em condições de estresse, mecanismos de evasão do sistema imune e capacidade de causar danos ao hospedeiro. A CWI (via de integridade da parede celular) é uma cascata de sinalização ativada nas células fúngicas sob condições de estresse de parede celular e desempenha um papel na adaptação de vários fungos patogênicos no hospedeiro humano. Em muitos fungos, CWI é desencadeada através da ativação da proteína quinase C (PKC) sendo que esta via está associada à transcrição de genes relacionados com a manutenção da integridade da parede celular e sua remodelação. Neste trabalho o mutante Gly579Arg (G579R) foi construído através da transformação mediada pela inserção de um cassete de substituição gênica que compreende uma transversão G2044C localizado no domínio regulador rico em cisteína C1B da *pkcA* de *A. fumigatus*. A partir da análise fenotípica desse mutante foi possível observar o envolvimento de *pkcA*<sup>G579R</sup> na CWI uma vez que a linhagem mutante mostrou alta sensibilidade a agentes como o CR (congo red) e CFW (calcofluor white). Além disso, *pkcA* está envolvido também na tolerância ao estresse oxidativo causado por menadiona e paraquat. Adicionalmente verificou-se o aumento da sensibilidade da linhagem mutante *pkcA*<sup>G579R</sup> às variações de temperatura bem como ao inibidor de Hsp90, radicicol. Como a CWI está relacionada à ativação transcricional de

genes de biossíntese e reforço de parede celular (como por exemplo glucanas sintases, quitinas sintases e glucanosil transferases), a abundância dos principais genes que codificam essas enzimas foi analisada através de RT-PCR em tempo real. Baseado nos testes pode-se verificar que as  $\alpha$ -1,3 glucana sintase (*agsA-C*) dependem da sinalização mediada por PkcA para sua expressão. Por outro lado, genes como a  $\beta$ -1,3 glucana sintase (*fksA*), glucanosiltransferases (*gelaA-C*) e algumas quitinas sintases (*chsB-C-E*) parecem não ser dependente da CWI e da função de PkcA. Esses dados demonstraram parte do papel de *pkcA* na cascata de sinalização da manutenção da parede celular e termotolerância em *A. fumigatus*. Este trabalho foi o primeiro no qual uma análise sistemática do gene *pkcA* foi conduzida no fungo patógeno oportunista humano *A. fumigatus*.

Palavras chave: 1. *Aspergillus fumigatus* 2. Proteína quinase C 3. Integridade da parede celular 4. Termotolerância

## ABSTRACT

ROCHA, M. C. **Functional characterization of mutant *pkcA*<sup>G579R</sup> encoding the homologous protein kinase C in the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*.** 133 f. Dissertation. Departamento de Genética e Evolução – Universidade Federal de São Carlos, 2013.

Over the recent years, the incidence of human fungal infections has shown a significant increase. *Aspergillus fumigatus* is a filamentous fungus opportunistic pathogen responsible for many human respiratory diseases, including invasive pulmonary aspergillosis, which is the most serious form of infection. Studies show that *A. fumigatus* virulence has a multifactorial process associated with its structure, capacity for growth, adaptation to stress conditions, evasion mechanisms of the immune system and ability to cause harm to the host. CWI (via cell wall integrity) is a signaling cascade activated in yeast cells under conditions of cell wall stress and plays a role in the adaptation of various fungal pathogens in the human host. In many fungi, CWI is triggered by activation of protein kinase C (PKC) and that this pathway is associated with the transcription of genes related to maintaining the integrity of the cell wall and its redevelopment. In this work, a mutant Gly579Arg (G579R) was constructed by transformation mediated by inserting a gene replacement cassette comprising a G2044C transversion located in the cysteine-rich domain controller C1B *pkcA* of *A. fumigatus*. From the phenotypic analysis of the mutant strain was observed in the involvement of *pkcA*<sup>G579R</sup> CWI since the mutant showed high sensitivity to agents such as CR (congo red) and CFW (calcofluor white). Furthermore, *pkcA* is also involved in tolerance to oxidative stress caused by paraquat and menadione. Additionally it was found to increase the sensitivity of the mutant *pkcA*<sup>G579R</sup> temperature variations as well as the inhibitor of Hsp90 radicicol. Como CWI is related to the transcriptional activation of biosynthetic genes and rugged cell wall (such as glucan synthase, glucanosil chitin synthases and transferases) the abundance of major genes coding for these enzymes was analyzed by RT-PCR in real time. Based on the tests can

be  $\alpha$ -1,3 glucan synthase ( *agsA-C* ) dependent signaling mediated PkcA for correct expression. Furthermore, genes such as  $\beta$ -1,3 glucan synthase (*fksA*) glucanosyltransferase (*glgA-C*) and some chitin synthases (*chsB-E-C*) appear not to be dependent function and CWI PkcA . These data demonstrated the role of *pkcA* signaling cascade in the maintenance of cell wall and thermotolerance in *A. fumigatus*. This work was the first in which a systematic analysis of gene *pkcA* was conducted in the human opportunistic fungal pathogen *A. fumigatus*.

Key words: 1. *Aspergillus fumigatus* 2. Protein Kinase C 3. Cell wall integrity 4. Thermotolerance

## SUMÁRIO

1.0. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	2
1.2. Morfologia do fungo <i>A. fumigatus</i> .....	5
1.3. Determinantes de virulência em <i>A. fumigatus</i> .....	6
1.4. A parede celular no fungo <i>A. fumigatus</i> .....	7
1.4.1. Proteína quinase C.....	14
2.0. OBJETIVOS .....	18
2.1. Objetivos específicos .....	199
3.0. MATERIAL E MÉTODOS .....	20
3.1. Linhagens de <i>A. fumigatus</i> utilizadas neste trabalho .....	211
3.2. Oligonucleotídeos .....	211
3.3. Oligonucleotídeos usados para RT-PCR em tempo real .....	211
3.4. Meios de cultivo .....	222
3.4.1. Meios de cultivo para <i>S. cerevisiae</i> .....	222
3.4.1.1. Meio SC URA <sup>-</sup> (Meio mínimo) .....	222
3.4.1.2. Meio YPD.....	233
3.4.2. Meio de cultivo para <i>Escherichia coli</i> .....	233
3.4.2.1. Meio LB (Luria bertani) .....	233
3.4.3. Meios de cultivo para <i>A. fumigatus</i> .....	233
3.4.3.1 Meio mínimo (MM, MM+UU).....	233
3.4.3.2. Meio completo (YAG, YUU, YG E YG+UU, YAG+KCL).....	244
3.4.3.3 Meio RPMI .....	244
3.5. Soluções e tampões.....	255
3.5.1. Solução de elementos traços.....	255
3.5.2. Solução de sais 20x concentrada para MM.....	25
3.5.3. Soluções de protoplastização para transformação em <i>A. fumigatus</i> .....	266
3.5.3.1. Solução 1 de protoplastização .....	266
3.5.3.2. Solução 2 de protoplastização .....	266
3.5.3.3. Solução 3 de protoplastização .....	26
3.5.3.4. Solução 4 de protoplastização .....	27
3.5.3.5. Solução 5 de protoplastização .....	27

<b>3.5.4. Solução para a extração do DNA plasmidial de <i>E.coli</i></b> .....	<b>28</b>
<b>3.5.4.1. Solução 1</b> .....	<b>288</b>
<b>3.5.4.2. Solução 2</b> .....	<b>288</b>
<b>3.5.4.3. Solução 3</b> .....	<b>288</b>
<b>3.5.5. Solução de cristal violeta</b> .....	<b>299</b>
<b>3.5.6. Soluções para transformação em <i>S. cerevisiae</i></b> .....	<b>299</b>
<b>3.5.6.1. Solução de TE (Tris EDTA) 10x</b> .....	<b>299</b>
<b>3.5.6.2. Solução de acetato de lítio 10x</b> .....	<b>299</b>
<b>3.5.6.3. Solução de PEG (polietilenoglicol) 50%</b> .....	<b>30</b>
<b>3.5.7. Tampão de extração de proteína</b> .....	<b>30</b>
<b>3.5.8. Inibidores de protease</b> .....	<b>30</b>
<b>3.5.9. Tampão para eletroforese de proteína 5x concentrada</b> .....	<b>30</b>
<b>3.5.10. Tampão de transferência para gel SDS page</b> .....	<b>311</b>
<b>3.5.11. TBS 10x</b> .....	<b>31</b>
<b>3.5.12. TBST 1x</b> .....	<b>31</b>
<b>3.5.13. Corante cromassie</b> .....	<b>322</b>
<b>3.5.14. Descorante de cromassie</b> .....	<b>32</b>
<b>3.5.15. Solução de SDS 10%</b> .....	<b>32</b>
<b>3.5.16. Tampão para extração de DNA</b> .....	<b>33</b>
<b>3.5.17. Tampão de amostra para eletroforese de proteínas 5x</b> .....	<b>333</b>
<b>3.5.18. Tampão TRIS-acetato-EDTA (TAE) 50x concentrado para eletroforese de DNA</b> .....	<b>333</b>
<b>3.5.19. Tampão de amostra para eletroforese de DNA 5x concentrada</b> ..	<b>344</b>
<b>3.5.20. Tampão de amostra para eletroforese de RNA</b> .....	<b>344</b>
<b>3.5.21. Tampão MOPS 10x concentrado para eletroforese de RNA</b> .....	<b>344</b>
<b>3.5.22. Tampão PBS (“Phosphate buffered saline”) 10x concentrado</b> .....	<b>35</b>
<b>3.6. Gel de agarose para eletroforese de DNA</b> .....	<b>35</b>
<b>3.7. Gel de agarose desnaturante para eletroforese de RNA</b> .....	<b>35</b>
<b>3.8 Gel para SDS Page 12%</b> .....	<b>36</b>
<b>3.8.1. Gel de poliacrilamida – empilhamento 1,2%</b> .....	<b>36</b>
<b>3.8.2. Gel de poliacrilamida – corrida</b> .....	<b>36</b>
<b>3.9. Solução estoque das drogas utilizadas</b> .....	<b>37</b>

<b>3.10. Protocolos adotados.....</b>	<b>38</b>
<b>3.10.1. Transformação em <i>A. fumigatus</i>.....</b>	<b>38</b>
<b>3.10.2. Teste de “drop-out” .....</b>	<b>399</b>
<b>3.10.3. Análise de formação de biofilme .....</b>	<b>40</b>
<b>3.10.4. Microscopia eletrônica de varredura .....</b>	<b>40</b>
<b>3.10.5. Análise da linhagem <i>alcA::pkcA::GFP</i> .....</b>	<b>40</b>
<b>3.10.6. Etest .....</b>	<b>411</b>
<b>3.10.7. Curva de sobrevivência após exposição a diferentes temperaturas .....</b>	<b>411</b>
<b>3.10.8. Determinação do número de protoplastos após a digestão parcial com Lallzyme™ .....</b>	<b>422</b>
<b>3.10.9. Teste de concentração inibitória mínima (CIM) .....</b>	<b>422</b>
<b>3.10.10. Curva de sobrevivência após exposição a celeritrina .....</b>	<b>422</b>
<b>3.10.11. Microscopia de polarização.....</b>	<b>433</b>
<b>3.10.12. Crescimento dos conídeos de <i>A. fumigatus</i> em explantes de pulmão de camundongo .....</b>	<b>433</b>
<b>3.10.13. Extração de RNA .....</b>	<b>444</b>
<b>3.10.14. Extração de DNA .....</b>	<b>444</b>
<b>3.10.15. Análises de PCR em tempo real.....</b>	<b>455</b>
<b>3.10.16. Extração de proteínas .....</b>	<b>466</b>
<b>3.10.17. Análises de “western blot” .....</b>	<b>466</b>
<b>3.10.18. Análise de “southern blot” .....</b>	<b>477</b>
<b>3.10.19. Ensaio de virulência em modelo murino.....</b>	<b>488</b>
<b>4.0. RESULTADOS.....</b>	<b>49</b>
<b>4.1. Construção da linhagem <i>pkcA</i><sup>G579R</sup> .....</b>	<b>50</b>
<b>4.2. Localização subcelular da proteína PkcA de <i>A. fumigatus</i> .....</b>	<b>544</b>
<b>4.3. Caracterização fenotípica do mutante <i>pkcA</i><sup>G579R</sup> em <i>A. fumigatus</i>... ..</b>	<b>566</b>
<b>4.3.1. Análise do crescimento radial.....</b>	<b>566</b>
<b>4.3.2. Ensaio fenotípicos do mutante <i>pkcA</i><sup>G579R</sup> frente a agentes que causam estresse de parede celular em <i>A. fumigatus</i> .....</b>	<b>588</b>
<b>4.3.3. Ensaio de sensibilidade dos mutantes frente às drogas que causam estresse oxidativo .....</b>	<b>611</b>

4.3.4. Análise da protoplastização em <i>A. fumigatus</i> .....	644
4.3.5. Análise do primeiro estágio de formação de biofilme em <i>A. fumigatus</i> .....	656
4.3.6. Análise da sensibilidade do mutante <i>pkcA</i> <sup>G579R</sup> a drogas em fitas de Etest .....	68
4.3.7 Análise do crescimento polarizado dos conídios .....	70
4.3.8. Análise da sensibilidade do mutante <i>pkcA</i> <sup>G579R</sup> em relação ao inibidor de PKC celeritrina .....	711
4.4. Análise transcricional dos genes relacionados a CWI na linhagem selvagem e <i>pkcA</i> <sup>G579R</sup> .....	744
4.5. Análise de “western blot” para verificar a fração fosforilada de MpkA .....	78
4.6. Análise da relação da PkcA de <i>A. fumigatus</i> com a termotolerância deste patôgeno.....	79
4.7. PkcA é requerida para o crescimento de <i>A. fumigatus</i> em pulmão murino .....	844
4.8. Análise da virulência das linhagens em modelo murino neutropênico de aspergilose pulmonar invasiva.....	855
5.0. DISCUSSÃO .....	877
6.0. CONCLUSÕES .....	966
7.0. REFERÊNCIAS.....	99

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** O ciclo de vida assexuado e patogênese de *A. fumigatus* (pág. 3)
- Figura 2:** Representação esquemática da parede celular do *A. fumigatus* (pág. 9)
- Figura 3:** Esquema da via de sinalização da integridade da parede celular (CWI) de *A. fumigatus* (pág.12)
- Figura 4:** A:Esquema representando a estrutura primária das diferentes formas de PKCs. B: Alinhamento múltiplo da sequência de PkcA (AN0106) de *A. nidulans* para comparação de sequências de várias espécies de fungos (pág.15)
- Figura 5:** Alinhamento múltiplo da sequência de PkcA (AN0106) de *A. nidulans* para comparação de sequências do domínio C1B entre PKCs de várias espécies de fungos e animais (pág.50)
- Figura 6:** Mutação e complementação da linhagem *pkcA*<sup>G579R</sup> (pág.52)
- Figura 7:** Construção da linhagem *alcA::gfp::pkcA* e análise da localização subcelular da *pkcA* de *A. fumigatus* (pág. 54)
- Figura 8:** A linhagem *pkcA*<sup>G579R</sup> de *A. fumigatus* apresenta redução do crescimento radial em relação a linhagem selvagem de *A. fumigatus* (pág. 56)
- Figura 9:** Teste de sensibilidade do mutante *pkcA*<sup>G579R</sup> a diferentes drogas que causam estresse da parede celular (pág. 59)
- Figura 10:** A mutação *pkcA*<sup>G579R</sup> promove aumento da sensibilidade a nikkomicina Z em *A. fumigatus* (pág. 60)
- Figura 11:** A linhagem mutada *pkcA*<sup>G579R</sup> de *A. fumigatus* apresenta maior susceptibilidade a ação do estresse oxidativo provocado pela menadiona (pág. 62)
- Figura 12:** Análise da sensibilidade do mutante *pkcA*<sup>G579R</sup> ao estresse oxidativo provocado por paraquat (pág. 63)
- Figura 13:** O mutante *pkcA*<sup>G579R</sup> possui aumento da capacidade de protoplastização em *A. fumigatus* (pág.64)
- Figura 14:** A linhagem *pkcA*<sup>G579R</sup> de *A. fumigatus* possui redução na capacidade da formação inicial de biofilme em placas de poliestireno (pág. 66)

- Figura 15:** Análise da superfície dos conídios através de MEV (pág. 67)
- Figura 16:** PkcA de *A. fumigatus* está relacionada a resistência a azóis e a equinocandinas (pág. 69)
- Figura 17:** A mutação *pkcA*<sup>G579R</sup> promove alteração do crescimento polarizado em *A. fumigatus* (pág. 70)
- Figura 18:** Demonstração esquemática dos domínios de PkcA e sítios de ligação da celeritrina (pág. 71)
- Figura 19:** Análise da viabilidade das linhagem selvagem e mutante após a exposição à celeritrina (pág. 72)
- Figura 20:** Análise transcricional dos genes que compõem a via de integridade da parede celular e de genes de biossíntese da parede celular de *A. fumigatus* (pág. 75)
- Figura 21:** A mutação *pkcA*<sup>G579R</sup> reduz a fosforilação da MAP quinase MpkA na presença de estresse de parede celular (pág. 77)
- Figura 22:** PkcA de *A. fumigatus* está relacionado a resistência ao choque térmico (pág. 79)
- Figura 23:** A mutação *pkcA*<sup>G579R</sup> *A. fumigatus* promove o aumento da sensibilidade ao radicicol em *A. fumigatus* (pág. 80)
- Figura 24:** Análise transcricional dos genes envolvidos no choque térmico de *A. fumigatus* a 37 °C (pág. 82)
- Figura 25:** Análise transcricional dos genes envolvidos no choque térmico de *A. fumigatus* a 48 °C (pág. 83)
- Figura 26:** Análise do crescimento do mutante *pkcA*<sup>G579R</sup> em tecido pulmonar murino (pág. 84)
- Figura 27:** Análise da virulência da linhagem *pkcA*<sup>G579R</sup> em modelo murino de aspergilose pulmonar invasiva (pág. 85)
- Figura 28:** Esquema do modelo transcricional regulado por PkcA de *A. fumigatus* na CWI baseado neste estudo (pág. 92)

## LISTA DE TABELAS

**TABELA 1:** Genótipos das linhagens de *A. fumigatus* utilizadas neste trabalho (pág. 20)

**TABELA 2:** Tabela contendo os oligonucleotídeos utilizados para construção e checagem de construções das linhagens utilizadas neste trabalho (pág. 20)

**TABELA 3:** Sequências dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-PCR em tempo real. (pág. 21)

**TABELA 4:** Agentes e drogas utilizados nos ensaios de caracterização fenotípica da linhagem *pkcA*<sup>G579R</sup> (pág. 37)

**TABELA 5:** Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) na linhagem selvagem, mutante e complementante (pág. 71)

**LISTA DE ABREVIATURAS**

**ABPA-** Aspergilose brocopulmonar aérgica

**AIDS-** Síndrome da imunodeficiência adquirida

**API-** Aspergilose pulmonar invasiva

**BSA-** Albumina bovina sérica

**CIM-** Concentração inibitória mínima

**CR-** congo red (vermelho do congo)

**CFU-** Unidade Formadora de Colônia

**CFW-** calcofluor white

**CWI-** “cell wall integrity” – integridade da parede celular

**DNA-** Ácido desoxirribonucleico

**DAG-** Diacilglicerol

**DEPC-** Dietil pirocarbonato

**DNA-** Ácido desoxirribonucleíco

**GPI-** Glicofosfatidilinositol

**HSE-** Elemento de “heat-shock”

**HSF-** Fator de “heat-shock”

**MAPK-** Proteína quinase ativada por mitógeno

**MOPS-** ácido 3-(N-morfolino propanosulfônico)

**MTT-** (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)

**PIR-** “protein with internal repeats”

**PKC**- Proteína quinase C

**PMSF**- Phenylmethysulfonyl fluoride

**PMN**- polimorfonuclear

**RNA**- Ácido ribonucleico

**WSC**- "cell wall integrity stress component"





## 1.0. INTRODUÇÃO

### 1.1. *Aspergillus fumigatus*

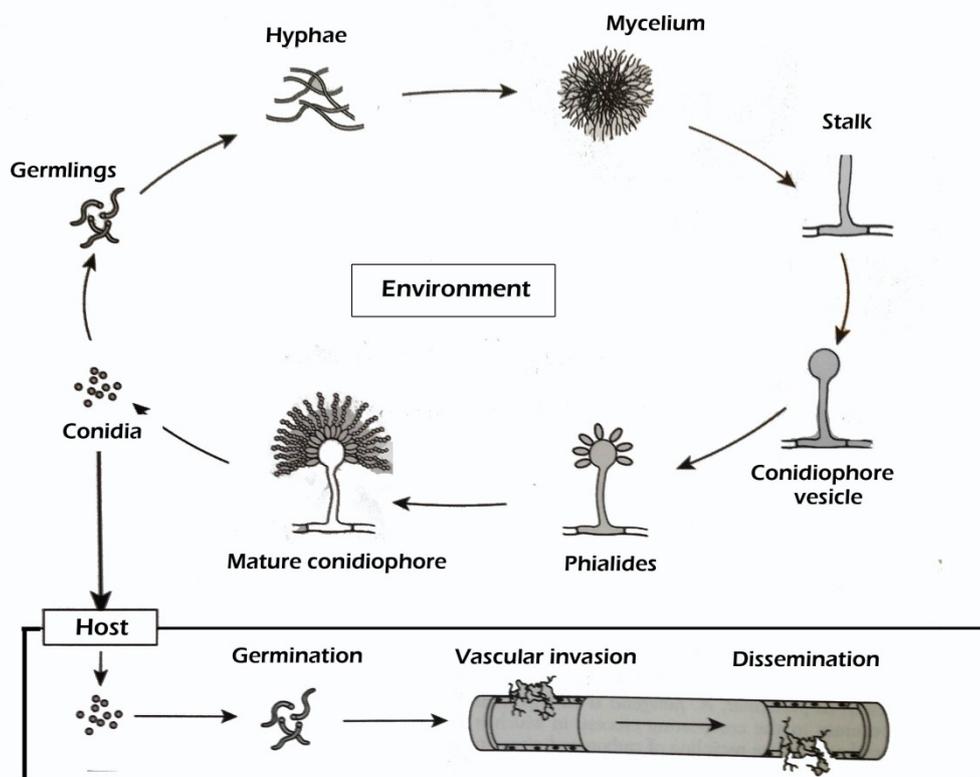
O patógeno *A. fumigatus* é um fungo filamentosos pertencente ao filo *Ascomycota*, ordem *Eurotiales*, família *Trichomaceae*. Os membros do filo *Ascomycota*, ao realizarem reprodução sexuada caracterizam-se pela produção de ascósporos contidos em estruturas denominadas ascos. Ainda, há membros que se reproduzem de forma assexuada através da produção de conídios, que se formam a partir de conidióforos (ALEXOPOULOS et al., 1996). A análise do genoma de *A. fumigatus* revelou a existência de genes envolvidos no processo de “mating”, e o ciclo sexual deste organismo foi descrito por O’Gorman et al., 2013. Análises de sequência do genoma revelaram que o locus MAT de *A. fumigatus* contém sequências conservadas em regiões que flanqueiam regiões idiomórficas que demonstram baixa homologia com dois isolados: o idiomorfo MAT1 que contém uma única ORF de codificação, e MAT2 que contém uma única ORF que codifica um grupo de genes de alta mobilidade (HMG). Esta estrutura idiomórfica é característica de fungos heterocários ascomicetos (PAOLETTI et al., 2005). Muitas espécies da família *Trichomaceae* produzem metabólitos secundários sendo alguns desses micotoxinas que podem ser prejudiciais à saúde humana e animal. Além disso, alguns componentes desta família são capazes de infectar humanos e animais, como é o caso do *A. fumigatus* (ALEXOPOULOS et al., 1996). A figura 1 apresenta uma ilustração esquemática do ciclo de vida assexuado e patogênese em *A. fumigatus*.

O *A. fumigatus* é um fungo saprofítico, ubíquo e termotolerante, que suporta temperaturas de até 70 °C (MAHESHWARI et al., 2000). Seus conídios são facilmente inalados devido ao seu pequeno tamanho (entre 2-3 µm), e sua alta hidrofobicidade, mantendo-se viáveis por longos períodos. Ao encontrar um substrato adequado estes podem germinar originando o micélio, que é formado por um conjunto de hifas septadas (CHAZALET et al., 1998; HOSPENTHAL et al., 1998; LATGÉ, 1999).

Ao longo dos últimos anos, a ocorrência de infecções fúngicas humanas oportunistas vem apresentando um aumento expressivo. Diversos fatores estão

relacionados ao crescimento dessas infecções, entre eles: o melhor diagnóstico laboratorial e clínico, o aumento da sobrevivência de pacientes com doenças imunossupressoras como a AIDS, e o emprego de medicamentos imunossupressores, utilizados em alguns grupos de pacientes. Em particular, este último grupo de pacientes tem se expandido devido ao aumento do uso da medicina de transplantes, terapias autoimunes e anti-neoplásicas (BRAKHAGE, 2005). Estes fatores permitem a instalação e patogênese de microorganismos convencionalmente saprófitos como é o caso do *A. fumigatus*.

**Figura 1: O ciclo de vida assexuado e patogênese de *A. fumigatus***



*A. fumigatus* desenvolve através do ciclo assexuado. O conídio na presença de substratos nutricionais forma germinantes que se tornam hifas maduras que eventualmente se desenvolvem em micélio. Na presença de estímulos apropriados como privação de nutrientes, algumas hifas ativam o desenvolvimento através do ciclo assexual resultando em uma série de mudanças morfológicas como formação de hifas aéreas, desenvolvimento inicial do conidióforo, e, formação das filídes até o conidióforo maduro. No hospedeiro imunocomprometido os conídios inalados podem invadir os vasos sanguíneos e serem disseminados. Na aspergilose pulmonar invasiva o órgão majoritariamente colonizado é o pulmão (RHODES e ASKEW, 2010).

*A. fumigatus* é o principal agente etiológico da aspergilose em humanos, sendo a espécie responsável por cerca de 90% dos casos da doença (RIPPON, 1988; DENNING, 1998). Há uma variedade de processos envolvidos na patogênese e nas diferentes manifestações clínicas (RIPPON, 1988; DENNING, 1998). A maioria das infecções em humanos pode ser separada em três principais categorias: aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA), aspergiloma e aspergilose pulmonar invasiva (API) (STEINBACH, 2008).

A API é a forma clínica mais grave da aspergilose, com alta taxa de mortalidade, tendo como grupo de risco pacientes submetidos a transplante de órgãos sólidos (0,7-15%), de medula óssea (26%) ou de células tronco hematopoéticas (30%), portadores de leucemias agudas (24%) e pacientes submetidos a tratamento com drogas citotóxicas (MASCHMEYER et al., 2007). Na API o principal órgão afetado é o pulmão, aproximadamente 20% dos casos são disseminados e, em 15% os sítios de infecção estão distribuídos entre pele, seios paranasais e sistema nervoso central (PATTERSON et al., 2010).

A aspergilose pode ser nomeada como uma “doença do progresso da medicina”, devido ao fato do *A. fumigatus* ser um patógeno oportunista, frente ao aumento das terapias imunossupressoras que propiciam a sua implantação no organismo do hospedeiro. Com isso, as micoses sistêmicas causadas por *A. fumigatus* ocupam o segundo lugar em número de casos registrados, ficando atrás apenas da candidíase (MASCHMEYER et al., 2007).

A inalação dos conídios do *A. fumigatus* por indivíduos hígidos raramente leva ao desenvolvimento de alguma forma de aspergilose, já que nestes as células do sistema imune inato eliminam o fungo do organismo. Os macrófagos alveolares eliminam os conídios, enquanto as células polimorfonucleares (PMN) eliminam as hifas. No caso de tratamento prolongado com esteróides e outros imunossupressores, a função de fagocitose dos macrófagos está inibida e ocorre neutropenia profunda e prolongada, permitindo que os conídios germinem após serem inalados (PALOUSOVÁ et al., 2012).

O tratamento de infecções fúngicas é desafiador, pois estes organismos partilham muitas vias metabólicas com o hospedeiro mamífero. As atuais opções de tratamento para a aspergilose são limitadas a três classes terapêuticas de moléculas antifúngicas: polienos (anfotericina B) que se ligam

aos esteróis da parede celular fúngica; azóis que promovem inibição da esterol-1,4- $\alpha$ -desmetilase, um sistema enzimático microsossomal dependente do citocromo P450, inibindo a síntese do ergosterol na parede celular (fluconazol, voriconazol, itraconazol) (HERBRECHT et al., 2012) e equinocandinas semi-sintéticas (caspofungin, anidulafungin e micafungin) que inibem a enzima  $\beta$ 1,3 D-glucano sintetase, impedindo a manutenção da integridade da parede celular (PERLIN, 2011). Apesar das opções terapêuticas atuais, a mortalidade associada à aspergilose invasiva permanece elevada (STEINBACH e BENJAMIN, 2005).

## 1.2. Morfologia do fungo *A. fumigatus*

Inicialmente, o micélio de *Aspergillus spp.* produz conidióforos em abundância. Quando desenvolvidos, são estruturas longas, eretas, que terminam em uma vesícula globosa onde se assentam as fiálides ou células conidiogênicas. O *A. fumigatus* é uma espécie com fiálides uniseriadas com apenas uma camada de células que produzem os fialoconídios. Além disso, suas fiálides ocupam apenas dois terços da vesícula. O conjunto composto pela vesícula, fiálides e fialoconídios é designado cabeça aspergilar (ALEXOPOULOS et al., 1996).

O desenvolvimento dos conídios é blástico. Cada conídio se desenvolve como uma protrusão a partir da ponta da fiálide, onde um septo é formado e delimita o conídio. Quando este está maduro, outro conídio se forma abaixo e empurra o anterior para fora, porém, as paredes celulares dos conídios adjacentes permanecem fisicamente conectadas por algum tempo. Com isso, uma cadeia de conídios se acumula na ponta da fiálide. Em condições de crescimento adequadas, os conídios “quiescentes” se diferenciam em hifas septadas, com aproximadamente 3 a 6  $\mu$ m de diâmetro, apresentando crescimento bifurcado em ângulo de 45° (MOMANY e TAYLOR, 2000).

Quanto ao aspecto macroscópico do *A. fumigatus*, pode-se observar colônias inicialmente brancas na fase de maturação que se tornam verde-escuras ou cinzas no meio de cultura sólido. A textura da colônia é algodoadada, tornando-se pulverulenta com a produção dos conídios (LARONE, 2002).

Além das suas características microbiológicas como rápido crescimento e tamanho dos conídios diversos determinantes de virulência foram caracterizados no *A. fumigatus*, como componentes da parede celular e produção de metabólitos secundários que atuam como toxinas no hospedeiro (STEVENS, 2004).

### 1.3. Determinantes de virulência em *A. fumigatus*

Um patógeno primário típico possui características únicas que evoluíram em associação com um organismo e um hospedeiro. Estes fatores de virulência normalmente são dispensáveis para o desenvolvimento do patógeno fora do hospedeiro, mas proporcionam alguma vantagem competitiva para o organismo quando este se encontra no hospedeiro (RHODES e ASKEW, 2010).

Como saprófita, *A. fumigatus* evoluiu para se adaptar com eficiência a condições estressoras e manter o suprimento nutricional por osmotropia, que é caracterizada pela digestão do substrato extracelular seguido pela absorção eficiente dos produtos de degradação que são então transmitidos para o metabolismo primário fúngico. Acredita-se que estas características metabólicas intrínsecas estão relacionadas com a sua capacidade de virulência (AMICH e KRAPPMANN 2012).

Assim, diversos genes que estão relacionados a patogenicidade em *A. fumigatus* não se encaixam em uma definição clássica de fator de virulência, no entanto, eles são responsáveis pela evasão do sistema imune e capacidade de causar danos ao hospedeiro (RHODES e ASKEW, 2010). Os determinantes de virulência do patógeno auxiliam na adesão, colonização, disseminação e imunomodulação e, portanto na habilidade do fungo em escapar dos mecanismos de resposta imune do hospedeiro (CASADEVALL E PIROFSKI, 1999).

Os genes e moléculas envolvidos na capacidade infectiva de *A. fumigatus* e, portanto tidos como determinantes de virulência podem ser classificados de acordo com a função em que estão envolvidos na proteção do patógeno frente ao hospedeiro como, por exemplo, termotolerância, composição da parede celular, resistência à resposta imune, produção de

toxinas e metabólitos secundários, absorção de nutrientes e versatilidade nutricional, regulação do metabolismo, dentre outros. Para uma revisão ver ABAD et al., (2010).

Dentre os fatores de virulência atualmente estudados dois desses se destacam pela sua importância na virulência de *A. fumigatus*, a parede celular fúngica (descrita na sessão 1.4) e a termotolerância uma vez que esses elementos conferem ao fungo *A. fumigatus* características únicas que refletem no seu estilo de vida.

A termotolerância é um traço genético importante uma vez garante a infecção de muitos mamíferos pela capacidade de multiplicação do fungo em temperaturas mais elevadas (37 °C) causando por este fato micoses profundas (KOBAYASHI, 2003).

Em uma análise do genoma de *A. fumigatus* observou-se cerca de 2000 genes relacionados à resistência a variação de temperatura, sendo que estes apresentavam maior variação na expressão quando expostos a 48 °C do que a 37 °C (HARTMANN et al., 2011). Dentre estes diversos genes relacionados ao choque térmico em *A. fumigatus*, verificou-se que eles codificam não só proteínas envolvidas diretamente na resposta ao choque térmico (tal como chaperonas), mas também enzimas envolvidas na resposta ao estresse oxidativo, transdução de sinal, metabolismo de carboidratos e nitrogênio dentre outros (SUGIYAMA et al., 2000).

A parede celular fúngica é um importante alvo visando o desenho de drogas, pois ela é a estrutura que determina o formato da célula, fornece suporte osmótico, proteção física, além de estar relacionada a eventos de sinalização celular, adesão e reprodução (MAGNELLI et al., 2004 ; DICHTI et al., 2012).

#### **1.4. A parede celular no fungo *A. fumigatus***

A parede celular fúngica é uma estrutura dinâmica cuja biogênese acompanha o crescimento da célula e o ambiente no qual esta se encontra. Além disso, componentes da parede celular participam dos processos de interação entre o fungo e o hospedeiro, bem como o reconhecimento

antigênico no caso de patógenos e transição morfológica no caso de fungos dimórficos (KLIS et al., 2001; PITARCH et al., 2003; KLIS et al., 2007).

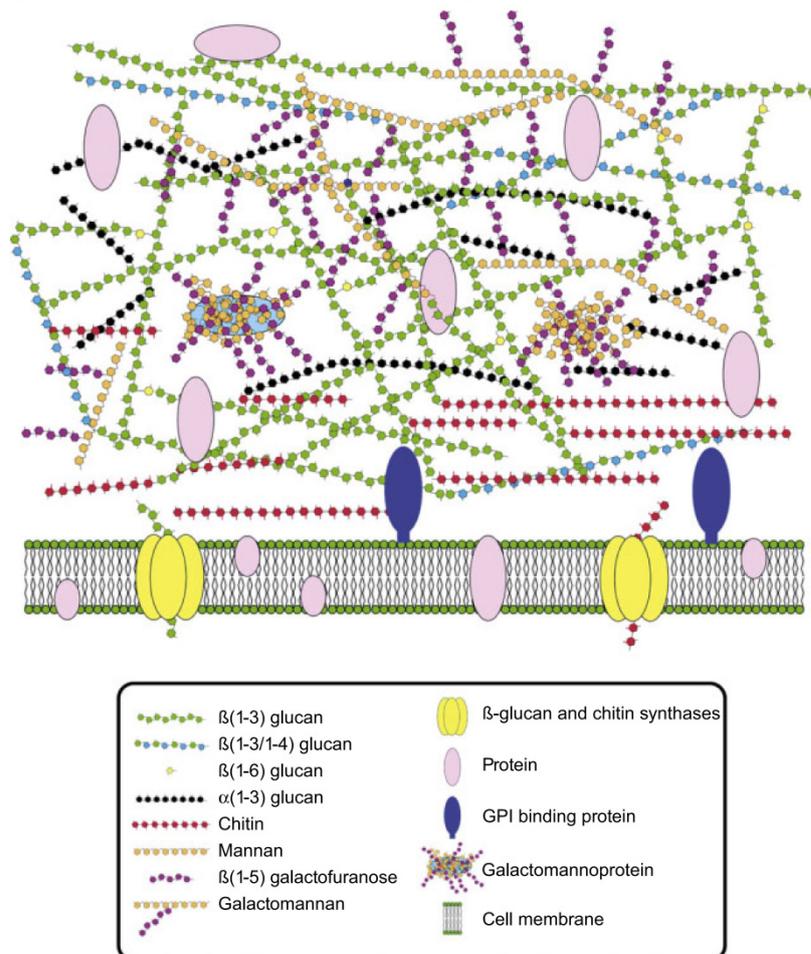
A parede celular de *A. fumigatus* é formada por três grupos principais de polissacarídeos: polímeros de manose (manoproteínas, que correspondem a 40% do peso seco de parede celular), polímeros de glicose ( $\alpha$ -glucanas e  $\beta$ -glucanas que correspondem a 60% do peso seco da parede celular) e polímeros de N-acetilglicosamina (quitina, que correspondem a 2% do peso seco da parede celular) (USCANGA e FRANÇOIS, 2003). As  $\beta$ -glucanas se dividem em dois subtipos de acordo com o tipo de ligação de glicose: cadeias longas de  $\beta$ -1,3-glucanas que representam 85% do total, das cadeias curtas de  $\beta$ -1,6-glucanas (KLIS et al., 2002; KLIS et al., 2006) e cadeia de  $\beta$ -1,4 glucanas (BERNARD e LATGÉ, 2001).

As moléculas de  $\beta$ -1,3-glucana estão associadas localmente por meio de ligações de hidrogênio, resultando na formação de uma rede tridimensional contínua (KLIS et al., 2006). Esta rede é altamente elástica e extensa em condições osmóticas normais. Em condições hipertônicas ela se retrai em até 60%, sendo esta retração totalmente reversível. Na face externa da rede, cadeias altamente ramificadas (polares) de  $\beta$ -1,6-glucana e de  $\beta$ -1,3-glucana são encontradas e ligadas ou não a mananoproteínas GPI-modificadas (glicosilfosfatidilinositol). No interior da rede de  $\beta$ -1,3-glucana, estão ligadas cadeias de quitina. Porém, a quitina também pode estar ligada à  $\beta$ -1,6-glucana em resposta a condições de estresse na parede celular (KLIS et al., 2006), como pode ser observado na figura 2.

A parte mais externa da parede celular é composta por peptídeo-polissacarídeos, glicoproteínas e proteínas Pir “protein with internal repeats” que estão ligadas as cadeias de  $\beta$ -glucanas (LESAGE e BUSSEY, 2006). Estes se localizam mais externamente e, por isso, parecem ter um papel relevante na interação fungo-hospedeiro (KLIS et al., 2002).

Verifica-se ainda, na parede celular de *A. fumigatus*, a presença de pequenas quantidades de proteínas livres (6 a 25%) e de lipídios (1 a 7%). Estes últimos apresentam-se na forma de triglicerídios, esteróides, fosfolipídios e glicolipídios (CHAFFIN et al., 1998; LIPKE e OVALLE, 1998). Um esquema da parede celular de *A. fumigatus* pode ser observado na figura 2.

**Figura 2: Representação esquemática da parede celular do *A. fumigatus***



Extraído de Abad et al., 2010. Para detalhes sobre a arquitetura da parede celular em fungos filamentosos ver o texto.

A expressão de proteínas responsáveis pela formação da parede celular em fungos é regulada por diversos fatores. O ciclo celular, as condições de cultivo, a disponibilidade de nutrientes, a esporulação e possíveis condições de estresse podem afetar a biossíntese dessas moléculas (KLIS et al., 2001). A parede celular pode variar em espessura e composição, dependendo do meio de cultura, temperatura de crescimento, pH externo e do nível de oxigênio (KLIS et al., 2006).

Há diferenças estruturais na composição da parede celular de conídios e das hifas de *A. fumigatus*. A parede conidial é pigmentada e apresenta uma superfície altamente hidrofóbica. Esta característica é conferida pela presença de melanina e de proteínas denominadas hidrofobinas (BENARD e LATGÉ, 2001; LATGÉ, 2005). As hidrofobinas de classe I, com baixo peso molecular (10 a 20 kDa) estão organizadas na superfície dos conídios de *A. fumigatus*

formando uma estrutura denominada de “rodlet” (GIRARDIN et al., 1999). Esta estrutura é característica dos conídios “quiescentes”, e pode estar envolvida em várias funções, como adesão às células do hospedeiro, proteção contra agentes químicos, enzimáticos e células fagocíticas e, além disso, facilitam a dispersão dos conídios por correntes de ar (DAGUE et al., 2008).

Muitas modificações ocorrem principalmente na camada mais externa da parede celular de acordo com o morfotipo, o ciclo celular e em resposta ao ambiente, resultando em padrões de expressão gênica e atividades proteicas que desencadeiam uma resposta celular alterada (BANUETT et al., 1998). Para desencadear uma resposta ao ambiente extracelular, alvos celulares específicos são afetados por mecanismos elaborados que envolvem receptores, mensageiros secundários, sistemas de transdução do sinal (normalmente proteínas quinases) e moduladores intracelulares específicos (HOHMANN e MAGER, 1997).

Dichtl et al., (2012), descreve quatro potenciais sensores de ativação da CWI em *A. fumigatus* (*midA*, *wsc1*, *wsc2*, *wsc3*) que podem ser localizados na membrana plasmática e analisa três Rho GTPases: Rho1 (DICHTL et al., 2010), Rho2 e Rho4 (DICHTL et al., 2012) supostamente envolvidas em CWI. Com base nos dados experimentais apresentados eles propuseram um modelo para detecção de estresse e transdução de sinal da CWI em *A. fumigatus*, no qual *midA* é fundamental para tolerância a temperaturas elevadas e resistência a agentes de ligação a quitina como CFW (calcofluor white) e CR (congo red). Paralelamente, e como era mostrado para o módulo da MAP quinase, *wsc1* é especificamente necessário para a tolerância a caspofungina. Mas, *wsc1*, *wsc3* e *midA* devem ter sobreposição de funções adicionais, pois o crescimento radial e a conidiação reduzida dos duplo mutante  $\Delta wsc1\Delta wsc3$  foi significativamente agravada no triplo mutante  $\Delta wsc1\Delta wsc3\Delta midA$  (DICHTL et al., 2012).

Os resultados em relação às rho GTPases envolvidas na sinalização da CWI em *A. fumigatus* são parcialmente controversos. Ambos  $\Delta rho2$  e  $\Delta rho4$  mostraram sensibilidade ao CFW, CR e a temperaturas elevadas. O CIM para caspofungina só foi reduzido em  $\Delta rho4$  e não em  $\Delta rho2$ . A localização dessas proteínas sugere que *rho4* e *rho2* são transdutores de sinal da CWI (DICHTI et al., 2012). Por outro lado, a indução da fosforilação de *mpkA* não foi alterada

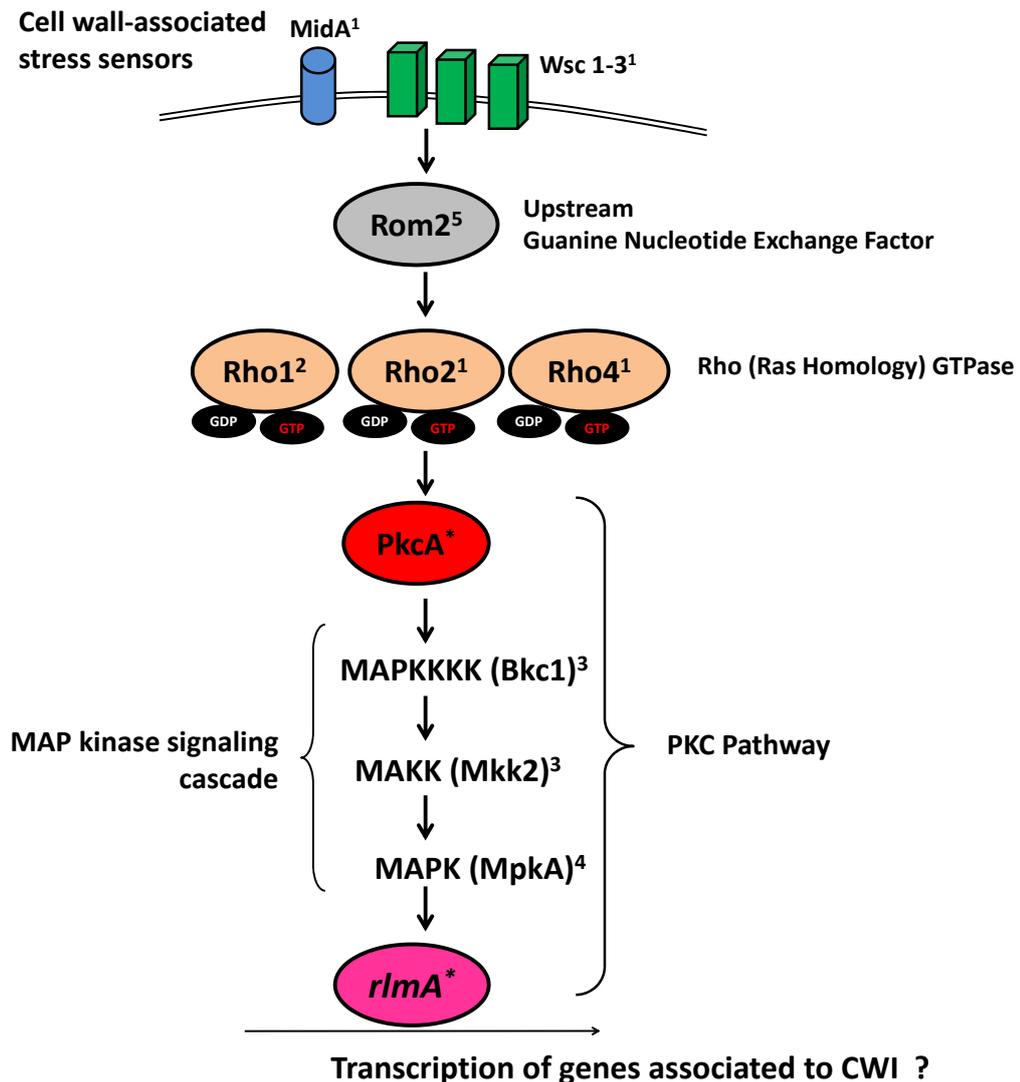
perante ao estresse provocado por CFW, sugerindo que os sinais de alteração da fosforilação em MpkA através dos sensores *wsc1*, *3* e *midA* não ativam apenas *Rho2* ou *Rho4* (DICHTI et al., 2012). Esse dado sugere que outras vias paralelas além da CWI podem atuar nesse organismo para a manutenção e reforço da parede celular.

Em *S. cerevisiae* os estímulos que ativam a CWI são captados por sensores presentes na membrana plasmática, por exemplo, Mid2p e Mtl1p (RAJAVEL et al., 1999), e membros da família Wsc (“cell wall integrity and stress response component”) (VERNA et al., 1997). Esses sensores por sua vez transmitem os sinais para Rom2p que é responsável pela ligação de GTP à proteína Rho1p. Uma vez ativada, Rho1p promove a ativação de Pkc1p (SÁNCHEZ, 2008). Em seguida, Pkc1p, codificada pelo gene PKC1 participa de uma cascata celular composta de MAP quinases, denominada via da integridade da parede celular (CWI “cell wall integrity”) (KAMADA et al., 1995), através da fosforilação de MAPKKK Bck1p que então ativa as MAPKK “downstream” parálogas Mkk1p e Mkk2p (SÁNCHEZ, 2008). A ativação da sequência da MAP quinase de sinalização celular é composta também pela MAP quinase denominada Mpk1p que por sua vez controla a atividade de dois fatores de transcrição, Rlm1p e SBF (Swi4/Swi6), responsáveis pela regulação da expressão de genes relacionados à biossíntese da parede celular e controle do ciclo celular em *S. cerevisiae*, respectivamente (YKEN et al., 2003).

O módulo de quinase central da MAPK é conservado a partir de *S. cerevisiae* para espécies de *Aspergillus* (FUJIOKA et al, 2007.; VALIANTE et al., 2009; DIRR et al., 2010).

Uma representação esquemática da CWI em *A. fumigatus* bem como os genes até então descritos e caracterizados como membros dessa via está demonstrado na figura 3.

**Figura 3: Esquema da via de sinalização de integridade da parede celular (CWI) de *A. fumigatus***



A proteína quinase C participa de uma cascata de MAP quinase, também denominada via de integridade celular, esta via é ativada quando há condições de estresse (maiores informações no texto). (Esquema modificado de MALAVAZI e GOLDMAN, 2012). <sup>1</sup>DICHTI et al., 2012, <sup>2</sup>DICHTI et al., 2010, <sup>3</sup>Valiante et al., 2009, <sup>4</sup>Valiante, et al., 2008, <sup>5</sup>Samantaray, et al., 2013 \* Não caracterizados.

Jung e Levin, 2002, demonstram que a sinalização através Rlm1 regula a expressão de pelo menos 25 genes, a maioria dos quais têm sido implicados na biogênese da parede celular (JUNG e LEVIN, 2002), e Damveld et al., 2005 demonstrou que a expressão destes genes regulados pelo fator de transcrição Rlm1p em *S. cerevisiae*, possui ortólogos na via de integridade da parede celular de fungos filamentosos como *A. niger* (DAMVELD et al., 2005).

Os genes que participam na biossíntese da maioria dos componentes da parede celular de *A. fumigatus* foram identificados.

Em particular, três genes  $\alpha(1-3)$ -glucano sintase, *agsA*, *agsB* e *agsC*, foram identificados como sendo responsáveis pela biossíntese de  $\alpha(1-3)$ -glucano sintase na parede celular. Os mutantes  $\Delta$ *agsA* e  $\Delta$ *agsB* não apresentaram alteração na sua virulência, entretanto o mutante  $\Delta$ *agsC* demonstrou hipervirulência em modelo murino (MAUBON et al., 2006). A hipervirulência foi considerada devido ao aumento do teor de melanina da parede celular dos conídios, o que poderia proteger as células contra estresse oxidativo, e uma taxa de germinação mais rápida, dificultando a ação de macrófagos (MAUBON et al., 2006).

A  $\beta$ -glucana é está presente em quase todos fungos e tem sido usada para o diagnóstico de micoses invasivas (ISHIBASHI et al., 2004). Esta é uma proteína transmembrana complexa formada por diversas proteínas diferentes. As  $\beta$ -1,3-glucanas de *A. fumigatus*, são sintetizadas por um complexo glucano sintase ligado à membrana plasmática, que utiliza UDP-glicose como substrato expondo as cadeias lineares de  $\beta$ -1,3-glucana linear através da membrana para o espaço periplasmático através das glucanosiltransferases (BEAUVAIS et al., 1993, BEAUVAIS et al., 2010). Em *A. fumigatus* foram identificados 3 genes responsáveis pela formação das glucanosyltransferases: *gelA*, *gelB* e *gelC* (ABAD et al., 2010). O gene que codifica a *fks1* em *A. fumigatus* pode ser a subunidade reguladora da síntese de glucana, *fks1* é essencial para o fungo e o seu interesse reside em ser o alvo dos antifúngicos da classe das echinocandinas (ABAD et al., 2010).

*A. fumigatus* possui pelo menos sete genes que codificam quitinas sintases, sendo que *chsA* e *chsC* demonstraram não estar relacionadas ao estresse da parede celular em *A. fumigatus* (ROGG et al., 2011), *chsE* e *chsG* estão relacionadas a resposta ao estresse de parede celular em *A. fumigatus* (MELLADO et al., 2003), e *chsB*, *chsD* e *chsF* ainda não estão caracterizadas neste patógeno.

### 1.4.1. Proteína quinase C

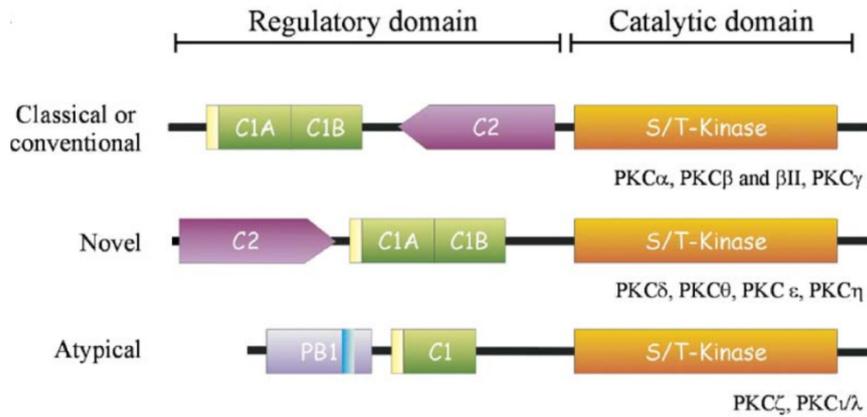
A proteína quinase C (PKC) foi originalmente identificada como uma proteína quinase dependente de cálcio e fosfolipídio (GÁRCIA e FERNÁNDEZ, 2006). Entretanto, no mínimo 11 isotipos de PKC foram identificados em mamíferos e classificados em 3 grupos de acordo com a estrutura e característica de ativação: o primeiro grupo foi constituído pela PKCs convencionais (PKC $\alpha$ , PKC $\beta$ I, PKC $\beta$ II e PKC $\gamma$ ) que são dependentes de cálcio e ativadas pela fosfatidilserina ou pelo diacilglicerol. O segundo grupo é constituído por PKCs denominadas de “novas” (PKC $\sigma$ , PKC $\delta$ , PKC $\epsilon$ , PKC $\eta$  e PKC $\theta$ ) que são independentes de cálcio, mas também reguladas pela fosfatidilserina ou pelo diacilglicerol; e constituindo o terceiro grupo estão as PKC denominadas de atípicas (PKC $\zeta$  e PKC $\lambda$ ) que são independentes de cálcio e não necessitam de fosfatidilserina nem do diacilglicerol para a ativação (MACKAY e TWELVES, 2007).

As diferentes isoformas de PKC estão envolvidas nos eventos de transdução de sinal de várias vias intracelulares. Estes incluem proliferação celular (OKA e KIKKAWAMA, 2005), diferenciação (DENNING, 2004), apoptose (GUTCHER et al., 2003), adesão (KITAJIMA et al., 1999), migração (JIANG et al., 2005) e secreção de íons (DEL et al., 2005). Na figura 4A pode ser observado um esquema das diferentes isoformas de PKC's.

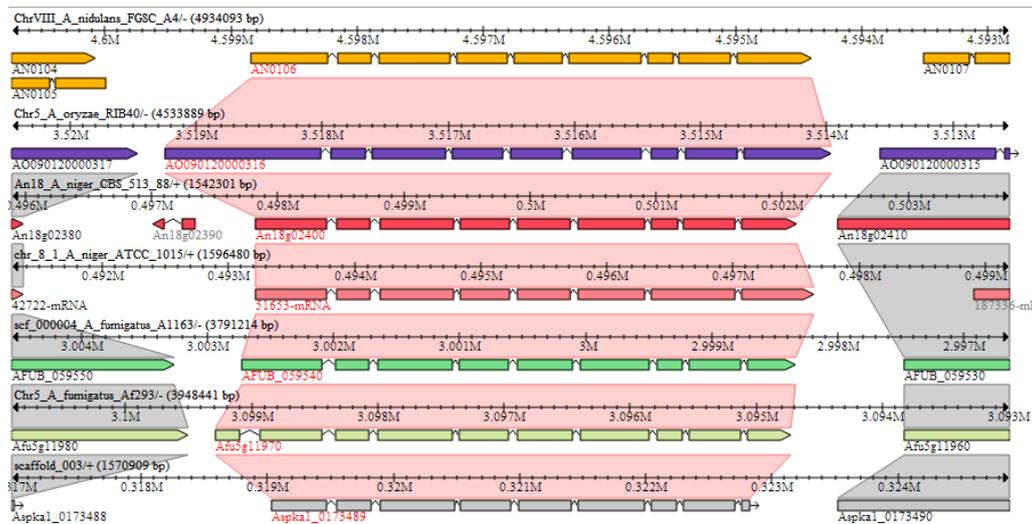
A PKC é uma enzima conservada entre eucariotos (como pode ser observado na figura 4C). Em organismos fúngicos são encontradas apenas uma ou duas PKCs, sendo a PkcA conservada em diversos organismos fúngicos como pode ser observado na figura 4B (LEVIN, 2005; SHEA e POETA, de 2006;. RHOME e POETA, 2009).

**Figura 4:A:Esquema representando a estrutura primária das diferentes formas de PKCs. B: Alinhamento múltiplo da sequência de PkcA (AN0106) de *A. nidulans* para comparação de seqüências de várias espécies de fungos. C: Análise filogenética das PKCs fúngicas**

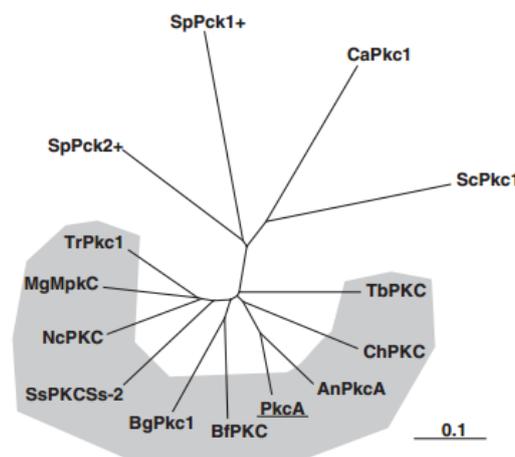
A-



B-



C-



A-Esquema de estruturas primárias dos membros da família da proteína quinase C com os domínios e suas diferentes isoformas. O domínio regulatório está localizado na região N-terminal contendo diferentes subdomínios, dependendo da isoenzima. O sítio do pseudosubstrato (amarelo), o subdomínio C1 (verde), o sub-domínio C2 (roxo). O subdomínio PB1 (violeta) contém o motivo OPCA representado por uma caixa azul. Todas as PKCs têm a região catalítica conservada no C terminal (laranja) que contém o sítio de ligação de ATP, e o sítio de fosforilação do substrato. Esta família de quinases pode ser dividida em três subfamílias dependendo da sua estrutura primária e propriedades bioquímicas. Os cPKCs (convencionais) são regulados pela  $Ca^{2+}$ , fosfatidilserina e diacilglicerol. Os nPKCs (novas) são regulados por diacilglicerol e fosfolípidos ácidos independente de  $Ca^{2+}$ . PKCs atípicas são reguladas por fosfolípidos ácidos e ceramidas. Adaptado de NEWTON, 1997. B-Em destaque va-se a PkcA de *A. nidulans* conservada em outras espécies fúngicas. A sequência da PkcA de *A. nidulans* está descrita em Herrmann et al. (2006). Em *A. fumigatus* o gene *pkcA* é codificado pela ORF Afu5g11970.C- Análise filogenéticas das Pkcs fúngicas (Extraída de Ichinomiya et al., 2007). An (organismo *Aspergillus niger*, número de acesso U10549), Bf (*Botrytis fuckeliana*, Y18252), Bg (*Blumeria graminis*, AF247001), Ca (*Candida albicans*, P43075), Ch (*Cochliobolus heterostrophus*, Y15839), Mg (*Magnaporthe grisea*, AF136600), Nc (*Neurospora crassa*, Y12002), Sc (*Saccharomyces cerevisiae*, P24583), Sp (*Schizosaccharomyces pombe*, P36582 e P36583), Ss (*Sporothrix schenckii*, AF124792), Tb (*Tuber borchii*, AJ245437), and Tr (*Trichoderma reesei*, Q99014). PKCs de fungos filamentosos e do fungo dimórfico *Sporothrix schenckii* estão marcadas de cinza.

As PKC's fúngicas possuem um domínio quinase serina/treonina, um domínio regulatório (compostos pelos domínios C1, C2, e HR1), e uma sequência de pseudosubstrato. Devido a sua composição estrutural, as PKC's fúngicas se encontram na classificação de "novas" PKC's (ICHINOMIYA et al., 2007), porém acredita-se que diferentemente das outras "novas" PKC's a PKC fúngica não é regulada pelo diacilglicerol (RONEM et al., 2007).

O domínio rico em cisteína (C1) de enzimas PKC clássicas foi definido pela primeira vez devido à capacidade de ligar os ésteres de forbol, que em mamíferos são indutores de tumor (BELL e BURNS, 1991). O domínio C1 é constituído de regiões ricas em cisteínas, sendo que no domínio C1B há 6 regiões ricas e cisteínas e 5 delas estão relacionadas "folding" de PKC (KAZANIETZ et al., 1995; GÁRCIA e FERNÁNDEZ, 2006).

O alinhamento de sequências de aminoácidos da região C1 de *S. cerevisiae* demonstraram que Pkc1p não se liga a DAG (SCHMITZ et al., 2001) e pertence à chamada classe de domínios C1 atípicos, sendo esse com regiões conservadas em diversos organismos fúngicos como pode ser observada na figura 4 A. Em outros membros da família de PKCs fúngicas (KHATUN e LACKING, 2010), geralmente os domínios C1 se ligam a fosfatidilserina, independentemente da sua capacidade de se ligarem a outros ativadores, promovendo uma associação de membranas (MOTT et al., 1996).

Uma interação com o GTPase Rho1p foi avaliada sendo mediada pelas regiões C1B e HR1 em *S. cerevisiae* (SCHIMITZ et al., 2001), sendo que o

domínio C1B media a ativação da cascata MAPK pela interação HR1A-Rho1p, esta mesma interação foi observada nos homólogos em *A. nidulans* (ICHINOMIYA et al., 2007). Isso explica os fenótipos associados à parede celular com mutações específicas nesta região (JACOBY et al., 1997) e considerando que o último parece mediar a ativação da cascata MAPK pela interação HR1A-Rho1p (SCHMITZ et al., 2001).

Domínios C2 são encontrados nas PKC's típicas e novas, em mamíferos este domínio é ativado através de ligações com cálcio, porém em PKC's fúngicas esta interação não foi demonstrada (ARPAIA et al., 1999). A função do domínio C2 em PKCs fúngicas ainda não foi definida, porém sabe-se que ele está envolvido no processo de fosforilação (GARCÍA e FERNÁNDEZ, 2006).

O sítio do pseudosubstrato é constituído de uma pequena sequência de aminoácidos, que se assemelha a sequência de aminoácidos que compõem as proteínas do substrato de PKC, exceto no resíduo de fosforilação, onde este é ocupado por uma alanina (NONAKA et al., 1995). O pseudosubstrato de PKC inibe a atividade da quinase, na ausência de ativadores ocorre uma alteração do "folding" de PKC, e o pseudosubstrato bloqueia o sítio catalítico desta enzima. Na presença de ativadores o pseudosubstrato se desliga da região catalítica e se liga ao domínio C2 permitindo a ação do substrato no sítio ativo de PKC (HOUSE e KEMP, 1987; ORR et al., 1994).

Paralelo aos sítios regulatórios descritos acima as interações entre os domínios são essenciais para a atividade das PKC's (GARCIA e FERNANDEZ, 2006).

---

## **2.0. OBJETIVOS**

## 2.0. OBJETIVOS

*A. fumigatus*, é um patógeno oportunista que causa a aspergilose broncopulmonar invasiva, que é a forma mais grave da doença. Apesar das opções atuais de tratamento, a incidência de aspergilose invasiva na população de risco permanece elevada. A parede da célula fúngica, é uma estrutura conservada, altamente dinâmica e essencial para a virulência e viabilidade de patógenos fúngicos. Esta é também o principal alvo de drogas antifúngicas da classe das equinocandinas. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo compreender melhor o funcionamento da CWI em *A. fumigatus* através da construção do mutante *pkcA*<sup>G579R</sup> em *A. fumigatus* e sua caracterização fenotípica.

### 2.1. Objetivos específicos

- Construção da linhagem *alcA::pkcA::GFP* para determinar a localização da proteína PkcA em *A. fumigatus*;
- Construção da linhagem *pkcA*<sup>G579R</sup> para determinar o papel a PkcA de *A. fumigatus* na via de integridade da parede celular através da sua caracterização fenotípica e genotípica;
- Determinar a relação da PkcA na virulência de *A. fumigatus*;
- Analisar o comportamento transcricional dos principais genes envolvidos na biossíntese da parede celular em *A. fumigatus* e sua dependência da atividade de PkcA.

---

### **3.0. MATERIAL E MÉTODOS**

### 3.0. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Linhagens de *A. fumigatus* utilizadas neste trabalho

Linhagem	Genótipo	Referências
$\DeltaakuB^{KU80}$	$\Delta ku80::pyrG$	Da Silva Ferreira et al., 2006
<i>pkcA</i> <sup>G579R</sup>	<i>pkcA</i> <sup>G579R</sup> :: <i>pyrG</i>	Este trabalho
<i>cpkcA</i> <sup>G579R</sup>	<i>pkcA</i> <sup>G579R</sup> :: <i>pyrG</i> :: <i>pkcA</i>	Este trabalho
<i>alcA</i> :: <i>pkcA</i> :: <i>GFP</i>	<i>alcA</i> :: <i>pkcA</i> :: <i>GFP</i> :: <i>pyr-4</i>	Este trabalho

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

#### 3.2. Oligonucleotídeos

Oligonucleotídeos	Sequência
<i>pkcA</i> START SC	5'-GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGATGGACGGGGACGACCT-3'
<i>pkcA</i> 2033 REV	5'-GGGACAAGGTGAGTACATTGAG-3'
<i>pkcA</i> GC FW	5'-TTGTCATGCTCAATGTACTCACCTTGTCCTGACTTTTGTGCGCATGTCCA-3'
<i>pkcA</i> 4120 REV	5'-GCATCAGTGCCTCCTCTCAGACAGAATTCCACGAATGAGGAAGACAGTGACC-3'
<i>pyrG</i> FW	5'-GGAATTCTGTCTGAGAGGAGGC-3'
<i>pyrG</i> REV	5'-GATATCGAATTCGCCTCAAAC-3'
<i>pkcA</i> 4145 3F	5'AAGAGCATTGTTTGAGGCCAATTCGATATCTTTAAGAATATTTAGGGCTAATCGC-3'
<i>pkcA</i> 3R	5'-GCCGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTCGTCATTTGTATTACCTGCCA-3'
<i>pkcA</i> 1875 FW	5'-GATACCTGCTTCCTTTGGAC-3'
<i>calc2</i> FW Xhol	5'-ATACTCGAGTACAACATACCTGGCTGGATG-3'
<i>calc2</i> REV Xhol	5'-ATACTCGAGGAGAGGATAGGGAAGATTCTGAAT-3'
<i>pkcA</i> Ascl:	5'-GGCGCGCCAATGGACGGGGACGACCT-3'
<i>pkcA</i> 2000 Pacl	5'-CCTTAATTAAGACCACATTCTGCAAGAGAATC-3'
<i>pkcA</i> 2649 REV	5'-TTTACGGCAACTTGTTGCTG-3'
<i>alcA</i> pMCB17apx FW	5'-GGTACGCGTATAGAGCCGTATAG-3'
<i>pkcA</i> 2663 FW	5'-CCGAAGTTCTGTTGGCTCTC-3'
<i>pkcA</i> 2783 REV	5'-CAGAGACCCTAATCGGCAAT-3'

Tabela 2: Sequência de oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.

#### 3.3. Oligonucleotídeos usados para RT-PCR em tempo real

Oligonucleotídeos	Sequência	Gene
<i>pkcA</i> 2663 FW	5'-CCGAAGTTCTGTTGGCTCTC-3'	Afu5g11970
<i>pkcA</i> 2783 REV	5'-CAGAGACCCTAATCGGCAAT-3'	Afu5g11970
( <i>tubA</i> ) FW	5'-TTCCCAACAACATCCAGACC-3'	Afu1g10910
( <i>tubA</i> ) REV	5'-CGACGGAACATAGCAGTGAA-3'	Afu1g10910
( <i>agsA</i> ) FW	5'-CCAACACCTGGAAGATGACC-3'	Afu3g00910
( <i>agsA</i> ) REV	5'-AACACCGACCGATAGAAGGA-3'	Afu3g00910
( <i>agsB</i> ) FW	5'-TCAGGGATTGGCTGTATGT-3'	Afu2g11270
( <i>agsB</i> ) REV	5'-TAGCACTTGAGAAGCCAGCA-3'	Afu2g11270
( <i>agsC</i> ) FW	5'-TGCAGACCCTGACAAGAGTG-3'	Afu1g15440
( <i>agsC</i> ) REV	5'-GAACAAGGCAATCCAGAACC-3'	Afu1g15440
( <i>chsA</i> ) FW	5'-CTGGAGTGTGGCTGGTCTCT-3'	Afu2g01870
( <i>chsA</i> ) REV	5'-CCGTGTGAAAGCAGTATGGA-3'	Afu2g01870
( <i>chsB</i> ) FW	5'-GCTCTCCACTGTGGTCTCT-3'	Afu4g04180
( <i>chsB</i> ) REV	5'-GGTCGTTGTTGATGGTGTG-3'	Afu4g04180
( <i>chsC</i> )FW	5'-TTGCTGCGAGTTTGTATTCC-3'	Afu5g00760
( <i>chsC</i> ) REV	5'-GCCAGTAGGATGCCAAAGAG-3'	Afu5g00760
( <i>chsD</i> ) FW	5'-CAGAACACGATCCGAACAAC-3'	Afu1g12600
( <i>chsD</i> ) REV	5'-GCTTCGCACCCAAGTAGAAC-3'	Afu1g12600
( <i>chsE</i> ) FW	5'-TGGTGTTCGTTGACTTGCTC-3'	Afu2g13440
( <i>chsE</i> ) REV	5'-TCATCCATCCAACCATTTCC-3'	Afu2g13440

do mutante *pkcA*<sup>G579R</sup> que codifica o homólogo da proteína quinase C, no fungo patogênico *Aspergillus fumigatus*

<i>(chsF)</i> FW	5'-AACCTGCTTCTTCTGGGTGA-3'	Afu8g05630
<i>(chsF)</i> REV	5'-GAGCACGAGTTCATGAGGT-3'	Afu8g05630
<i>(chsG)</i> FW	5'-AGGATGAGGGCAAAGAGTT-3'	Afu3g14420
<i>(chsG)</i> REV	5'-AAGGCGTTGCTAAAGATCCA-3'	Afu3g14420
<i>(fksA)</i> FW	5'-AAGCAATCGAAGCTCAGGAA-3'	Afu6g12400
<i>(fksA)</i> REV	5'-ACCAATCCCATAGAGCGAAC-3'	Afu6g12400
<i>(gelA)</i> FW	5'-CACTGGCTACGGTCTTCTC-3'	Afu2g01170
<i>(gelA)</i> REV	5'-CATTGTTGCCGCTAATCTCC-3'	Afu2g01170
<i>(gelB)</i> FW	5'-CAGGAGGAGAACGACTACGG-3'	Afu6g11390
<i>(gelB)</i> REV	5'-AGGTCTGGGTTGTGTTGGAG-3'	Afu6g11390
<i>(gelC)</i> FW	5'-GAATGGTGCCGTGACAAGAC-3'	Afu2g12850
<i>(gelC)</i> REV	5'-TGTTGCAGCCGTATTCAGAG-3'	Afu2g12850
<i>(rlmA)</i> FW	5'-GACGCCGATCTCTGCTCTAC-3'	Afu3g08520
<i>(rlmA)</i> REV	5'-GGAGTGGGGAAGTTAGAGG-3'	Afu3g08520
<i>(mpkA)</i> FW	5'-GGCCATCAAGAAGTTACCA-3'	Afu4g13720
<i>(mpkA)</i> REV	5'-TGAAATTGTCTGGTCGTGGA-3'	Afu4g13720
<i>(hsf1)</i> FW	5'-CGTGGTCATCCGGATCTACTG-3'	Afu5g01900
<i>(hsf1)</i> REV	5'-TGCCCCGCGGTGTTC-3'	Afu5g01900
<i>(hsp30)</i> FW	5'-CGCATCGCCGGCTAAG-3'	Afu6g06470
<i>(hsp30)</i> REV	5'-TGTTGGGTCGGTGAATTTGT-3'	Afu6g06470
<i>(hsp90)</i> FW	5'-CGCCAACATGGAGCGTATC-3'	Afu5g04170
<i>(hsp90)</i> REV	5'-TGTAAGAGTCATGGAGGTGTCA-3'	Afu5g04170
<i>(ssc1)</i> FW	5'-TCATCACCGCCGATGCTA-3'	Afu2g09960
<i>(ssc1)</i> REV	5'-GAGCGAGTCATCTTGAGGTTGA-3'	Afu2g09960
<i>(ssp1)</i> FW	5'-GGACGCAGGTGCCATTG-3'	Afu8g03930
<i>(ssp1)</i> REV	5'-GGCAGTGGGCTCATTGATG-3'	Afu8g03930

**Tabela 3: Sequências dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-PCR em tempo real.**

### 3.4. Meios de cultivo

#### 3.4.1. Meios de cultivo para *S. cerevisiae*

##### 3.4.1.1. Meio SC URA<sup>-</sup> (meio mínimo)

Base de nitrogênio para levedura	0,67% (p/v)
Glicose	2,00% (p/v)
Lisina; Leucina; Triptofano	0,01% (p/v)
Histidina	0,005% (p/v)
Água destilada	q.s.p.
Ágar (se sólido)	2% (p/v)

O meio SC é definido como um meio mínimo para cultura de leveduras. As substâncias que compõem o meio foram dissolvidas em água destilada e o meio de cultura foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120 °C e 1 kgf/cm<sup>2</sup> por 15 minutos.

### 3.4.1.2. Meio YPD

Peptona	2% (p/v)
Extrato de levedura	1% (p/v)
Dextrose	4% (p/v)
Ágar (se sólido)	2% (p/v)
Água destilada	q.s.p.

As substâncias que compõem o meio foram dissolvidas em água destilada e o pH foi ajustado para 6,5. O meio de cultura foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120 °C e 1 kgf/cm<sup>2</sup> por 15 minutos.

### 3.4.2. Meio de cultivo para *Escherichia coli*

#### 3.4.2.1. Meio LB (Luria Bertani)

Triptona	1% (p/v)
Extrato de Levedura	0,5% (p/v)
Cloreto de Sódio	0,17 M
Ágar (se sólido)	2% (p/v)
Água destilada	q.s.p.

As substâncias que compõem o meio foram dissolvidas em água destilada e o volume final foi acertado. O meio foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120 °C e 1 kgf/cm<sup>2</sup> por 15 minutos.

### 3.4.3. Meios de cultivo para *A. fumigatus*

#### 3.4.3.1 Meio Mínimo (MM, MM+UU)

Solução de sais	1x
Dextrose	1,0% (p/v)
Solução de elementos traços	0,1% (p/v)
Ágar (se sólido)	2% (p/v)

Água destilada q.s.p.

As substâncias que compõe o meio foram dissolvidas em água destilada, o pH foi ajustado para 6,5. O meio foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120 °C e 1 kgf/cm<sup>2</sup> por 15 minutos. Para MM+glicerol, a glicose foi substituída por 2% de glicerol (v/v). MM+UU indica o meio de cultura completo YAG suplementado com uridina 4 mmol e uracila 10 mmol.

### 3.4.3.2. Meio completo (YAG, YUU, YG e YG+UU, YAG+KCI)

Extrato de levedura	0,5% (p/v)
Glicose	2,0% (p/v)
Ágar (se sólido)	2,0% (p/v)
Solução de elementos traços	0,1% (v/v)
Água destilada	q.s.p.

As substâncias foram dissolvidas em água destilada e o meio foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120 °C e 1 kgf/cm<sup>2</sup> por 15 minutos. YUU indica o meio de cultura completo YAG suplementado com uridina 4 mmol e uracila 10 mmol. O meio de regeneração dos protoplastos utilizado na transformação de *A. fumigatus* consiste de meio completo adicionado de KCl 0,6 mmol (44 g/L). O meio top-ágar consiste no meio contendo 1,0% (p/v) de ágar.

### 3.4.3.3 Meio RPMI

Preparo do Meio (1 litro):

RPMI 1640 (contendo L-glutamina, Sigma, USA)	8,4 g
MOPS (Sigma, USA)	34,5 g
Ágar	15,0 g
D-Glicose	20,0 g
Água Deionizada	900 mL

O RPMI e MOPS foram dissolvidos em 500 mL de água deionizada estéril e em seguida filtrados com uma membrana 0,2 µm esterilizante. A glicose e o ágar

foram dissolvidos em 500 mL de água deionizada estéril, e em seguida esterilizados em autoclave por 15 minutos e resfriados a 45-50 °C. A solução de RPMI + MOPS esterilizada por filtração foi misturada a solução de ágar e glicose resfriada. Ajustou-se o pH para 7,0 com a solução de NaOH 1 M, e em seguida o meio foi distribuído em placas de Petri estéreis.

### 3.5. Soluções e tampões

#### 3.5.1. Solução de elementos traços

Sulfato de zinco heptahidratado	75 mM
Ácido bórico	180 mM
Cloreto de manganês tetrahidratado	25 mM
Sulfato de ferro heptahidratado	18 mM
Cloreto de cobalto pentahidratado	6 mM
Sulfato de cobre pentahidratado	6 mM
Molibdato de amônio tetrahidratado	1 mM
EDTA	140 mM
Água destilada	q.s.p.

Os componentes foram adicionados na ordem listada em água destilada. Cada componente foi dissolvido completamente antes de adição do próximo. A solução foi aquecida até 100 °C e então resfriada para 60 °C. Ajustou-se o pH entre 6,5 e 6,8 com solução de hidróxido de sódio (1 M). Deixou-se resfriar até atingir a temperatura ambiente para acertar o volume final.

#### 3.5.2. Solução de sais 20x concentrada para MM

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

do mutante *pkcA*<sup>G579R</sup> que codifica o homólogo da proteína quinase C, no fungo patogênico *Aspergillus fumigatus*

Os componentes foram dissolvidos em água destilada e utilizados na composição do Meio Mínimo diluído para 1x.

### 3.5.3. Soluções de protoplastização para transformação em *A. fumigatus*

#### 3.5.3.1. Solução 1 de protoplastização

Sulfato de amônio	0,8 M
Ácido cítrico pH 6	100 mM
Água destilada	q.s.p.

O sulfato de amônio foi dissolvido em água destilada e em seguida adicionou-se o volume adequado da solução de ácido cítrico 1 M, pH 6 previamente preparada. O pH foi ajustado para 6, e, o volume foi ajustado. A solução foi esterilizada por calor úmido em autoclave a 120 °C e 1 kgf/cm<sup>2</sup> por 15 minutos.

#### 3.5.3.2. Solução 2 de protoplastização

Extrato de levedura	1% (p/v)
Sacarose	2% (p/v)
Água destilada	q.s.p.

Os componentes foram dissolvidos em água destilada e o volume foi ajustado. A solução foi esterilizada por calor úmido em autoclave a 120 °C e 1 kgf/cm<sup>2</sup> por 15 minutos.

#### 3.5.3.3. Solução 3 de protoplastização

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

O sulfato de amônio e a sacarose foram dissolvidos em água destilada. Adicionou-se o volume necessário de uma solução de ácido cítrico 1 M, pH 6 previamente preparada, e o pH foi ajustado para 6. O volume foi ajustado, e a solução foi esterilizada por calor úmido em autoclave a 120 °C e 1 kgf/cm<sup>2</sup> por 15 minutos.

#### 3.5.3.4. Solução 4 de protoplastização

Polietilenoglicol PM 6000 g/mol	25% (p/v)
Cloreto de cálcio	100 mM
Cloreto de potássio	0,6 M
Tris HCl pH 7,5	10 mM
Água destilada	q.s.p.

Dissolveram-se os componentes em água destilada e acrescentou-se o volume necessário de solução Tris HCl, pH 7,5 (1 M) previamente preparada. O pH foi ajustado para 7,5, o volume foi ajustado e a solução esterilizada por calor úmido em autoclave a 120 °C e 1 kgf/cm<sup>2</sup> por 15 minutos.

#### 3.5.3.5. Solução 5 de protoplastização

Cloreto de cálcio	50 mM
Cloreto de potássio	0,6 M
MES pH 6,0	10 mM
Água destilada	q.s.p.

Os componentes foram dissolvidos em água destilada. O pH foi ajustado para 6, e o volume foi ajustado. A solução foi esterilizada por calor úmido em autoclave a 120 °C e 1 kgf/cm<sup>2</sup> por 15 minutos.

### 3.5.4. Solução para a extração do DNA plasmidial de *E.coli*

#### 3.5.4.1. Solução 1

Dextrose	50 mM
Tris HCl pH 8,0	25 mM
EDTA pH 8,0	10 mM
Água destilada	q.s.p.

Os componentes foram dissolvidos em água destilada e acrescentou-se o volume necessário de solução Tris HCl, pH 8 (1 M) , e EDTA pH 8 (0,5 M) previamente preparadas. O volume foi ajustado e esterilizado por calor úmido em autoclave a 120 °C e 1 kgf/cm<sup>2</sup> por 15 minutos.

#### 3.5.4.2. Solução 2

Hidróxido de sódio	0,2 M
SDS	1% (v/v)
Água destilada	q.s.p.

Acrescentou-se o volume necessário de solução de hidróxido de sódio (10 M) e SDS (10% p/v) previamente preparadas, o volume final foi ajustado e a solução foi utilizada em seguida.

#### 3.5.4.3. Solução 3

Acetato de potássio	5 M
Ácido acético glacial	11,50 % (v/v)
Água destilada	q.s.p.

Dissolveu-se o acetato de potássio em água destilada, acrescentou-se o volume de ácido acético glacial, o volume final foi ajustado e a solução foi armazenada a 4 °C.

### 3.5.5. Solução de cristal violeta

Cristal violeta	0,4 mM
Etanol	95% (v/v)
Oxalato de amônio	0,5 mM
Água deionizada	q.s.p.

Em um béquer dissolveu-se 2 g de cristal de violeta em 20 mL de etanol 95%. Em outro béquer dissolveu-se o oxalato de amônio em água deionizada. Em seguida misturou-se as duas soluções. Esta solução final ficou em repouso por 24 horas e após foi filtrada por papel filtro antes do uso.

### 3.5.6. Soluções para transformação em *S. cerevisiae*

#### 3.5.6.1. Solução de TE (Tris EDTA) 10x

Tris base	100 mM
EDTA, pH 7,5	10mM
Água destilada	q.s.p.

O Tris foi dissolvido em água destilada e acrescentou-se o volume necessário de solução de EDTA pH 7,5 (0,5 M) previamente preparada. O volume final foi ajustado e a solução foi esterilizada por calor úmido em autoclave a 120 °C, 1 kgf/cm<sup>2</sup> por 15 minutos.

#### 3.5.6.2. Solução de acetato de Lítio 10x

Acetato de lítio pH 7,5	1 M
Água destilada	q.s.p.

Dissolveu-se o acetato de lítio em água destilada, ajustou-se o pH com ácido acético 1M, o volume final foi ajustado e a solução foi esterilizada por calor úmido em autoclave a 120 °C e 1 kgf/cm<sup>2</sup> por 15 minutos.

**3.5.6.3. Solução de PEG (polietilenoglicol) 50%**

PEG (polietilenoglicol) 3350	50% (p/v)
Água milli-Q	q.s.p.

Dissolveu-se o PEG 3350 em água Milli-Q. O volume final foi ajustado e a solução esterilizada por calor úmido em autoclave a 120 °C e 1 kgf/cm<sup>2</sup> por 15 minutos.

**3.5.7. Tampão de extração de proteína**

SDS	0,1% (p/v)
Triton	1% (v/v)
Tris-HCl ph 7,5	50 mM
NaCl	150 mM
EDTA	15 mM
EGTA	5 mM
NaF	100 mM
Na <sub>2</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	10 mM
Complete-mini Merck®	1x

Os componentes foram dissolvidos em água destilada e o volume foi ajustado. A solução foi esterilizada por calor úmido em autoclave a 120 °C e 1 kgf/cm<sup>2</sup> por 15 minutos, e no momento do uso adicionou-se o Complete-mini Merck®.

**3.5.8. Inibidores de protease**

PMSF	200 mM
Etanol absoluto	q.s.p.

**3.5.9. Tampão para eletroforese de proteína 5x concentrada**

Tris base	125 mM
Glicina	95 mM

SDS	0,1% (p/v)
Água Milli-Q	q.s.p.

O Tris base e a glicina foram dissolvidos em água Milli-Q. Acrescentou-se o volume necessário da solução de SDS 1% previamente preparada e o volume final foi ajustado. A solução foi armazenada em geladeira. No momento do uso a solução foi diluída para a concentração de 1x a ser utilizada na eletroforese.

### 3.5.10. Tampão de transferência para gel SDS page

Tris base	25 mM
Glicina	192 mM
Metanol	20% (v/v)
SDS	0,1% (p/v)
Água Milli-Q	q.s.p.

O Tris base e a glicina foram dissolvidos em água Milli-Q acrescentou-se o volume necessário da solução de SDS 10% previamente preparada, acrescentou-se o metanol e o volume final foi ajustado. A solução foi preparada fresca no momento do uso.

### 3.5.11. TBS 10x

Cloreto de sódio	1,5 M
Tris base	2 M
Água Milli-Q	q.s.p.

O cloreto de sódio e o tris base foram dissolvidos em água Milli-Q, ajustou-se o volume final. A solução foi armazenada em geladeira.

### 3.5.12. TBST 1x

TBS	10x
Tween 20	0,05%

do mutante *pkcA*<sup>G579R</sup> que codifica o homólogo da proteína quinase C, no fungo patogênico *Aspergillus fumigatus*

Água Milli-Q q.s.p.

Adicionou-se o volume necessário de TBS 10x e Tween 20. Ajustou-se o volume final com água Milli-Q. A solução foi preparada no momento do uso.

### 3.5.13. Corante coomassie

Coomassie Brilliant Blue	0,25% (p/v)
Ácido Acético Glacial	30% (v/v)
Metanol	50% (v/v)
Água Milli-Q	q.s.p.

Os componentes foram misturados e o volume necessário ajustado com água Milli-Q. A solução foi armazenada à temperatura ambiente.

### 3.5.14. Descorante de coomassie

Ácido acético glacial	10% (v/v)
Etanol	30% (v/v)
Água Milli-Q	q.s.p.

Os componentes foram misturados e o volume necessário ajustado com água Milli-Q. A solução foi armazenada à temperatura ambiente.

### 3.5.15. Solução de SDS 10%

SDS	10% (p/v)
Água Milli-Q	q.s.p.

O SDS foi dissolvido em água destilada, e em seguida o volume final foi ajustado com água Milli-Q. A solução foi armazenada à temperatura ambiente.

### 3.5.16. Tampão para extração de DNA

Tris-HCl pH 8,5	200 mM
Cloreto de sódio	250 mM
EDTA	25 mM
SDS	0,5% (p/v)
Água Milli-Q	q.s.p.

O cloreto de sódio, SDS e o EDTA foram dissolvidos em água Milli-Q, acrescentou-se o volume necessário da solução de Tris-HCl, ajustou-se o volume final. A solução foi armazenada à temperatura ambiente.

### 3.5.17. Tampão de amostra para eletroforese de proteínas 5x

Tris-HCl	0,625 M
SDS	10% (p/v)
Glicerol	10% (v/v)
Azul de bromofenol	0,1% (p/v)
DTT	1mol/L
Água Milli-Q	q.s.p.

Os componentes foram dissolvidos em água Milli-Q e para uso o tampão foi diluído de forma que ficasse 1x na amostra. No momento do uso foi adicionado 2 mM de DTT a partir de uma solução estoque 1 mol/L previamente preparada e mantida à -20 °C.

### 3.5.18. Tampão TRIS-Acetato-EDTA (TAE) 50x concentrado para eletroforese de DNA

Tris base	2 M
Ácido acético glacial	5,71% (v/v)
EDTA 0,5M pH 8,0	0,05 M
Água Milli-Q	q.s.p.

do mutante *pkcA*<sup>G579R</sup> que codifica o homólogo da proteína quinase C, no fungo patogênico *Aspergillus fumigatus*

O Tris base foi dissolvido em água Milli-Q, em seguida acrescentou-se a solução de EDTA 0,5 M pH 8, previamente preparada. Acrescentou-se o ácido acético glacial, ajustou-se o pH para 8. Armazenou-se a solução à temperatura ambiente. Para uso na eletroforese de DNA, o tampão foi diluído 1x.

### 3.5.19. Tampão de amostra para eletroforese de DNA 5x concentrada

Azul de Bromofenol	0,1 mg/mL
Xilenocianol	0,1 mg/mL
Glicerol	50% (v/v)
Água Milli-Q	q.s.p.

Dissolveram-se os componentes no volume necessário em água Milli-Q. A solução foi armazenada à temperatura ambiente.

### 3.5.20. Tampão de amostra para eletroforese de RNA

RNA	x µL
Formaldeído	16,5%
Formamida	50%
Tampão MOPS	10x
Azul de bromofenol	0,5%
Água Milli-Q (DEPC)	q.s.p.

Acrescentou-se todos os componentes em água Milli-Q tratada com dietil pirocarbonato (DEPC) 0,1%. Em seguida acrescentou-se a amostra de RNA para se estabelecer a quantidade de RNA desejada no gel (geralmente 10 µg). As amostras foram aquecidas a 65 °C por 15 minutos em banho seco para desnaturar a amostra de RNA, em seguida aplicou-se no gel de agarose desnaturante 1,2%.

### 3.5.21. Tampão MOPS 10x concentrado para eletroforese de RNA

MOPS	0,2 M
------	-------

Acetato de sódio	0,5 M
EDTA	0,01 M
Água Milli-Q (DEPC)	q.s.p.

Dissolveu-se os componentes em água Milli-Q tratada com dietil pirocarbonato (DEPC) 0,1% e o pH foi ajustado para 7, ajustou-se o volume final.

### **3.5.22. Tampão PBS (“Phosphate buffered saline”) 10x concentrado**

Cloreto de sódio	350 mM
Cloreto de potássio	180 mM
Hidrogenofosfato de sódio	25 mM
Dihidrogenofosfato de potássio	18 mM
Água destilada	q.s.p

Dissolveu-se os componentes em água destilada, o pH foi ajustado para 7,4. O volume final foi ajustado e a solução esterilizada por calor úmido em autoclave a 120 °C e 1 kgf/cm<sup>2</sup> por 15 minutos. A solução foi armazenada em geladeira.

### **3.6. Gel de agarose para eletroforese de DNA**

Agarose	1%
TAE 1x	q.s.p

A agarose foi dissolvida em TAE no forno micro-ondas, após a fusão da agarose com o TAE esperou-se esfriar a temperatura de 50 °C, adicionou-se o brometo de etídio na concentração final de 40 µg/mL a partir de uma solução estoque previamente preparada na concentração de 10 mg/mL. A solução foi distribuída no suporte da cuba de eletroforese e aguardou-se 30 minutos para a polimerização antes da aplicação das amostras.

### **3.7. Gel de agarose desnaturante para eletroforese de RNA**

Agarose	1,2%
---------	------

do mutante *pkcA*<sup>G579R</sup> que codifica o homólogo da proteína quinase C, no fungo patogênico *Aspergillus fumigatus*

Tampão MOPS	10x
Formaldeído	15%
Água (DEPC)	q.s.p.

A agarose foi dissolvida em água Milli-Q DEPC em forno micro-ondas. Após a fusão da agarose com a água esperou-se esfriar a temperatura de 50 °C, adicionou-se o tampão MOPS, em seguida adicionou-se o formaldeído. A solução foi distribuída no suporte da cuba de eletroforese e aguardou-se 30 minutos para a polimerização antes da aplicação das amostras.

### 3.8. Gel SDS PAGE 12%

#### 3.8.1. Gel de poliacrilamida – empilhamento 1,2%

Tris-HCl pH 6,8	125 mM
SDS	0,1% (p/v)
Acrilamida:bisacrilamida (0,8:30)	5% (v/v)
TEMED	0,15% (v/v)
Persulfato de amônia	0,1% (v/v)
Água Milli-Q	q.s.p.

Os componentes foram dissolvidos em água Milli-Q. Após a dissolução dos componentes para a polimerização adicionou-se 0,15% (v/v) de TEMED e 0,1% (v/v) de persulfato de amônia, e em seguida aplicou-se a solução no suporte. Aguardou-se a polimerização do gel por no mínimo 30 minutos.

#### 3.8.2. Gel de poliacrilamida – corrida

Tris-HCl pH 8,0	375 mM
Acrilamida:bisacrilamida (0,8:30)	10% (v/v)
TEMED	0,1% (v/v)
Persulfato de amônia	0,1% (v/v)
Água Milli-Q	q.s.p.

Os componentes foram dissolvidos em água Milli-Q. Após a dissolução dos componentes para a polimerização adicionou-se 0,15% (v/v) de TEMED e 0,1% (v/v) de persulfato de amônia, e em seguida aplicou-se a solução no suporte. Aguardou-se a polimerização do gel por no mínimo 30 minutos.

### 3.9. Solução estoque das drogas e agentes utilizados neste trabalho

<b>Droga</b>	<b>Mecanismo de ação</b>	<b>Estoque</b>
cafeína	Inibição da fosfodiesterase	735 mM em água, na hora do uso a suspensão deve ser aquecida em banho-maria fervente para solubilização
calcoflúor (CFW)	Inibição das enzimas constitutivas que se ligam a $\beta$ -1,3-glucana e $\beta$ -1,6-glucana	10 mg/mL em água
congo red (CR)	Inibição das enzimas constitutivas que se ligam a $\beta$ -1,3-glucana e $\beta$ -1,6-glucana	5 mg/mL em água
SDS	Ação detergente na membrana plasmática	10% em água
anidulanfungim	Inibição da enzima $\beta$ 1,3 D-glucano sintetase	10 $\mu$ g/mL em água
fluconazol	Inibição das enzimas dependentes do citocromo fúngico P450	100 $\mu$ g/mL em água

do mutante *pkcA*<sup>G579R</sup> que codifica o homólogo da proteína quinase C, no fungo patogênico *Aspergillus fumigatus*

nikkomicina Z	Inibição da síntese de quitina	10 mM em água
menadiona	Libera ânion O singlete (O <sup>-1</sup> )	50 mM em água
paraquat	Produz radicais superóxido (O <sup>-2</sup> ), peróxido (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) e hidroxila (OH)	1 M em água
celeritrina	Inibição de PKC	0,0130 mol/L em água
radicolol	Inibição de Hsp90	2 µg/mL em etanol absoluto

**Tabela 4: Agentes e drogas utilizados nos ensaios de caracterização fenotípica da linhagem *pkcA*<sup>G579R</sup>.**

### 3.10. Protocolos adotados

#### 3.10.1. Transformação em *A. fumigatus*

Cerca de 10<sup>7</sup> conídios da linhagem recipiente de *A. fumigatus*  $\Delta$ *akuB*<sup>KU80</sup> (FERREIRA *et al.*, 2006) foram inoculados em 50 mL de meio completo YG líquido e incubados com agitação constante de 400 g por 16 horas a 37 °C. Os tubos germinativos foram coletados por centrifugação (900 g por 5 minutos) e a transformação foi realizada de acordo com descrito previamente (OSMANI *et al.*, 1987). Os pellets foram ressuspensos em 20 mL de solução 1 de transformação, somada de 20 mL de solução 2, e 6,5 mL de sulfato de magnésio 1 M, 400 mg de BSA e 400 mg de Lallzyme MMX® (Lallemand). Essa mistura foi incubada a 30 °C sob agitação 400 g por pelo menos 5 horas, até a completa protoplastização. Após a protoplastização, a cultura foi filtrada e centrifugada a 1500 g por 10 minutos. O pellet obtido foi lavado com solução 3 gelada por duas vezes e centrifugado por 5 minutos a 1500 g. Na sequência, o pellet foi ressuspenso no volume adequado de solução 5 (já que para cada

reação de transformação são usados 100  $\mu\text{L}$  dessa solução). A mistura foi incubada em banho de gelo por 10 minutos. Para cada reação foi adicionado 10-20  $\mu\text{g}$  de DNA com 50  $\mu\text{L}$  de solução 4. Esta mistura fora incubada por 20 minutos em banho de gelo. Após esse tempo, adicionou-se em cada reação 1 mL de solução 4 e incubou-se por mais 20 minutos na temperatura ambiente. Após esse tempo os protoplastos transformados foram inoculadas em meio YG + KCl top ágar, (o qual tem apenas 1% de ágar). Isso foi realizado para permitir a inoculação dos protoplastos transformados pelo método de “pour plate” sobre meio YG sólido + KCl previamente depositado sobre uma placa de petri. Para tanto, nas placas foram inicialmente colocados 20 mL do meio sólido YG + KCl e em seguida, a mistura de reação de transformação foi misturada com 15 mL de meio top ágar (YG + KCl), homogeneizada delicadamente por inversão e então colocada sobre o meio sólido na placa de petri. As placas de transformação foram então incubadas a 37 °C por aproximadamente três dias, até a visualização dos transformantes. Os transformantes obtidos foram isolados e repicados três vezes consecutivas em YG sólido a partir de colônias monoespóricas para eliminação dos heterocários de transformação. Depois de expandidos, o DNA genômico dos transformantes foi extraído e usado para validação desses através de PCR convencional diagnóstica e “Southern blot”.

### 3.10.2. Teste de “drop-out”

Para a realização da técnica de “drop-out” as linhagens foram crescidas em meio completo sólido YG por 48 horas a 37 °C. Conídeos das linhagens foram coletados em água Milli-Q autoclavada e em seguida filtrados em membrana Miracloth® (Merck). Após a filtração, as amostras foram diluídas e quantificadas através da contagem em câmara de Neubauer. Após a contagem estas foram diluídas sucessivamente nas concentrações de  $2 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^4$ . Para isto 5  $\mu\text{L}$  de cada uma das soluções foram pipetadas em placa de Petri contendo o meio apropriado, com a droga determinada para cada experimento respeitando a ordem decrescente de diluição. Em seguida as placas foram incubas a 37 °C por 24-48 horas. Após esse tempo os resultados foram analisados e as placas fotografadas, para montagem dos painéis utilizando-se o programa Adobe Photoshop®.

### 3.10.3. Análise de formação de biofilme

Para a quantificação da formação inicial de biofilme em *A. fumigatus* 100 mL de MM líquido contendo  $2 \times 10^4$  conídios foram adicionados a cada poço de uma placa de 96 poços e incubadas durante 24 horas a 37 °C. O meio foi removido, e os poços foram lavados três vezes com PBS 1x. Em seguida, 150 µL de solução de cristal violeta (0,5%) foram adicionados ao poço deixando em repouso por 5 minutos. O excesso da coloração foi removido suavemente com água Milli-Q e, em seguida, o poço foi descorado pela adição de 200 µL de etanol 95%. A quantificação de biofilme foi realizada através da leitura espectrofotométrica ( $\lambda = 575$  nm) da solução de descoloração obtida após 16 horas de incubação. A leitura foi realizada utilizando um leitor de microplaca (Biorad). Os resultados apresentados representam médias  $\pm$  desvios padrões de pelo menos três experimentos independentes.

### 3.10.4. Microscopia eletrônica de varredura

Para a realização deste experimento os conídios foram crescidos em meio completo sólido YG por 48 horas, em seguida estes foram coletados através de uma fita de carbono fixados em um porta amostra metálico e em seguida, recobertos por sputtering com uma fina camada de ouro para condução elétrica da amostra. A análise foi realizada no microscópio eletrônico de varredura Inspect S 50 (FEI) locado no Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de São Carlos.

### 3.10.5. Análise da linhagem *alcA::pkcA::GFP*

Para a visualização de fluorescência na linhagem *alcA::pkcA::GFP*,  $1 \times 10^4$  conídios foram incubados por 18 a 24 horas a 30 °C em 2 mL de MM+glicerol (condição de desrepressão do promotor) ou MM + glicerol + etanol 2% (condição de indução do promotor *alcA*). A incubação foi realizada em placas de cultivo do tipo “glass botton dishes” (Mattek Corporation, EUA). Os conídios foram observados em microscópio de fluorescência invertido Observer Z1 (Zeiss, Alemanha) usando uma objetiva de 100x de imersão em óleo com

abertura numérica 1.4. As imagens de fluorescência foram capturadas com filtro GFP HE (High Efficiency 38, Zeiss) em 470/40 nm para excitação e 525/50 nm para emissão. As imagens em campo claro foram capturadas sob contraste diferencial de intensidade (DIC). As imagens foram capturadas com uma câmera AxioCam (Zeiss) e processadas com o software AxioVision (Zeiss) e Adobe Photoshop® para a montagem dos painéis.

### **3.10.6. Etest**

O Etest consiste numa fita plástica fina, inerte e não porosa de 5 mm de largura e 50 mm de comprimento. Um lado da fita é marcado com uma escala de leitura de CIM em  $\mu\text{g/mL}$ . Um código de letras designa a identidade do fármaco. Um gradiente exponencial pré-definido do fármaco seco e estabilizado é mobilizado no outro lado da fita. O gradiente reflete uma faixa contínua de concentração, que varia de 0,016 a 256  $\mu\text{g/mL}$  ou 0,002 a 32  $\mu\text{g/mL}$ , dependendo do antibiótico. Esta faixa corresponde a 15 diluições num método convencional de CIM. Quando uma fita de Etest é aplicada numa placa de ágar inoculado com determinado microrganismo, há uma liberação imediata do antibiótico da fita para o ágar. Após incubação, quando o crescimento se torna visível, uma elipse de inibição simétrica ao redor da fita é visualizada.

Para a realização do Etest  $1 \times 10^6$  colônias das linhagens foram inoculadas com o auxílio da alça de Drigalski em placa de petri contendo 20 mL do meio RPMI sólido previamente preparado. Após o inóculo foi necessário aguardar 15 minutos para que a superfície do meio RPMI estivesse completamente seca. Em seguida a fita de Etest foi aplicada na superfície do meio conforme indicado pelo fabricante. As placas foram inoculadas a 37 °C por 30 horas e a CIM foi determinada através do halo de inibição formado. Os resultados apresentados representam pelo menos três experimentos independentes.

### **3.10.7. Curva de sobrevivência após exposição a diferentes temperaturas**

Para realização deste teste, 200 conídios de cada linhagem foram inoculados em placa de meio YG sólido as quais foram expostas às

do mutante *pkcA*<sup>G579R</sup> que codifica o homólogo da proteína quinase C, no fungo patogênico *Aspergillus fumigatus*

temperaturas de 45 e 50 °C por 12 e 24 horas. Em seguida as placas (tratadas e não tratadas) foram incubadas a 37 °C por 24 horas para a recuperação do crescimento. O percentual de sobrevivência foi obtido pela contagem das unidades formadoras de colônias (CFU) nas placas tratadas pelo calor em relação ao controle não tratado. Os resultados apresentados representam média ± desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes.

### **3.10.8. Determinação do número de protoplastos após a digestão parcial com LallzymeMMX™**

Para realização deste teste  $2 \times 10^6$  conídios de cada linhagem foram inoculados em meio YG por 16 horas a 180 rpm a 37 °C. 100 mg do micélio obtido foram incubadas com LallzymeMMX™ na concentração de 0,3% numa reação de 50 mL da solução 3 de protoplastização contendo 400 mg de BSA (albumina bovina sérica) por 0, 4 e 6 horas. Os protoplastos de cada tempo foram coletados e diluídos para possibilitar a quantificação através da câmara de Neubauer. Os resultados apresentados representam média ± desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes.

### **3.10.9. Teste de concentração inibitória mínima (CIM)**

Para a determinação da CIM as linhagens foram inoculadas na concentração de  $1 \times 10^7$  em tubos de ensaio contendo meio líquido YG e a concentração indicada da droga testada. Estes tubos foram incubados a 37 °C por 24 horas. A CIM foi determinada através da concentração de droga que impediu o crescimento total do fungo. Os resultados apresentados representam médias ± desvios padrões de pelo menos três experimentos independentes. Este protocolo foi realizado de acordo com a norma M38-A com pequenas modificações.

### **3.10.10. Curva de sobrevivência após exposição a celeritrina**

Para a realização deste experimento,  $2 \times 10^3$  conídios de cada linhagem foram expostos às concentrações pré-estabelecidas de celeritrina em meio

líquido completo YG a 37 °C por 16 horas em placa de poliestireno de 96 poços. Após este período a placa foi centrifugada a 1000 g por 10 minutos, o meio de cultura foi descartado, e adicionou-se 200 µL de MTT 10 mg/mL (Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 digeniltetrazolium), incubou-se por 3 horas, e em seguida as placas foram centrifugadas a 1000 g por 10 minutos, o MTT foi descartado, em seguida adicionou-se 100 µL da solução de isopropanol+HCl 0,04 M, incubou-se “overnight” para descoloração. O sobrenadante foi retirado e transferido para uma placa de 96 poços com fundo chato na qual realizou-se a leitura a no comprimento de onda de 540 nm em leitor de microplacas (BioRad). A concentração de conídios sobreviventes foi determinada a partir dos valores de absorbância obtidos.

### **3.10.11. Microscopia de polarização**

Inoculou-se  $1 \times 10^6$  conídios em placas de petri contendo 2 mL de meio YG e uma lamínula ao fundo. As placas foram incubadas a 37 e 45 °C por 2, 4, 6, e 8 horas. Cada placa foi retirada no seu tempo de incubação e realizou-se a contagem de 100 conídios de cada temperatura através da microscopia de campo claro. Foram considerados conídios com crescimento polarizado aqueles que mostravam protuberância na superfície do esporo alterando sua forma redonda característica indicando a emissão de um tubo germinativo (HARRIS, 1999). Foram analisados 100 germinantes em cada experimento independente e os resultados apresentados representam média  $\pm$  desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes.

### **3.10.12. Crescimento dos conídios de *A. fumigatus* em explantes de pulmão de camundongo**

Para realização deste experimento  $1 \times 10^7$  conídios foram inoculados em explantes de pulmão fresco de camundongos. O tecido pulmonar foi recortado com bisturi e depositado sobre uma placa de petri contendo agarose 1% estéril. Como controle foram utilizadas culturas da linhagem selvagem e mutante *pkcA*<sup>G579R</sup> em placas de Petri contendo o meio YPD. As placas de Petri contendo os pulmões e a placa contendo meio YPD foram incubadas a 37 °C

do mutante *pkcA*<sup>G579R</sup> que codifica o homólogo da proteína quinase C, no fungo patogênico *Aspergillus fumigatus*

por 72 horas e analisadas diariamente. As imagens foram obtidas após 24 horas de crescimento. Os resultados apresentados são representativos de pelo menos três experimentos independentes.

### 3.10.13. Extração de RNA

Os conídios das linhagens que teriam RNA extraído foram crescidos conforme descrito em cada experimento e tratados com droga quando necessário. O micélio foi filtrado a vácuo e imediatamente congelado em nitrogênio líquido para se evitar a degradação do RNA. Para romper a parede celular do fungo, os micélios congelados foram triturados em nitrogênio líquido com auxílio de almofariz e pistilo esterilizados. O RNA foi extraído utilizando-se o reagente Trizol (Life Technologies EUA), segundo as recomendações do fabricante. A integridade do RNA total foi verificada em gel de agarose 1,2% sob condições desnaturantes corado com brometo de etídio e visualizado sob luz UV de acordo com Sambrook e Russel (2001). A presença das bandas intactas correspondentes ao RNA ribossomal 28S e 18S, sendo a intensidade da primeira banda cerca de duas vezes maior que a da segunda, foi utilizado como critério de integridade do RNA total.

Para a utilização nas reações de qPCR, 10 µg de RNA total de cada amostra foram tratados com a enzima Ambion Turbo DNase (Life Technologies, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. O sucesso de tratamentos de todas as amostras de RNA com DNase foi verificado através de PCR em tempo real utilizando como alvo o gene da  $\beta$ -tubulina de *A. fumigatus* (*tubA*), onde verificou-se o sucesso do tratamento através da ausência completa de amplificação das amostras. Após tratadas e validadas, as amostras foram transcritas, utilizando-se o kit High Capacity (Life Technologies), para a obtenção do cDNA usado nas análises de expressão por RT-PCR em tempo real .

### 3.10.14. Extração de DNA

Conídeos das linhagens foram inoculados em meio de cultura completo YG e incubados por aproximadamente 16 horas a 37°C e 180 rpm. Os micélios

obtidos foram coletados por filtração a vácuo e congelados imediatamente em nitrogênio líquido para serem triturados com almofariz e pistilo. Para cada cerca de 40 mg de micélio acrescentou-se 500 µL de tampão de extração de DNA. Adicionou-se em cada amostra, um volume igual de fenol:clorofórmio (1:1) e a mistura foi agitada mecanicamente em vortex por 10 minutos. Para sedimentar as proteínas precipitadas e restantes celulares, as amostras foram centrifugadas a 20800 g por 20 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo de microcentrifuga onde foi adicionado o mesmo volume de clorofórmio para a retirada de resíduos de fenol. As amostras foram centrifugadas a 20800 g por 10 minutos e a fase aquosa superior foi novamente transferida para outro tubo de microcentrifuga onde foi adicionado 900 µL de isopropanol para precipitar o DNA. A amostra foi centrifugada a 20800 g por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi lavado com etanol 70% e centrifugado novamente a 20800 g por 1 minuto. O sobrenadante foi novamente descartado e o resíduo de etanol evaporado a temperatura ambiente por 30 minutos. O sedimento foi ressuspensionado em água Milli-Q estéril e estocado a 4 °C. A integridade das amostras foi verificada através do gel de agarose 1%, e o DNA foi quantificado por espectrofotometria quando necessário (260/280 nm) utilizando-se equipamento NanoVue Plus (GE Helath Care).

### 3.10.15. Análises de PCR em tempo real

A técnica de RT-PCR em tempo real é baseada no monitoramento óptico da fluorescência do produto de PCR ciclo a ciclo e pode ser usada na quantificação da expressão gênica. Alíquotas de cDNA obtidas de acordo com o experimento realizado foram usadas como molde da PCR. Utilizou-se primers construídos especificamente para o gene de interesse utilizando-se o programa Primer Express (Life Technologies). A concentração ideal de primers a ser utilizada em cada reação de RT-PCR em tempo real foi determinada, além dos padrões de eficiência da reação (foram apenas aceitos valores variando entre 95-105%), “slope”, intercepto e desvios de acordo com Bustin et al., 2009. Como controle endógeno (normalizador) utilizou-se primers para amplificação do gene *tubA* de *A. fumigatus* ( $\beta$ -tubulina). A detecção de amplificação em

tempo real foi feita no equipamento Step One Plus (Applied Biosystems) utilizando-se o reagente SyberGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems). A quantificação dos resultados foi realizada conforme descrição do fabricante e se baseia na derivação da fórmula  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (LIVAK, SCHMITTGEN, 2001).

### 3.10.16. Extração de proteínas

Os micélios utilizados para a extração de proteína foram crescidos e tratados conforme as necessidades de cada experimento. Em seguida foram filtrados a vácuo e imediatamente congelados em nitrogênio líquido para evitar a degradação das proteínas. Para romper a parede celular do fungo, os micélios congelados foram triturados em nitrogênio líquido com auxílio de almofariz e pistilo. O extrato proteico total foi extraído com tampão de extração de proteína, adicionado de inibidores de protease (descritos anteriormente) e agitando-se por 10 vezes de 30 segundos com intervalos de 30 segundos em gelo para minimizar a degradação. As amostras foram centrifugadas a 20000 g por 40 minutos a 4 °C para a retirada do material precipitado. O sobrenadante de cada amostra foi congelado e estocado a -80 °C. A integridade da proteína foi verificada através de eletroforese em gel SDS-PAGE 12% e quantificada pelo método colorimétrico de Bradford com reagente comercial (BioRad).

### 3.10.17. Análises de “western blot”

Os extratos brutos proteicos referentes a cada experimento foram submetidos a eletroforese de gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), 12% e tampão Tris-glicina 1x (Método de Laemmli), utilizando-se uma cuba de eletroforese vertical (BioRad). As proteínas foram então transferidas do gel para membrana de PVDF (BioRad) em procedimento de transferência submerso de acordo com o protocolo do fabricante. O bloqueio das membranas de PVDF foi feito com TBST 1x contendo 9% de leite em pó desnatado, por 16 horas a 4 °C. As membranas foram então incubadas com o anticorpo primário na diluição adequada em TBST 1x contendo 3% de leite em pó desnatado, por 16 horas a 4 °C. A membrana foi incubada com anticorpo secundário conjugado em

TBST 1x a temperatura ambiente por 2 horas e a imunodeteção foi realizada através do equipamento de deteção quimioluminescente Chemidoc (Bio Rad).

### 3.10.18. Análise de “southern blot”

Amostras de DNA das linhagens a serem testadas foram digeridas com enzimas de restrição apropriadas de acordo com a estratégia definida e, separadas por eletroforese (100 v por 2-3 horas) em gel de agarose 1% (p/v). O DNA foi então transferido para uma membrana de nylon carregada positivamente (Hybond N+, GE HealthCare). Para isto, o gel foi inicialmente depurinizado em solução de HCl 0,02 M por 15-20 minutos sob leve agitação a temperatura ambiente e colocado em contato com a membrana em uma plataforma para a transferência alcalina que permitia o contato direto entre o gel e a pela solução de NaOH (0,4 M). O sistema de transferência foi mantido “overnight”. No dia seguinte a membrana foi rapidamente lavada em solução salina-citrato 2x concentrada (SSC 2x; 0,3 mol/L NaCl, 0,03 mol/L citrato de sódio), e na sequência ela foi seca sobre papel de filtro. Para a fixação do material que fora transferido, a membrana foi colocada no transiluminador sob ação de luz ultravioleta por 5 minutos de cada lado. Depois foi levada até a estufa de secagem, na temperatura de 80 °C e mantida por 1 hora.

Para a hibridização dos ácidos nucléicos foi utilizado o sistema “AlkPhos Direct Labeling and Detection Systems” (GE Health Care). A membrana fixada foi colocada em 15 mL de solução de hibridização seguindo a constituição descrita pelo fabricante (0,5 mol/L de NaCl dissolvido no tampão de hibridização, 4% (p/v) do reagente de bloqueio). A garrafa contendo a solução e a membrana foi pré-hibridizada no forno de hibridização por 3 horas na temperatura de 60 °C.

Durante esse período foi preparada a sonda utilizada na reação. Para isso, uma solução com a sequência de DNA obtida por PCR e purificada do gel de agarose correspondente a sonda foi ajustada na concentração de 20 ng/μL. 10 μL dessa solução contendo o produto de PCR foram desnaturados por 5 minutos em banho fervente e o material foi deixado por mais 5 minutos no gelo. A esse material foi somado 10 μL de “reaction buffer”, 2 μL de “labelling reagent” e 10 μL do reagente “cross linker” diluído (1:5 em água) de acordo

com as instruções do fabricante. A reação foi posteriormente incubada em banho seco a 37 °C por 30 minutos. A sonda foi adicionada à membrana pré-hibridizada contida na garrafa de hibridização. A hibridização foi mantida overnight por cerca de 16-18 horas no forno de hibridização na temperatura de 55 °C em rotação leve. Após a hibridização a membrana foi lavada com a solução primária na temperatura de 55 °C (uréia 120 g/L, SDS 1 g/L, fosfato de sódio monobásico 50 mM, NaCl 8,7 g/L, MgCl 1 mM, reagente de bloqueio 2 g/L) de acordo com as instruções do fabricante. O procedimento de lavagem foi feito por duas vezes, em cada uma delas durou 10 minutos, dentro do forno de hibridização a 55 °C com rotação leve. Na sequência, a membrana foi lavada com a solução secundária (TRIS base 6,2 g/L, NaCl 5,6 g/L), dessa vez ela foi agitada por cinco minutos em temperatura ambiente por duas vezes.

Feito isso, a membrana foi colocada em uma superfície plana e sobre ela fora aplicado 30 µL/cm<sup>2</sup> do agente de detecção CDP-star (GE Health care) por cerca de 5 minutos para a revelação. Por último a membrana foi encaminhada para revelação autorradiográfica em chassi fotográfico em sala escura utilizando filme fotográfico "Hyperfilm" ECL (GE Health Care). O filme revelado foi escaneado e a imagem obtida processada no Adobe Photoshop para a edição dos painéis.

### **3.10.19. Ensaio de virulência em modelo murino**

O ensaio foi realizado utilizando o modelo murino de baixa dose para aspergilose invasiva (SORIANI et al., 2008). Camundongos fêmeas BALB/c pesando entre 18 a 20 g foram imunossuprimidas pela injeção intraperitoneal de ciclofosfamida (150 mg/Kg de peso corporal; Sigma) nos dias -4, -1, 2, 5, 8, 11 e 14, antes e após a infecção no dia 0. Uma única dose de acetato de cortisona (200 mg/kg de peso corporal) foi injetada de forma subcutânea no dia -1. Cerca de 2x10<sup>4</sup> conídios foram administrados por via nasal para a infecção dos camundongos. A sobrevivência foi monitorada pelo menos duas vezes ao dia, por um período de 16 dias, e animais moribundos foram sacrificados. Esses experimentos foram realizados em colaboração com a Profa. Dra. Marcia Eliana da Silva Ferreira, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP.

---

## **4.0. RESULTADOS**

## 4.0. RESULTADOS

### 4.1. Construção da linhagem *pkcA*<sup>G579R</sup>

Como parte de um programa para identificar genes relacionados à via da integridade da parede celular em *A. nidulans* Hill et al., 2006 realizaram uma triagem de aproximadamente 1100 mutantes obtidos por Harris et al. (1994), que apresentavam defeitos de crescimento a 42 °C. Estes mutantes foram expostos ao CFW, tendo sido observados 10 cepas que apresentavam hipersensibilidade a esta droga. Devido a este perfil de sensibilidade foram nomeadas como *Calc*, dentre estes 10 que apresentavam sensibilidade ao CFW a linhagem denominada *calc2* (HILL et al., 2006) foi caracterizada por Teepe et al., (2006).

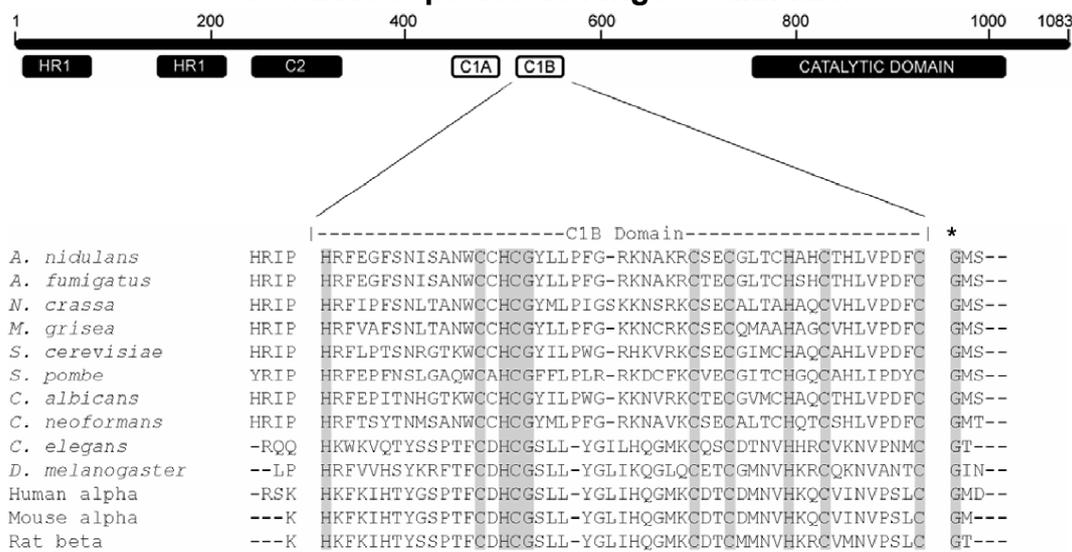
A linhagem *calc2* apresentava uma mutação no domínio de regulação C1B (ver figura 4) da PkcA de *A. nidulans* cujo os fenótipos envolviam alterações relacionadas a manutenção da integridade da parede celular, indicando um papel de PkcA de *A. nidulans* nesta via de transdução de sinal. Em *S. cerevisiae* o domínio C1B de PKC1, interage com a GTPase Rho1 (ver figura 3) para a ativação da cascata de sinalização de MAP quinase em resposta ao dano da parede celular (SCHIMITZ et al., 2001).

Como primeira abordagem para o estudo da função de PkcA em *A. fumigatus* buscou-se o isolamento de um mutante que apresentasse a substituição gênica da glicina por uma arginina no domínio C1B de PkcA de *A. fumigatus*. Essa estratégia foi utilizada inicialmente uma vez que há possibilidade de que *pkcA* seja um gene essencial, conforme ocorre em *A. nidulans* (TEEPE et al., 2006; ICHINOMIYA et al., 2007; COLABARDINI et al., 2010; KATAYAMA et al., 2012). Paralelamente o nosso grupo tem se dedicado em obter informação sobre a essencialidade de *pkcA* em *A. fumigatus*. Esses experimentos estão em andamento.

Inicialmente com o intuito de reproduzir esta mutação para o estudo inicial da função de PkcA em *A. fumigatus* foi necessário verificar se este resíduo de glicina da região C1B da PkcA de *A. nidulans* era conservado em *A. fumigatus*.

Através do alinhamento realizado por Teepe et al., 2006, (Figura 5) foi possível observar que esta sequência era conservada em *A. fumigatus*, o que possibilitou a construção do mutante denominado *pkcA*<sup>G579R</sup> para uma caracterização inicial da função da PkcA neste organismo.

**Figura 5: Alinhamento múltiplo da sequência de PkcA (AN0106) de *A. nidulans* para comparação de sequências do domínio C1B entre PKCs de várias espécies de fungos e animais.**



**\* C1B: Cysteine rich domain B**

Os resíduos conservados estão sombreados em cinza. O resíduo de glicina conservado, que é substituído por arginina na mutação *calc2* está indicado por um asterisco. A sequência completa de PkcA de *A. nidulans* está relatada em Herrmann et al. (2006). Em *A. fumigatus* o gene *pkcA* é codificado pela ORF Afu5g11970.

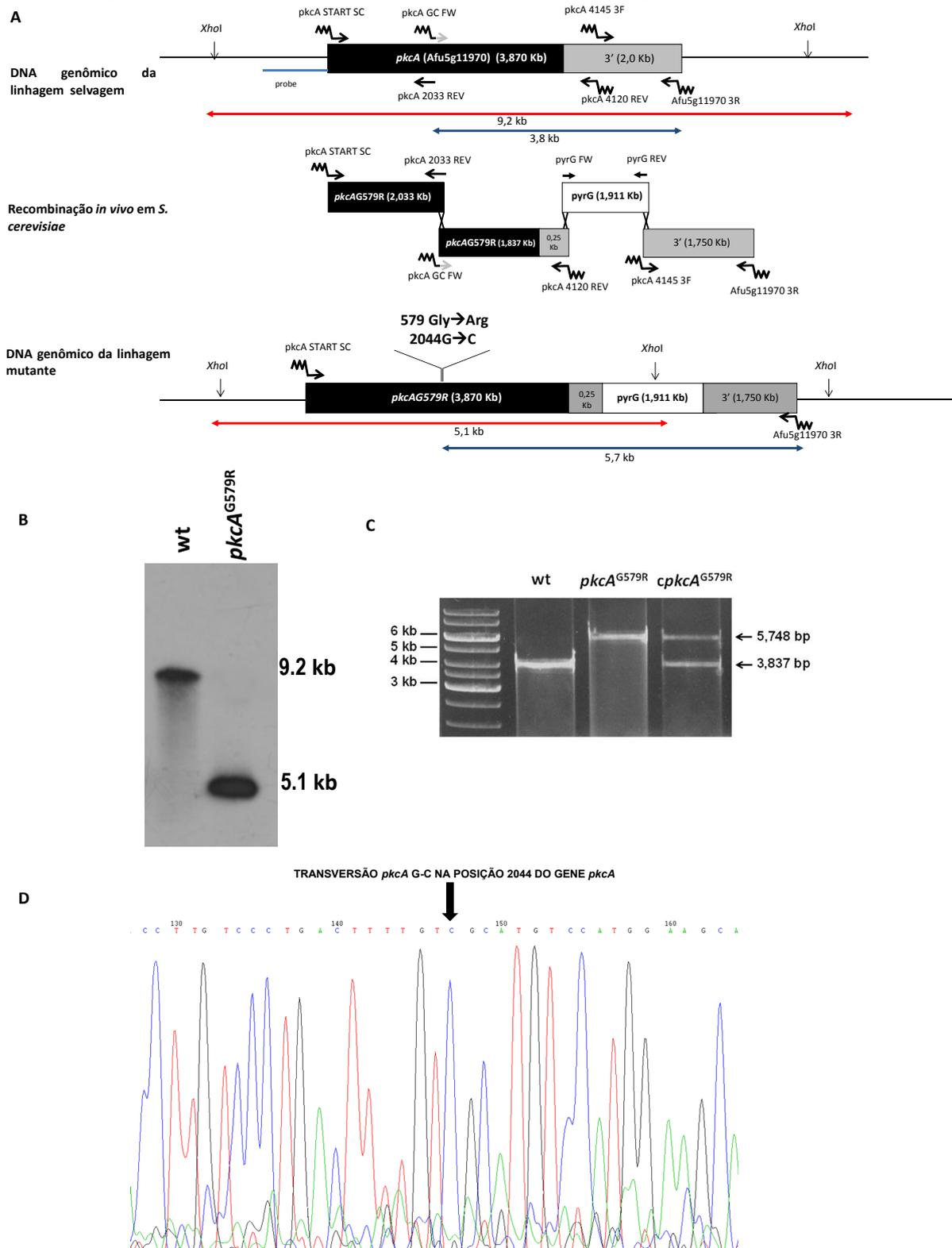
Para a construção do cassete de substituição gênica contendo mutação pontual G579R utilizou-se a técnica de recombinação *in vivo* em *S. cerevisiae*. Para isso, o primer contendo a mutação pontual *pkcA* GC FW que hibridiza na posição 2044 do gene *pkcA* de *A. fumigatus* foi utilizado para a realização da PCR que gerou um fragmento de 1,837 Kb correspondendo a porção 3' do gene *pkcA*. Adicionalmente, 250 pb da região terminadora do gene foram mantidos antes da inserção do marcador *pyrG* na construção do cassete (figura 6A). A região 3' foi amplificada com os primers *pkcA* 4145 3F e Afu5g11970 3R (1,7 Kb) de forma a possuir em suas extremidades homologia para a região *pyrG* e para o plasmídeo pRS426. A região inicial do gene foi amplificada através dos primers *pkcA* START SC e *pkcA* 2033 REV, amplificando um fragmento de 2,0 Kb, demonstrado na figura 6A. Os quatro

fragmentos independentes foram transformados em *S. cerevisiae* e recombinados “in vivo” (MALAVAZI; GOLDMAN, 2012).

Para o isolamento do plasmídeo contendo o cassete de substituição gênica pRS426::*pkcA*<sup>G579R</sup> o DNA genômico foi extraído e eletrotransformado na linhagem DH10B de *Escherichia coli* para propagação do DNA plasmidial. O plasmídeo pRS426::*pkcA*<sup>G579R</sup> obtido foi sequenciado na íntegra para a confirmação de que a transversoão G→C ocorreu na posição correta e não houve a inserção de outra mutação (dados não apresentados). A Figura 6D mostra o cromatograma de sequenciamento demonstrado a região da mutação G→C. O DNA plasmidial pRS426::*pkcA*<sup>G579R</sup> foi posteriormente usado como molde para a amplificação do cassete de substituição gênica o qual foi transformado na linhagem  $\Delta$ KU80 *pyrG*- de *A. fumigatus*.

As linhagens candidatas a transformantes de *A. fumigatus* tiveram seu DNA genômico extraído, e foram exaustivamente testadas através da técnica de PCR para a triagem dos transformantes (dados não mostrados). Após esta etapa, alguns transformantes foram validados através da técnica de “southern blot”, como pode ser observado na figura 6B. Para a obtenção da linhagem complementante, o gene *pkcA* íntegro contendo 1000 pb de regiões flanqueadoras foi reinserido ectopicamente no genoma da linhagem mutante *pkcA*<sup>G579R</sup>. A reinserção de *pkcA* foi confirmada através de PCR diagnóstica (figura 6C) utilizando os primers identificados por setas azuis na figura 6A.

**Figura 6: Mutação e complementação da linhagem *pkcA*<sup>G579R</sup>.**



**A-** A linhagem *Afu293* foi utilizada para a amplificação dos fragmentos independentes amplificados utilizando-se os primers destacados. A região inicial do gene *pkcA* de 2,033 Kb foi amplificada utilizando os primers *pkcA* START SC e *pkcA* 2033 REV. A mutação pontual na posição 2044 do gene *pkcA* foi realizada com o primer *pkcA* GC FW que continha a base mutada G→C. O primer *pkcA* 4120 REV foi utilizado juntamente a este para a amplificação de 1,837 Kb do gene juntamente de forma a conter 0,25 Kb da região 3' do gene para que a porção terminadora fosse mantida. O marcador auxotrófico *pyrG* de *A. fumigatus* foi

do mutante *pkcA*<sup>G579R</sup> que codifica o homólogo da proteína quinase C, no fungo patogênico *Aspergillus fumigatus*

amplificado com os primers *pyrG* FW e *pyrG* REV a partir do plasmídeo pCDA21, e a região 3' do gene correspondendo a um fragmento de 1,750 Kb foi amplificada utilizando-se os primers *pkcA* 4145 3F e Afu5g11970 REV. Os fragmentos amplificados foram unidos através da técnica de recombinação *in vivo* em *S. cerevisiae* para a obtenção do cassete de substituição gênica contendo a mutação. Este foi propagado em *E. coli* e posteriormente transformado em *A. fumigatus*. As duplas setas vermelhas representam a estratégia de “Southern-blot” utilizada para confirmação da obtenção da linhagem mutada de *A. fumigatus*. As duplas setas azuis representam a estratégia de PCR utilizada para a confirmação da linhagem complementante. **B-** Autorradiografia mostrando o resultado do “Southern blot” para confirmação do mutante *pkcA*<sup>G579R</sup>. O DNA genômico da linhagem selvagem e *pkcA*<sup>G579R</sup> foram digeridos com a enzima *Xho*I. A região utilizada como sonda está demonstrada por uma linha azul na figura 6A. No primeiro poço à esquerda está mostrado o fragmento de tamanho esperado para a linhagem selvagem de 9,2 kb, ao lado no segundo poço, observa-se o fragmento da linhagem mutada que também obteve o valor esperado de 5,1 kb. **C-** Gel de agarose contendo o resultado da PCR realizada para a confirmação da complementação da linhagem *pkcA*<sup>G579R</sup>. Para a confirmação DNA's genômicos das linhagens foram amplificados com o primer *pkcA* GC FW e Afu5g11970 REV. No segundo poço observa-se a banda esperada para a amplificação da linhagem selvagem de 3,873 Kb, no terceiro poço do gel observa-se a banda de 5,748 Kb, e no quarto poço observa-se as duas bandas esperadas na linhagem complementante 3,873 Kb que corresponde ao gene *pkcA* íntegro e a banda de 5,748 Kb que corresponde ao locus *pkcA* mutado na linhagem *pkcA*<sup>G579R</sup>. **D-** Cromatograma do sequenciamento do plasmídeo contendo o cassete de substituição gênica com a mutação que compreende uma transversoão G2044C. A seta indica a mutação de base na posição 2044 do gene *pkcA*.

## 4.2. Localização subcelular da proteína PkcA de *A. fumigatus*

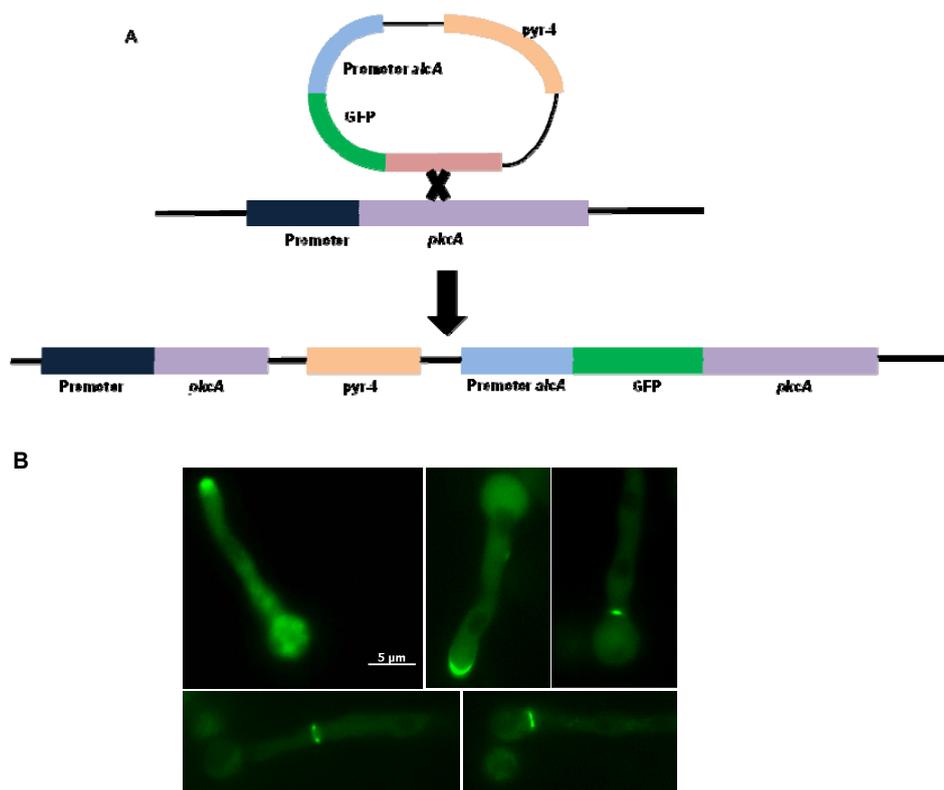
Para determinar a localização subcelular da proteína PkcA de *A. fumigatus* um mutante condicional foi construído. Utilizou-se o vetor pMCB17apx que contém o promotor do gene da álcool desidrogenase de *A. nidulans* (*alcA*) fusionado com a proteína fluorescente verde (GFP). Esse plasmídeo permite a fusão N-terminal do gene de interesse sob o controle do promotor *alcA* (figura 7A) (ROMERO et al., 2003).

Para a construção, o vetor pMCB17apx foi digerido com as enzimas de restrição *Pac*I e *As*cI deste modo permitindo a ligação com a sequência de 2,0 Kb do gene amplificado com primers *pkcA* *As*cI FW e *pkcA* 2000 *Pac*I REV que continham os sítios de restrição *As*cI e *Pac*I.

O experimento de localização subcelular da PkcA *A. fumigatus* foi traçado de forma a obter maiores informações sobre a função desta. Para tanto, essa linhagem foi crescida durante 16 horas a 30 °C em condições de indução, isto é, utilizando o MM + glicerol 2% + etanol 2% (WARING, 1989) em “glass botton dishes” e observada em microscópio de fluorescência invertido Z1 (Zeiss, Alemanha). O resultado deste experimento encontra-se relatado na figura 7B que demonstra que a *pkcA* de *A. fumigatus* está localizada na ponta da hifa e no citoplasma. Em *A. nidulans* PkcA está localizada no septo e na

ponta da hifa, em *S. cerevisiae* Pkc1p também está localizada no local de crescimento polarizado (ADREWS e START, 2000).

**Figura 7: Construção da linhagem *alcA::pkcA::GFP* e análise da localização subcelular da *pkcA* de *A. fumigatus***



A construção do cassete da *alcA::pkcA::GFP* foi realizada através da clonagem de 2000 pb da região 5' do gene *pkcA* no vetor pMCB17apx que contém o promotor do gene da álcool desidrogenase I de *A. nidulans* (*alcA*) fusionado com a proteína verde fluorescente (GFP). O vetor contém o gene *pyr-4* de *N. crassa* como marcador auxotrófico. Para a construção, uma sequência 2000 pb da região 5' gene *pkcA* foi amplificada com primers que continham sítio para as enzimas de restrição *PacI* e *Ascl* a partir do DNA genômico da linhagem *Afu293*. O material amplificado foi digerido com as enzimas *PacI* e *Ascl* para a clonagem unidirecional do vetor pMCB17apx previamente digerido com estas mesmas enzimas. Após a ligação o plasmídeo obtido foi eletrotransformado em *E. coli* DH10B, e o clone positivo foi transformado em *A. fumigatus*. **B-** Conídios da linhagem *alcA::pkcA::GFP* foram crescidos durante 16 horas em meio mínimo para *A. fumigatus* contendo glicerol 2% e etanol 2% a 30 °C em "glass bottom dishes" e observadas em microscópio de fluorescência invertido Observer Z1 (Zeiss, Alemanha) usando uma objetiva de 100x de imersão em óleo. As imagens de fluorescência foram capturadas com filtro GFP HE (High Efficiency 38, Zeiss) em 470/40 nm para excitação e 525/50 nm para emissão. As imagens em campo claro foram capturadas sob contraste diferencial de intensidade (DIC). As imagens foram capturadas com uma câmera AxioCam (Zeiss) e processadas com o software AxioVision (Zeiss) e Adobe Photoshop® para a montagem dos painéis.

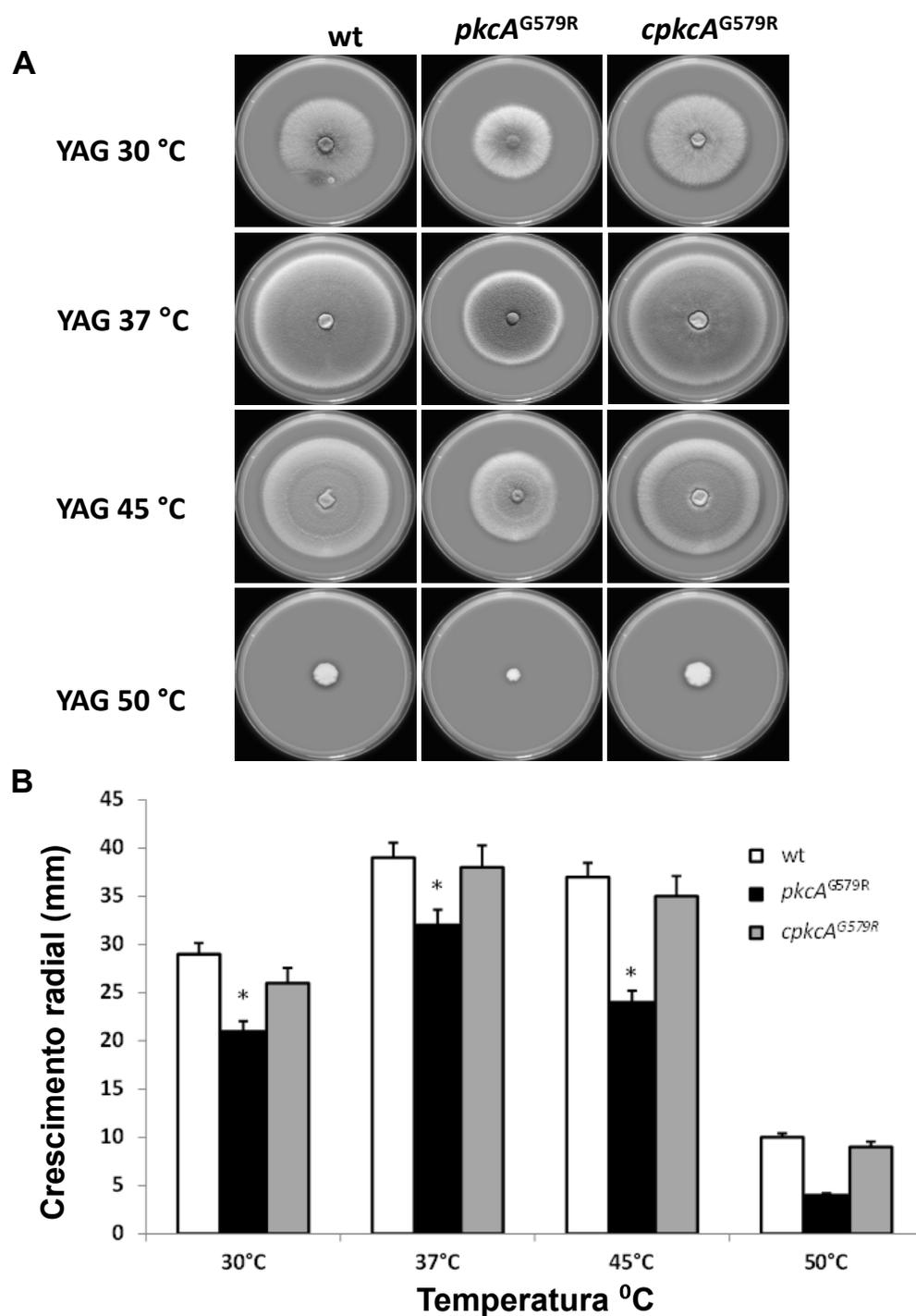
### 4.3. Caracterização fenotípica do mutante *pkcA*<sup>G579R</sup> em *A. fumigatus*

#### 4.3.1. Análise do crescimento radial

A análise do crescimento radial dos mutantes isolados foi realizada no intuito de avaliar possíveis defeitos de crescimentos vegetativo do mutante bem como a interferência da temperatura na taxa de desenvolvimento vegetativo nas linhagens produzidas. Com isto buscou-se verificar se PkcA estaria relacionada a termotolerância, que é uma característica importante apresentada por *A. fumigatus* e, inclusive, descrita como um dos principais determinantes de patogenicidade desse organismo (RHODES, 2006).

A exposição das linhagens as temperaturas de 30, 37, 45 e 50 °C permitiu a observação dos fenótipos produzidos por cada uma das linhagens testadas (figura 8A). As diferenças de crescimento radial foram quantificadas e mostradas na figura 8B. Na temperatura de 30 °C observa-se a redução da conidiação da linhagem mutada, que possui também redução do crescimento radial. Esta redução do crescimento radial é observada na linhagem mutada em todas as temperaturas testadas, de forma que esta vai aumentando de forma significativa juntamente ao aumento da temperatura.

**Figura 8:** A linhagem *pkcA*<sup>G579R</sup> de *A. fumigatus* apresenta redução do crescimento radial em relação a linhagem selvagem de *A. fumigatus*



(A)  $1 \times 10^5$  esporos de cada linhagem foram inoculados em placa de Petri contendo meio completo YG sólido (YAG). As 3 placas de cada linhagem foram incubadas em cada uma das temperaturas testadas (30, 37, 45 e 50 °C) por 72 horas. (B) O diâmetro do crescimento das linhagens foi quantificado em todas as temperaturas de incubação a cada 24 horas de crescimento, e posteriormente submetido a análise estatística (teste T de Student). Foram consideradas significativas as diferenças observadas com p valor < 0,05.

#### 4.3.2. Ensaio fenotípicos do mutante *pkcA*<sup>G579R</sup> frente a agentes que causam estresse de parede celular em *A. fumigatus*

A parede celular está relacionada à resistência de agentes estressores e drogas quimioterápicas em *A. fumigatus* (VALIANTE et al., 2008). Assim, a linhagem selvagem, mutante e complementante foram expostas a alguns destes agentes e drogas com o intuito de entender a função da PkcA na manutenção da integridade da parede celular em *A. fumigatus*.

Os testes foram realizados em placas de Petri contendo meio completo sólido YG na presença e ausência dos agentes testados. Dentre as drogas testadas uma destas foi a cafeína. Esta é um análogo da purina, que provoca efeitos pleiotrópicos que conduzem a morte celular por um mecanismo ainda não totalmente elucidado em fungos (KURANDA et al., 2006). Devido a sua semelhança química com a purina, esta tem sido investigada devido ao seu potencial mutagênico em bactérias e fungos, sendo que em altas concentrações ela pode induzir a apoptose. Esta droga também induz a uma rápida fosforilação da Mpk1p ativada por Pkc1p em *S. cerevisiae*, sendo então neste organismo relacionada a ativação da via de integridade da parede celular (KURANDA et al., 2006). Esta droga foi testada em diversas concentrações, porém a linhagem mutante apresentou sensibilidade equiparada à linhagem selvagem (figura 9).

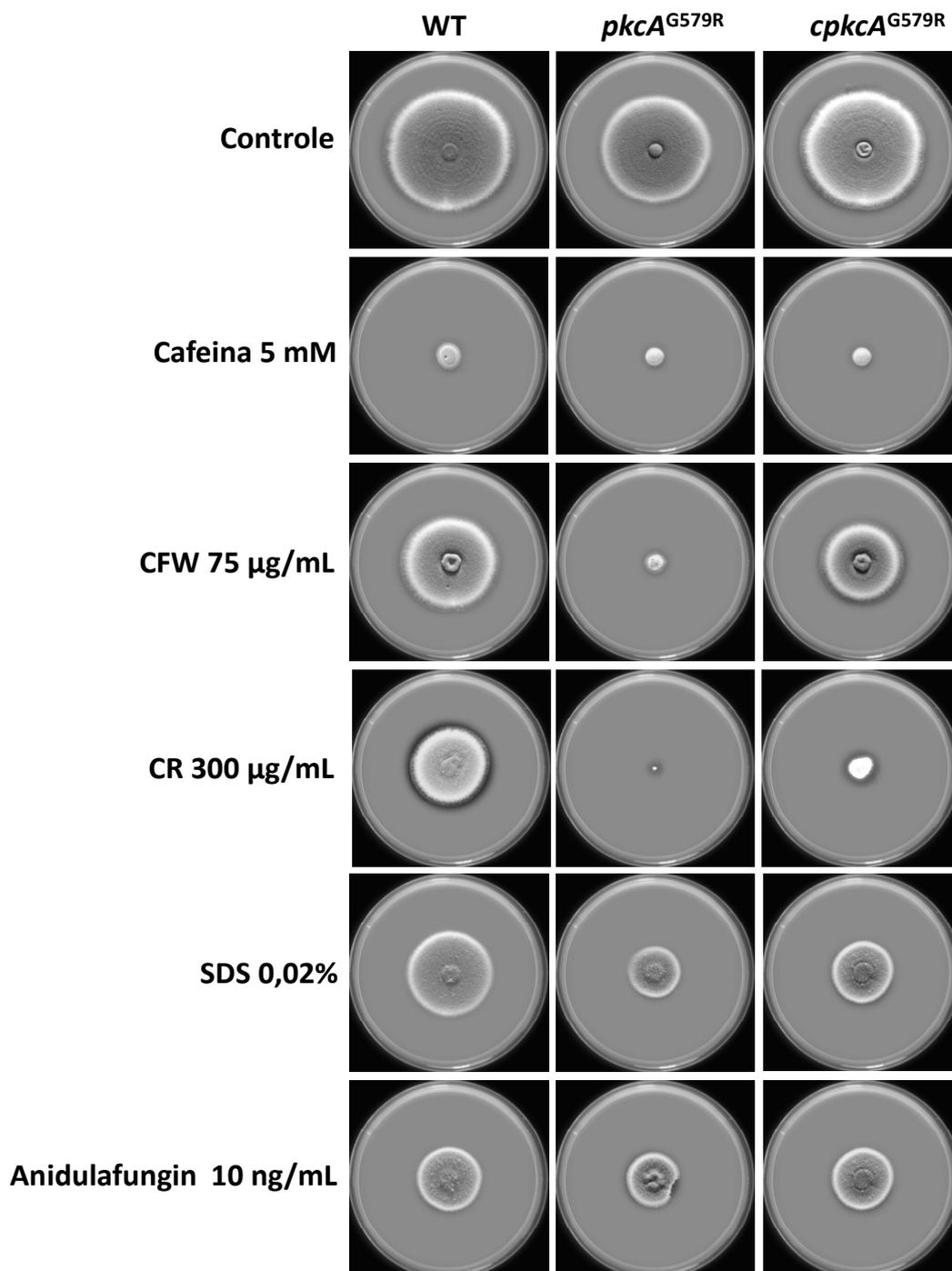
Agentes classicamente usados para identificar a sensibilidade de mutantes com alteração na via da integridade da parede celular são o CFW e o CR. Ambos os compostos possuem dois grupos de ácido sulfônico, de tal forma que exercem sua atividade somente quando estão solubilizados em condições ligeiramente básicas ou neutras, quando um dos seus grupos de ácido sulfônico se torna negativamente carregado (RONCERO et al., 1988). Em fungos CFW e CR se ligam preferencialmente nas quitinas, interferindo a montagem da parede celular. Estes, ao se ligarem as quitinas impedem a ligação de  $\beta$ -1,3 glucana e  $\beta$ -1,6 glucana. Como resultado, a parede celular se torna enfraquecida. A presença de CFW ou CR também resulta em inchaço ou lise de pontas de hifas de fungos filamentosos como *A. niger* resultando no enfraquecimento na parede e alteração da pressão interna de turgescência

(RAM e KLIS, 2006). Na figura 9 observa-se o aumento da susceptibilidade da linhagem *pkcA*<sup>G579R</sup> a estes agentes.

O dodecil sulfato de sódio (SDS) é um detergente, a sua ação na célula fúngica ainda não está totalmente elucidada (VALIANTE et al., 2008). Com intuito de verificar se a parede celular estaria mais susceptível a ação detergente do SDS na linhagem mutada, as linhagens foram expostas a quantidades crescentes de SDS. Um aumento sutil da susceptibilidade a este agente na linhagem mutada pode ser observado na figura 9.

As equinocandinas semi-sintéticas (por exemplo, caspofungin e anidulafungin) possuem como alvo a parede celular fúngica através da inibição da síntese de  $\beta$ -1,3 glucana. Essas drogas induzem a alteração na morfologia e nas propriedades de crescimento devido à formação deficiente da parede celular, e demonstram potentes valores de CIM em coorte epidemiológicos (PERLIN, 2011). As linhagens foram testadas em meio sólido YG com a equinocandina anidulanfungim, onde observou-se que a mutação G579R em *A. fumigatus* promoveu um sutil aumento da sensibilidade a esta droga como pode ser observado na figura 9.

**Figura 9: Teste de sensibilidade do mutante *pkcA*<sup>G579R</sup> a diferentes drogas que causam estresse da parede celular**

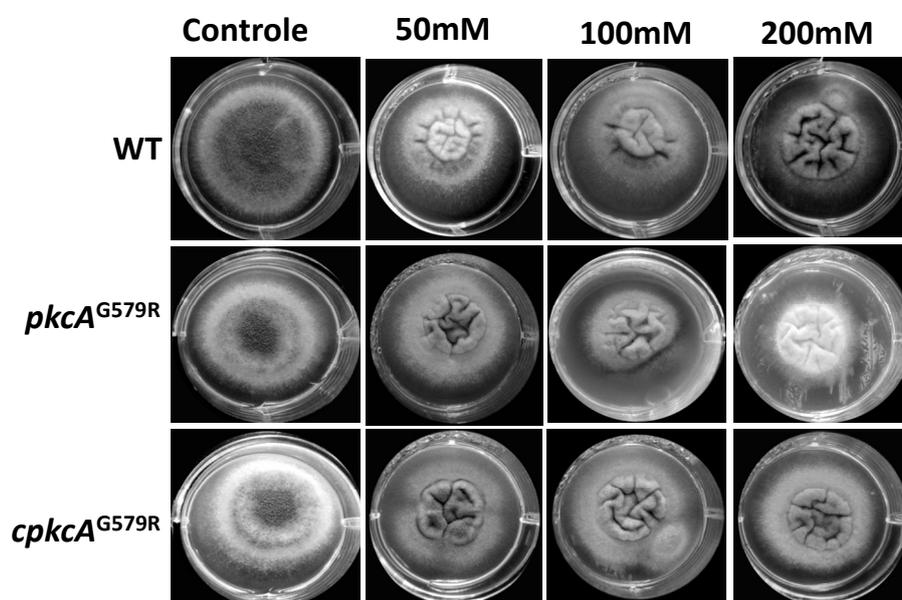


1x10<sup>5</sup> esporos das linhagens foram inoculados no centro da placa contendo o meio sólido completo YG, na presença das drogas nas concentrações indicadas. As placas foram incubadas a 37 °C por 72 horas. A maior sensibilidade do *pkcA*<sup>G579R</sup> frente aos agentes testados sugere que o gene *pkcA* está envolvido na manutenção da integridade da parede celular em *A. fumigatus*.

A nikkomicina Z é uma droga que promove a inibição da síntese de quitina atuando como análogo competitivo do substrato UDP-N-acetilglucosamina no sítio catalítico (GANESAN et al., 2004). A quitina

é um componente importante para a formação da parede celular em *Aspergillus ssp.* (VERWER et al., 2012). Como um teste para verificarmos se a mutação *pkcA*<sup>G579R</sup> estaria causando uma maior sensibilidade a esta droga, as linhagens foram cultivadas na presença deste agente onde foi possível verificar que a mutação promoveu um leve aumento da sensibilidade de *A. fumigatus* a nikkomicina Z, como pode ser observado na figura 10, podendo-se relacionar PkcA como sendo um dos ativadores das enzimas de biossíntese de quitina em *A. fumigatus*.

**Figura 10: A mutação *pkcA*<sup>G579R</sup> promove aumento da sensibilidade a nikkomicina Z em *A. fumigatus***



1x10<sup>5</sup> conídios das linhagens foram inoculados em placa de 24 poços contendo meio sólido completo YG na presença das concentrações indicadas de nikkomicina Z a 37 °C por 24 horas.

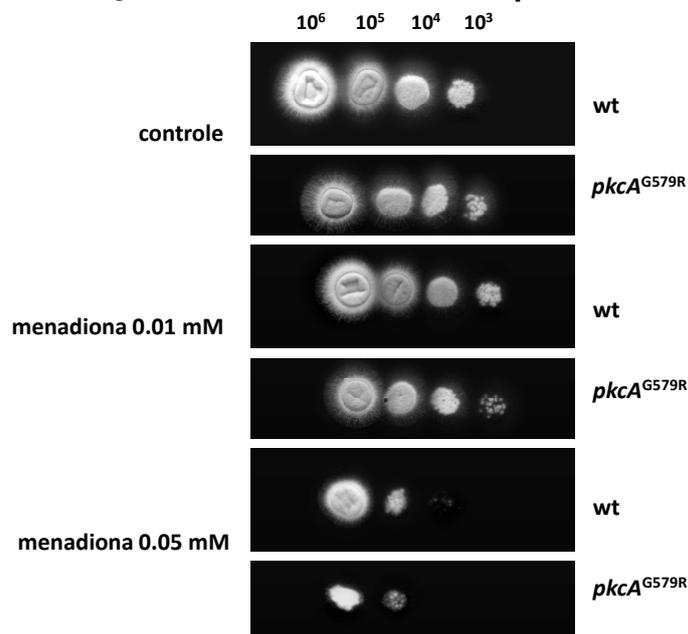
#### 4.3.3. Ensaio de sensibilidade dos mutantes frente às drogas que causam estresse oxidativo

O sítio de infecção de *A. fumigatus* no hospedeiro humano é o pulmão. Ao se instalar neste órgão o fungo irá ativar respostas de imunidade inata, desencadeando um mecanismo de inflamação (HORN et al., 2012; LESSING et al., 2007). Esse processo inflamatório desencadeado pela infecção gera um ambiente dominado por radicais livres e espécies reativas do oxigênio (EROs), obrigando o patógeno a se adaptar nesse ambiente para sua sobrevivência e invasão dos tecidos do hospedeiro (LESSING et al., 2007). De tal forma, a

resistência ao estresse oxidativo é fundamental para a colonização deste patógeno no sítio de infecção. Devido à importância da tolerância a EROs pelo *A. fumigatus*, as linhagens foram inoculadas com diferentes agentes oxidantes para que se pudesse verificar se PkcA estaria envolvida no processo de depuração do estresse oxidativo em *A. fumigatus*.

Inicialmente, as linhagens foram expostas à menadiona, esta é naftoquinona e, portanto, esta molécula pode ser reduzida através das enzimas, microsossomais NADPH-citocromo e P-450 redutase, ou pelas NADH ubiquinona oxidorreductase mitocondriais, neste caso levando a formação do radical semiquinona. Em condições aeróbicas, o radical semiquinona participa no ciclo redox para gerar espécies reativas de oxigênio (EROs), como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (CASTRO et al., 2008). O resultado do teste desenvolvido com esta droga pode ser observado na figura 11. Os resultados obtidos demonstram que possivelmente a PkcA parece estar envolvida no processo de depuração do estresse oxidativo causado por essa droga uma vez que a linhagem mutada foi sutilmente mais sensível à sua ação.

**Figura 11: A linhagem mutada *pkcA*<sup>G579R</sup> de *A. fumigatus* apresenta maior susceptibilidade a ação do estresse oxidativo provocado pela menadiona**

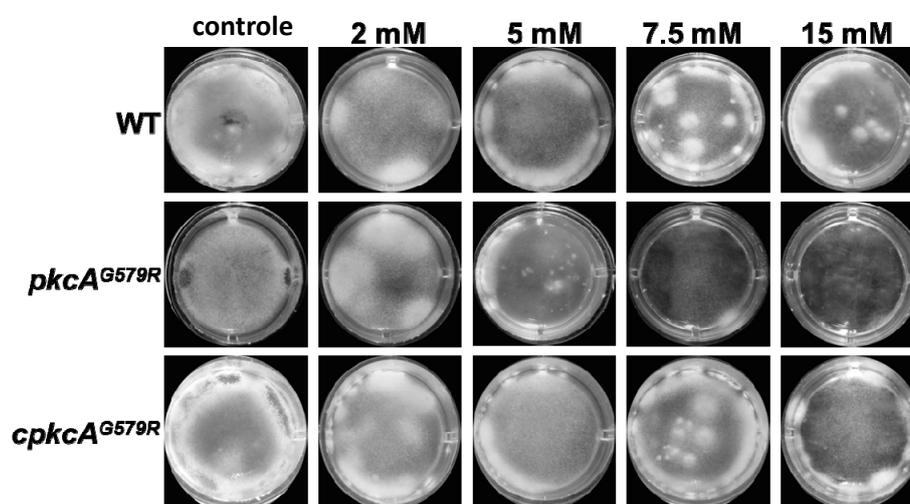


A determinação da sensibilidade das linhagens a menadiona foi realizada através da técnica de “drop out”. Diluições seriadas da suspensão de esporos ( $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$  e  $1 \times 10^3$ ) de cada linhagem foram inoculadas em placa de Petri contendo meio completo YG com as concentrações de menadiona determinadas. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Observa-se que a linhagem *pkcA*<sup>G579R</sup> possui uma maior sensibilidade a ação da menadiona. Os ensaios realizados em experimento de crescimento radial forneceram os mesmos resultados (dados não apresentados).

O papel da PkcA frente a resistência ao estresse oxidativo de *A. fumigatus* também foi testado com a droga paraquat. O paraquat é um cátion formado por dois anéis de pirimidina, os quais possuem uma amina quaternária, que torna a molécula positivamente carregada. Esta droga atua no ciclo redox com forte potencial de redução ( $E_0 = -0,446$  V), assim restringindo sua interação com fortes compostos redutores. Desta forma, o dicátion de paraquat (2+) aceita um elétron redutor e é transformado em monocátion (1+), consequentemente ele é capaz de reagir com oxigênio e produzir por fim, o radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ) (LASCANO et al., 2012). Ainda há controvérsias quanto ao local de formação dos radicais liberados pelo paraquat, microssoma ou mitocôndria. Em ambas as hipóteses, de alguma forma o NADH e o NADPH estão envolvidos da redução e oxidação deste composto, o que resulta a liberação dos radicais.

A linhagem *pkcA*<sup>G579R</sup> possui maior susceptibilidade ao estresse oxidativo gerado pelo paraquat, como pode ser observado na figura 12.

**Figura 12: Análise da sensibilidade do mutante *pkcA*<sup>G579R</sup> ao estresse oxidativo provocado por paraquat**



1x10<sup>5</sup> conídios das linhagens foram inoculadas em meio completo YG líquido em placa de 24 poços e acrescentou-se a droga paraquat nas devidas concentrações. As placas preparadas foram incubadas a 37 °C por 48 horas. Na linhagem mutante (*pkcA*<sup>G579R</sup>) não é possível observar crescimento a partir da concentração de 7,5 mM.

A maior susceptibilidade ao estresse oxidativo provocado pela menadiona e o paraquat da linhagem *pkcA*<sup>G579R</sup> sugerem que PkcA está relacionada a algum mecanismo de resistência ao estresse oxidativo neste patógeno. Entretanto até o momento não é possível definir se este é um efeito direto ou indireto da função de PkcA.

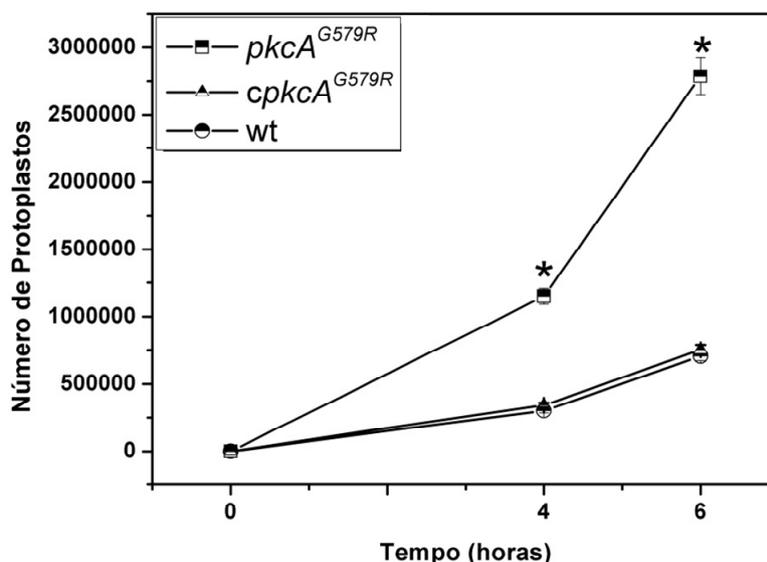
#### 4.3.4. Análise da protoplastização em *A. fumigatus*

A remoção enzimática da parede celular leva à formação de protoplastos esféricos e à perda do crescimento polarizado. No entanto, se houver nova deposição de parede celular o eixo polarizado se restabelece (DOONAN, 1992). A indução do estado de protoplastos nestes germinantes é um evento necessário e utilizado para as transformações em *A. fumigatus*. A alteração na formação da parede celular em *A. fumigatus* pode alterar a remoção enzimática da parede celular neste patógeno. Sendo a PkcA provavelmente a ativadora da cascata de MAP quinase na via da integridade da parede celular de *A. fumigatus*, é provável que a mutação nesta proteína altere a composição da

parede celular resultando na alteração da remoção enzimática da parede celular neste patógeno.

Com o intuito de verificar se haveria uma alteração na capacidade da formação de protoplastos em *A. fumigatus* os micélios da linhagem selvagem, mutante e complementante foram submetidos a digestão enzimática da parede celular através da utilização do mix de enzima composto por glucanases e pectinases de *Trichoderma sp.* e *A. niger* (Lallzyme™). Uma alíquota desta reação foi retirada a cada 2 horas em um intervalo de 6 horas de incubação, e os protoplastos obtidos em cada linhagem testada neste intervalo foram quantificados em câmara de Neubauer. De tal forma foi possível observar que a linhagem mutante *pkcA*<sup>G579R</sup> possui uma capacidade de 73,7% e 74,7% de protoplastização maior a linhagem selvagem após 4 e 6 horas de reação, respectivamente, como pode ser observado na figura 13.

**Figura 13: O mutante *pkcA*<sup>G579R</sup> possui aumento da capacidade de protoplastização em *A. fumigatus*.**



100 mg de micélio crescido durante 16 horas em meio completo líquido YG a 37 °C a 180 rpm foram incubados com Lallzyme™ (0,3%), numa reação de 50 mL durante 0, 4 e 6 horas de incubação na temperatura de 30 °C a 90 rpm. Protoplastos de cada tempo foram quantificados através da contagem em câmara de Neubauer. O experimento foi realizado em triplicata e os resultados apresentados representam médias  $\pm$  desvios padrões de pelo menos três experimentos independentes. Foram consideradas significativas as diferenças observadas com  $p$  valor  $< 0,05$ .

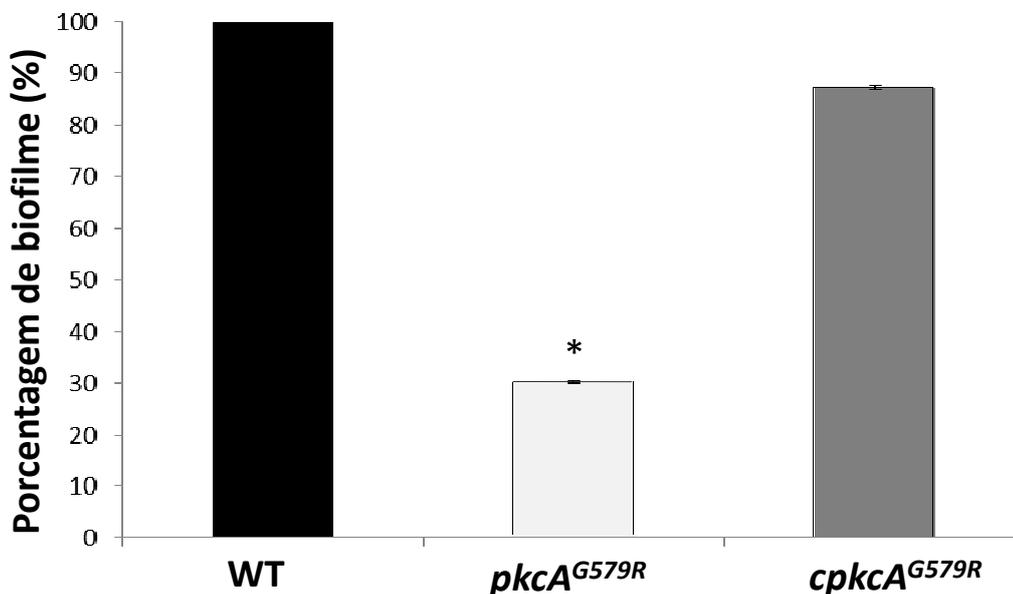
#### 4.3.5. Análise do primeiro estágio de formação de biofilme em *A. fumigatus*

O biofilme se trata de uma comunidade de microorganismos associados e firmemente aderidos a uma superfície por meio de uma matriz extracelular de polímeros (substâncias de cadeia longa). Esta matriz é permeada por canais que permitem a passagem de substâncias, colocando os microorganismos ali presentes em contato com o ambiente mais externo. Uma das vantagens dos biofilmes é que, ao comparar microorganismos de vida solitária com aqueles vivendo em biofilmes, estes últimos apresentam maior resistência a estresses biológicos, químicos e físicos. Uma consequência disso é o baixo sucesso no uso de antibióticos e biocidas contra microorganismos infecciosos quando estes estão organizados na forma de biofilme. Para uma revisão detalhada ver Muszkieta et al., (2013).

Embora os padrões de formação de biofilmes por diferentes organismos sejam similares, em fungos filamentosos o padrão da formação deste ainda é desconhecido. Fanning e Mitchell (2012) propuseram um modelo da formação de biofilme nestes microorganismos que é dividido em 6 estágios que vão da formação inicial de biofilme que compreende a adesão dos esporos ou fragmentos de hifas em uma superfície, até o estágio de dispersão, no qual são liberados esporos ou fragmentos do biofilme, que atuam como novos propágulos, podendo dar origem a novos biofilmes. A parede conidial é pigmentada por hidrofobinas denominadas “rodlets”, estas dentre outras funções em *A. fumigatus* estão relacionadas à adesão (FANNING e MITCHELL, 2012).

Sendo a parede celular o suporte para estas moléculas relacionadas à adesão (BENARD e LATGÉ, 2001; LATGÉ, 2005) em *A. fumigatus* e PkcA uma das possíveis proteínas relacionadas à via da integridade da parede celular neste patógeno, buscou-se investigar se a perda parcial da função de *pkcA* no mutante *pkcA*<sup>G579R</sup> poderia estar causando alguma alteração na adesão de *A. fumigatus*. Para isto, a capacidade da formação inicial de biofilme nas linhagens foi quantificada pelo ensaio de adesão em placas de poliestireno. Foi observada uma redução da capacidade de formação de biofilme na linhagem *pkcA*<sup>G579R</sup> como mostrado na figura 14.

**Figura 14: A linhagem *pkcA*<sup>G579R</sup> de *A. fumigatus* possui redução na capacidade da formação inicial de biofilme em placas de poliestireno**

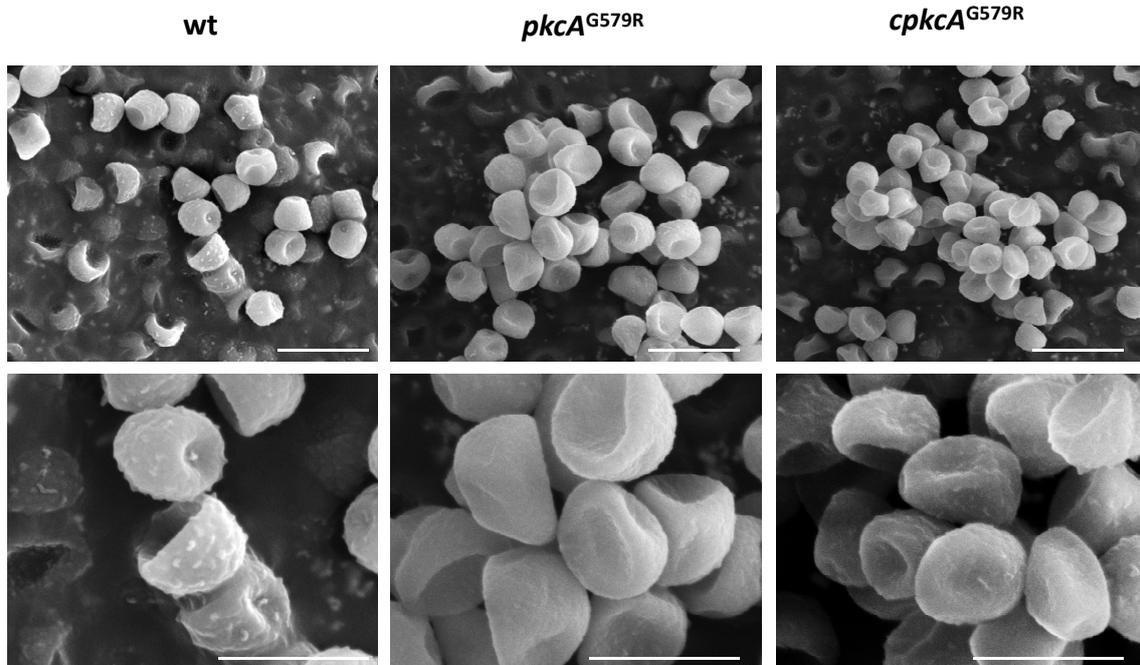


100  $\mu$ L de meio completo YG líquido foi inoculado com  $2 \times 10^4$  conídios de cada linhagem em placa de poliestireno de 96 poços. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 horas. O meio líquido foi removido e as placas foram lavadas 4 vezes com PBS 1x. 150  $\mu$ L da solução de violeta cristal a 0,5% foram adicionados para corar o material residual aderido nos poços, e descoradas em etanol a 95%. A densidade de biofilme foi medida pela determinação da absorbância da solução de descoloração a no comprimento de onda de 570 nm, utilizando um leitor de microplacas. O experimento foi realizado em triplicata e os resultados apresentados representam médias  $\pm$  desvios padrões de pelo menos três experimentos independentes. Foram consideradas significativas as diferenças observadas com p valor < 0,05.

Há diferenças estruturais na composição da parede celular de conídios e da fase filamentosa (hifa) do *A. fumigatus*. A parede conidial é pigmentada e apresenta uma superfície altamente hidrofóbica. Esta característica é conferida pela presença de melanina e de proteínas denominadas hidrofobinas (BENARD e LATGÉ, 2001; LATGÉ, 2005). As hidrofobinas de classe I, com baixo peso molecular (10 a 20 kDa) estão organizadas na superfície dos conídios de *A. fumigatus* formando uma estrutura denominada de “rodlet” (GIRARDIN et al.,1999). Esta estrutura é característica dos conídios “dormentes”. Estas podem estar envolvidas em várias funções, como adesão a células do hospedeiro, proteção contra agentes químicos, enzimáticos e células fagocíticas e, além disso, facilitam a dispersão dos conídios por correntes de ar (DAGUE et al., 2008). Dessa forma, para se verificar a arquitetura da parede externa dos conídios e, com o intuito de verificar possíveis alterações na distribuição dos “rodlets” conídios da linhagem selvagem e mutante *pkcA*<sup>G579R</sup>

foram analisados por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os resultados mostraram uma redução na distribuição de “rodlets” no mutante *pkcA*<sup>G579R</sup> em relação a linhagem selvagem e complementante como pode ser observado na figura 15.

**Figura 15: Análise da superfície dos conídios através de MEV**



Os conídios foram crescidos em meio completo sólido YG por 48 horas, em seguida coletados através de uma fita de carbono, fixados no porta amostra metálico e recobertos por sputtering com uma fina camada de ouro, para posterior análise no microscópio eletrônico de varredura (Inspect S 50, FEI). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE) no Departamento de Engenharia de Materiais (DEMA) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Os aumentos observados são de 15.000X e 40.000X respectivamente.

#### 4.3.6. Análise da sensibilidade do mutante *pkcA*<sup>G579R</sup> a drogas em fitas de Etest

Mesmo sendo processado como teste de difusão em disco, o Etest difere do método de disco convencional pelo uso de um gradiente pré-formado e estável do fármaco.

A primeira droga testada neste trabalho através desta metodologia foi a anfotericina B. Esta interage especificamente com o ergosterol, esteróide constituinte exclusivo da membrana celular fúngica, levando à formação de poros através de membranas lipídicas (ZYG MUNT, 1966). A alteração da

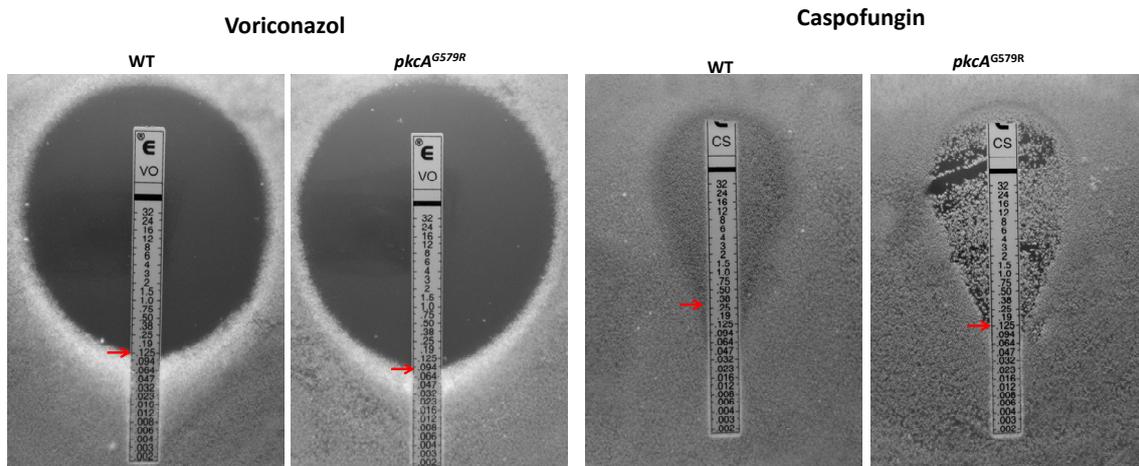
permeabilidade celular permite, portanto, o escape de pequenos íons e metabólitos, principalmente íons potássio, levando eventualmente à morte celular (BOLARD et al., 1993). Visando verificar se haveria uma correlação de *pkcA* de *A. fumigatus* com a síntese de ergosterol da membrana celular ou até mesmo se haveria uma maior fragilidade da parede permitindo uma maior ligação da anfotericina ao ergosterol da membrana, realizou-se a análise da susceptibilidade a anfotericina das linhagens através do método de Etest. Não houve alteração da susceptibilidade a esta droga na linhagem mutante de PkcA em *A. fumigatus* (dados não mostrados).

As equinocandinas constituem a classe mais nova de agentes antifúngicos. Conforme mencionado na sessão 4.3.2. A caspofungina atua na parede celular do fungo ao inibir a síntese de  $\beta$ -1,3 glucana, onde induz alterações morfológicas e de crescimento que podem resultar na ruptura da parede celular, causando uma ação fungicida. (PERLIN, 2011). Atualmente, a caspofungina só é aprovada para terapia de recuperação em pacientes com aspergilose invasiva refratária, que não respondem ao voriconazol (WALSH et al., 2008). O perfil de sensibilidade da linhagem selvagem e mutante frente à droga caspofungina foi verificado através da metodologia de Etest. Conforme observado anteriormente para a droga anidulafungin (figura 9) a mutação *pkcA*<sup>G579R</sup> de *A. fumigatus* promoveu também o aumento da sensibilidade a caspofungina, sendo que a linhagem *pkcA*<sup>G579R</sup> apresentou sensibilidade a partir de 0,94  $\mu$ g e a linhagem selvagem 0,125 $\mu$ g como pode ser observado na figura 16.

Os azóis constituem um grupo de agentes fungistáticos sintéticos, com amplo espectro de atividade (SUGITA et al., 2004). O principal alvo dos antifúngicos azólicos é a enzima citocromo P450 lanosterol 14 $\alpha$ -demetilase, codificada pelo gene ERG11. A consequente depleção de ergosterol altera a fluidez da membrana, interferindo na ação das enzimas associadas à membrana. O efeito global consiste em inibição da replicação. Os principais fármacos disponíveis incluem fluconazol, itraconazol, cetoconazol, miconazol e econazol, sendo o voriconazol o mais amplamente utilizado desta classe para o tratamento de API (HERBRECHT et al., 2012). Devido à importância clínica deste fármaco, a linhagem mutada e selvagem tiveram a sua CIM determinada através da metodologia de Etest. Houve um aumento da sensibilidade na

linhagem mutada que teve a CIM de 0.125 µg enquanto a linhagem selvagem obteve a CIM de 0.25 µg (figura 16). O aumento da sensibilidade da linhagem *pkcA*<sup>G579R</sup> foi verificado também quando estas linhagens foram inoculadas na presença do fluconazol em placas de meio YAG sólido (dados não mostrados), podendo assim relacionar a PkcA de *A. fumigatus* a resistência aos azóis neste patógeno.

**Figura 16: PkcA de *A. fumigatus* está relacionada a resistência a azóis e a equinocandinas.**



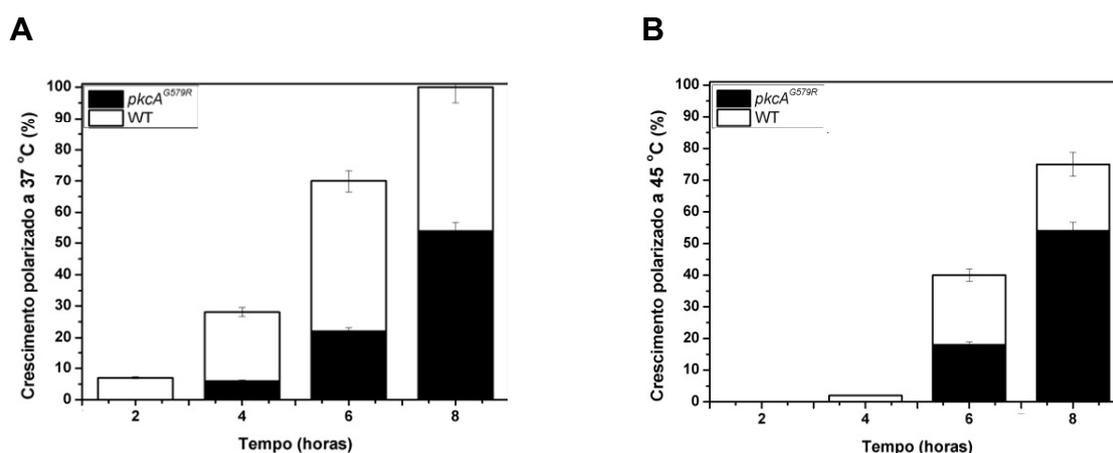
1x10<sup>5</sup> conídios das linhagens foram inoculadas com auxílio de um swab em placa de Petri contendo meio RPMI sólido. Em seguida adicionou-se a fita de Etest. As amostras foram incubadas a 37°C por 30 horas em seguida foi determinada a CIM através da intersecção do início do halo de inibição formado e a concentração de droga na fita.

#### 4.3.7 Análise do crescimento polarizado dos conídios

No processo de divisão celular de *Aspergillus* o conídio germinante passa por uma etapa inicial de incorporação de água, passando por uma fase de crescimento isotrópico (“swelling”). Posteriormente com a formação de um eixo de polaridade com deposição de novas camadas de parede celular em todas as direções (OSMANI; MIRABITO, 2004) dando origem ao tubo germinativo, que gera um eixo de crescimento polarizado. A deposição de parede celular exclusivamente na ponta do tubo germinativo é chamada de extensão apical, e confere à hifa o aspecto de um filamento alongado (HARRIS, 1999; MOMANY; TAYLOR, 2000), sendo assim a perfeita formação da parede celular é essencial para o crescimento polarizado em *A. fumigatus*.

Para a verificação do crescimento polarizado em *A. fumigatus* as linhagens foram incubadas a 37 e a 45 °C no intervalo de 8 horas, sendo retirada uma amostra para ser visualizada a cada 2 horas deste intervalo. Foram considerados conídios com crescimento polarizado aqueles que mostravam protuberância na superfície do esporo alterando sua forma redonda característica (HARRIS, 1999). Através da contagem de conídios por microscopia em campo claro foi possível quantificar o crescimento polarizado de cada linhagem testada neste intervalo. Observou-se que os conídios da linhagem mutante têm cerca de 40% de diminuição da emissão de tubo germinativo nas mesmas condições de cultivo em relação à linhagem selvagem, como pode ser observado na figura 17.

**Figura 17: A mutação *pkcA*<sup>G579R</sup> promove alteração do crescimento polarizado em *A. fumigatus***



Foram inoculados  $1 \times 10^6$  conídios em placas de Petri contendo meio completo líquido YG e uma lamínula estéril ao fundo. As placas foram incubadas a 37(A) e 45 °C (B) por 2, 4, 6, e 8 horas. Foram analisados 100 germinantes em cada experimento independente e os resultados apresentados representam médias  $\pm$  desvios padrões de pelo menos três experimentos independentes.

#### 4.3.8. Análise da sensibilidade do mutante *pkcA*<sup>G579R</sup> em relação ao inibidor de PKC celeritrina

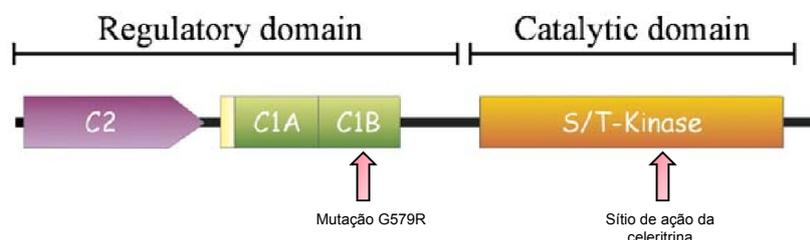
A celeritrina, um alcalóide de benzofenantridina, é o inibidor mais potente e seletivo da PKC agindo no local de ligação do substrato da enzima (HERBERT et al., 1990). Este composto, contribui para o estudo do papel da PKC em várias funções celulares por interagir com o domínio catalítico da PKC,

sendo um inibidor competitivo em relação ao ligante de fosfato. (HEBERT et al., 1990). Na figura 18 observa-se o sítio de ação da celeritrina e o local da mutação G579R.

Neste trabalho foi realizada a mutação G579R no domínio C1B da PkcA de *A. fumigatus*. Dessa forma seria possível especular que a ação da PkcA com a celeritrina no “background” genético do mutante *pkcA*<sup>G579R</sup> poderia causar uma maior perturbação da função de PkcA. Já que ainda não foi possível concluir se a exemplo do que ocorre em *A. nidulans*, o gene *pkcA* de *A. fumigatus* é essencial.

Inicialmente, para verificar se estaria ocorrendo o efeito sinérgico da inibição provocada pela celeritrina juntamente a alteração da PkcA provocada pela mutação G579R a CIM da celeritrina nas linhagens selvagem, mutante e complementante foi determinada. Como se pode observar na tabela 5 houve uma redução da CIM da celeritrina na linhagem mutante (15 µM).

**Figura 18: Demonstração esquemática dos domínios de PkcA e sítios de ligação da celeritrina**



A mutação *pkcA*<sup>G579R</sup> foi realizada no domínio regulatório na região C1B da proteína *pkcA*, enquanto a celeritrina age no domínio catalítico (setas), havendo assim uma possibilidade de ocorrer um sinergismo entre o efeito da mutação e o efeito da droga. Para detalhes sobre a estrutura da função do domínio de PKC ver a seção 1.4.1. Modificado de NEWTON, 1997.

Linhagem	CIM
wt	20 µM
<i>pkcA</i> <sup>G579R</sup>	15 µM
<i>cpkcA</i> <sup>G579R</sup>	20 µM

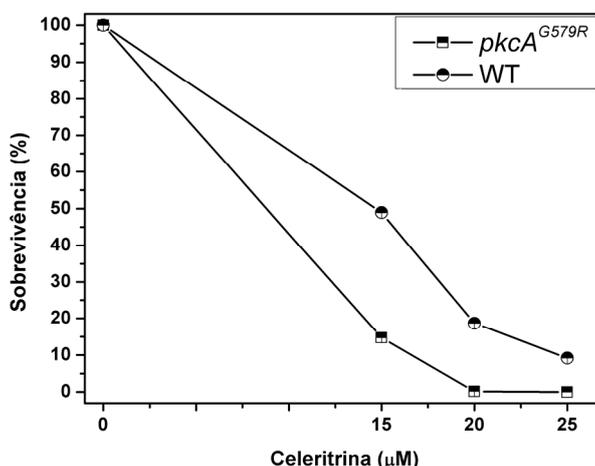
**Tabela 5: Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para celeritrina na linhagem selvagem, mutante e complementante.** Para a determinação da CIM as linhagens foram inoculadas na concentração de  $1 \times 10^7$  em tubos de ensaio contendo meio líquido completo YG e a concentração indicada da droga. As linhagens foram incubadas a 37 °C. A CIM foi determinada através da concentração de droga que impediu completamente o crescimento das linhagens. Nesta tabela observa-se que a linhagem *pkcA*<sup>G579R</sup> obteve uma

menor CIM, demonstrando assim maior sensibilidade a celeritrina. Os resultados apresentados representam o que foi observado em pelo menos três experimentos independentes.

Como um segundo teste para verificarmos a ocorrência deste possível sinergismo, realizou-se uma curva de sobrevivência das linhagens expostas a celeritrina com o objetivo de observar se estaria ocorrendo uma alteração da viabilidade das linhagens testadas após a exposição à celeritrina.

A linhagem mutante quando exposta a concentração de 15  $\mu\text{M}$  de celeritrina (CIM da linhagem *pkcA*<sup>G579R</sup>) possui 15% de viabilidade após 16 horas de recuperação, enquanto na linhagem selvagem possui 60% de viabilidade. Na presença de 20  $\mu\text{M}$  de celeritrina (CIM da linhagem selvagem) a linhagem mutante e selvagem mostraram 0% e 20% de viabilidade respectivamente. As linhagens também foram expostas a 25  $\mu\text{M}$  de celeritrina, e mesmo nesta concentração acima da CIM determinada a linhagem selvagem mostrou 10% da sua viabilidade. Estes resultados podem ser observados na figura 19 e indicam a atividade fungistática da celeritrina na linhagem selvagem, porém fungicida na linhagem mutante *pkcA*<sup>G579R</sup>.

**Figura 19: Análise da viabilidade das linhagem selvagem e mutante após a exposição à celeritrina**



$2 \times 10^3$  conídios de cada linhagem foram expostos às concentrações pré-estabelecidas de celeritrina em meio líquido completo YG a 37 °C por 16 horas. Após este período a placa foi centrifugada a 900 g, o meio de cultura foi descartado, e adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  de MTT 10 mg/mL (Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 digeniltetrazolium), incubou-se por 3 horas, em seguida as placas foram centrifugadas a 900 g, o MTT foi descartado, em seguida adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  da isopropanol+HCl 0,04 M, e incubou-se “overnight” para descoloração. O sobrenadante foi retirado e transferido para uma placa de 96 poços com fundo chato e realizou-se a leitura a  $\lambda 540 \text{ nm}$ . O experimento foi realizado em triplicata e os resultados apresentados representam médias  $\pm$  desvios padrões de pelo menos três experimentos independentes. Foram consideradas significativas as diferenças observadas com p valor  $< 0,05$ .

#### 4.4. Análise transcricional dos genes relacionados à CWI na linhagem selvagem e *pkcA*<sup>G579R</sup>

A PCR em tempo real é um método quantitativo que permite a quantificação das cópias de DNA ou cDNA geradas a cada ciclo da reação através de fluoróforos que produzem um aumento no sinal de fluorescência em proporção direta ao número de moléculas do produto de PCR (amplificações) gerado (BUSTIN et al., 2009).

Diante dos resultados obtidos, indicando que a mutação *pkcA*<sup>G579R</sup> altera a composição da parede celular de *A. fumigatus*, a expressão de alguns genes que compõem a via de integridade da parede celular, bem como das enzimas responsáveis pela síntese da parede celular em *A. fumigatus* tiveram sua expressão avaliada através de RT-PCR em tempo real. Com isso buscou-se verificar a dependência de PkcA para a ativação transcricional dos genes envolvidos na biossíntese da parede celular.

A análise transcricional por RT-PCR em tempo real foi realizada a partir do RNA extraído da cultura das linhagens submetidas ou não ao estresse causado por 300 µg/mL de CR. A escolha do CR foi devido ao fato deste estar entre os agentes que levaram a maior sensibilidade da linhagem *pkcA*<sup>G579R</sup>.

Dentre os resultados obtidos verificou-se que *pkcA* na linhagem selvagem é induzido em todos os tempos de exposição ao CR, já a mutação *pkcA*<sup>G579R</sup> promoveu a redução do número de transcritos de *pkcA* após 60 minutos de exposição ao CR. O gene da MAP quinase *mpkA* (figura 20B) também apresentou indução transcricional frente ao estresse causado por CR após 60 minutos de exposição. O gene *rlmA* mostrou aumento crescente dos seus valores de expressão na linhagem selvagem na presença de CR, como pode ser visto na figura 20C indicando que a CWI estava ativa após o tratamento com CR, o que sugere que *rlmA* é o fator de transcrição responsável pela transcrição de genes de biossíntese e reforço de parede celular em *A. fumigatus*. Adicionalmente na linhagem mutante *pkcA*<sup>G579R</sup> os valores de transcritos de *rlmA* tiveram aumento de cerca de três vezes, antes mesmo da exposição ao CR. O mesmo perfil de indução transcricional na ausência de exposição ao CR na linhagem mutante foi observado para os

genes relacionados a composição da parede celular *fksA*, *agsA*, *agsC*, *gelC*, *chsC*, *chsE* (figuras 20D, E, G, J, M, O respectivamente) sendo que *chsC* (que codifica uma quitina sintase) o que demonstrou maior aumento no número de transcritos nesta condição (3,6 vezes). Em conjunto esses resultados indicam que a linhagem mutante *pkcA*<sup>G579R</sup> encontra-se constitutivamente com um nível maior de ativação da CWI.

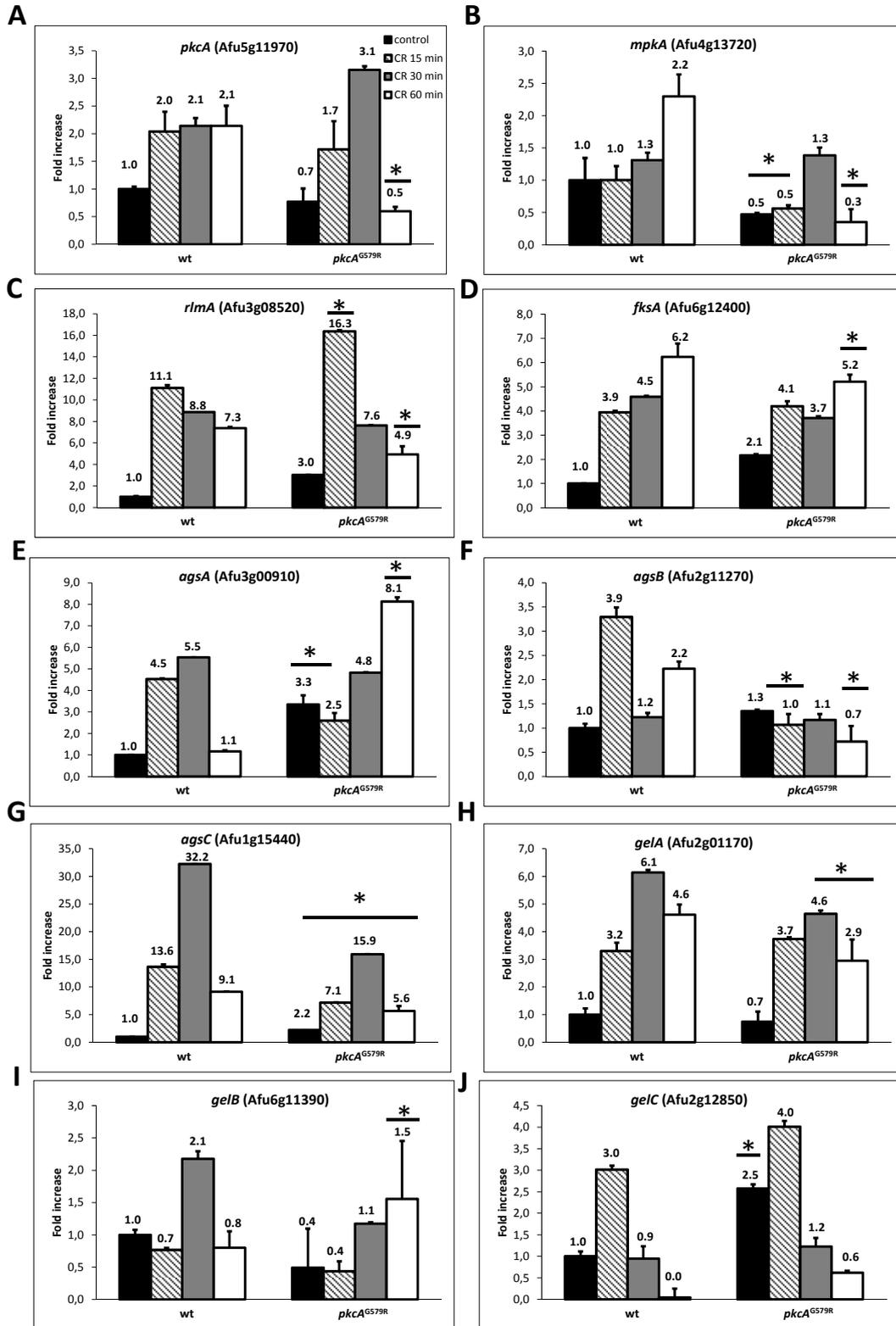
Os genes *chsF* e *chsG* (figura 20 P e Q respectivamente) possuem o mesmo perfil de expressão gênica tanto na linhagem selvagem quanto na linhagem mutante em todos os tempos de exposição realizados neste trabalho. Estes genes demonstraram ser parcialmente dependentes de *pkcA* pois houve uma alteração no número de transcritos, porém o perfil de expressão gênica observado se manteve.

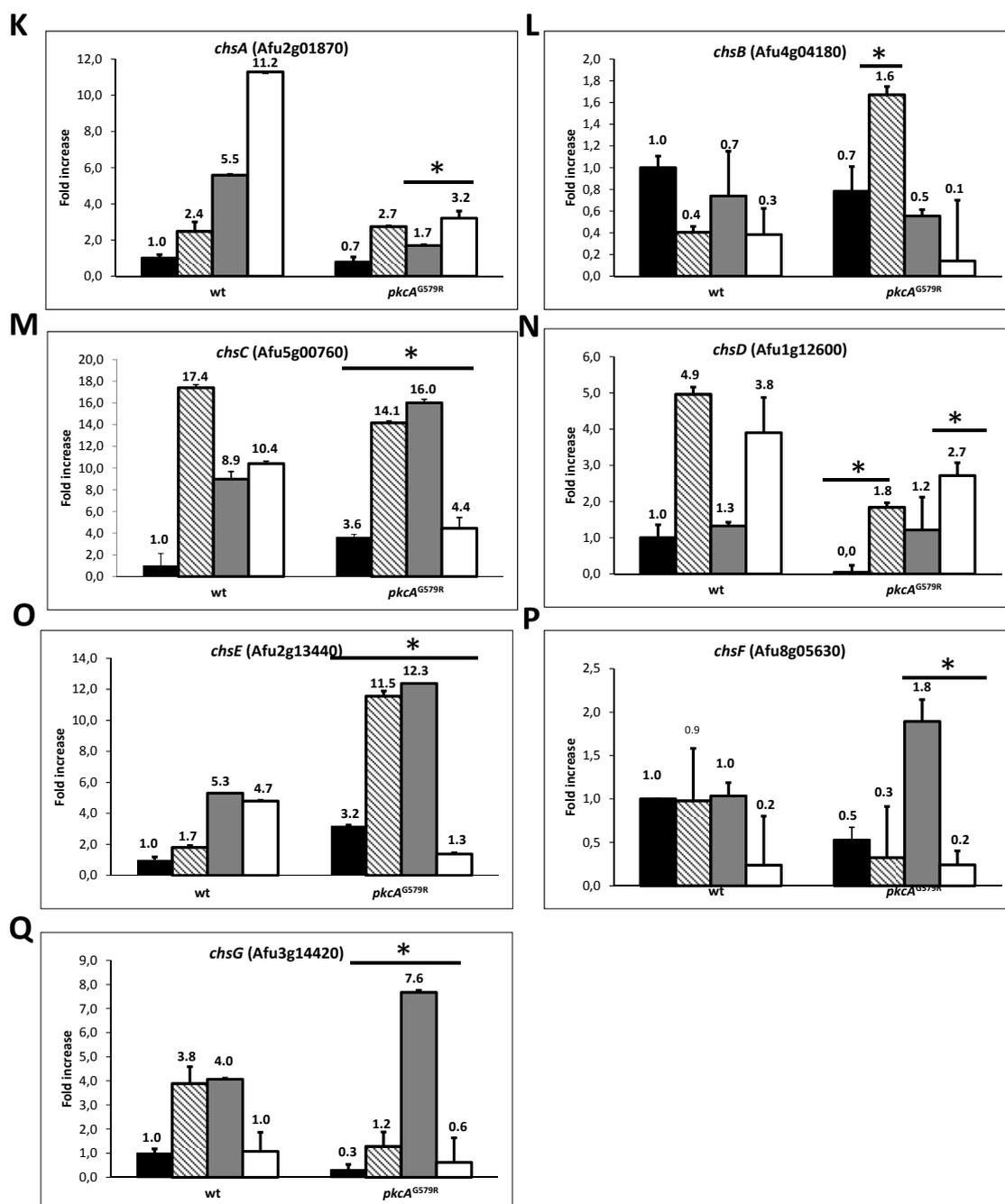
Os genes *chsC*, *chsE*, *chsF*, *chsG* (figuras 20 M, O, P, Q respectivamente) tiveram o aumento do número de transcritos na linhagem mutante quando expostos ao congo red por 30 minutos.

Os genes *agsB*, *agsC*, *gelA*, *gelB* e todos os que codificam as quitinas sintases (*chsA*, *chsB*, *chsC*, *chsD*, *chsE*, *chsF*, *chsG*) (figuras 20 F, G, H, I, K, L, M, N, O, P, Q respectivamente) possuem redução da expressão quando expostos ao CR por 60 minutos.

do mutante *pkcA*<sup>G579R</sup> que codifica o homólogo da proteína quinase C, no fungo patogênico *Aspergillus fumigatus*

**Figura 20: Análise transcricional dos genes que compõem a via de integridade e da parede celular e de genes de biossíntese da parede celular de *A. fumigatus***





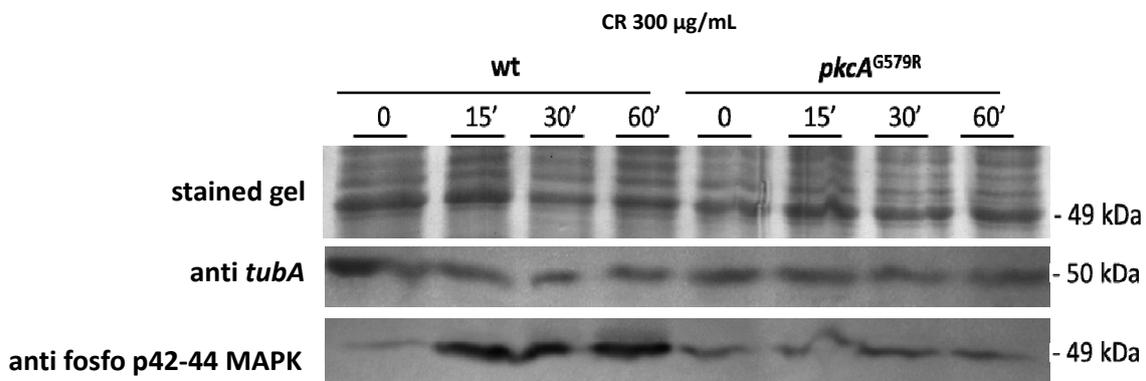
A linhagem selvagem e mutante foram cultivadas durante 24 horas em meio mínimo a 37° C sob agitação de 180 rpm. Na sequência, 300 mg/mL de CR foi adicionada às culturas. As culturas foram incubadas por 0, 15, 30 e 60 minutos, na presença do agente indutor. O RNA total foi extraído, tratado com DNase turbo (Ambion®) e as transcrições reversas foram realizadas para obtenção do cDNA que foi usado como molde nas reações de RT-PCR em tempo real. O gene da tubulina (*tubA*) foi usado como normalizador dessas reações e a quantificação relativa foi obtida comparando-se a expressão da linhagem em relação ao tempo 0 de exposição ao CR da linhagem selvagem (wt).

#### 4.5. Análise de western blot para verificar a fração fosforilada de MpkA

Com o intuito de verificar se PkcA é responsável pela fosforilação de MpkA *A. fumigatus*, ou seja, se a mutação *pkcA*<sup>G579R</sup> estava alterando a fosforilação de MpkA na presença do CR, a linhagem mutante e selvagem foram expostas ao CR por 15, 30 e 60 minutos, e para a detecção da fração fosforilada de MpkA utilizou-se um anticorpo anti p44/42 MAPK que reconhece a fração fosforilada de MpkA. Através desta detecção foi possível verificar se estaria havendo uma alteração da fosforilação na via de integridade da parede celular em *A. fumigatus* de forma a incluir PkcA de *A. fumigatus* na CWI.

Observou-se a redução da fosforilação do mutante *pkcA*<sup>G579R</sup> quando exposto ao agente CR, indicando que a ativação MAP quinase MpkA é dependente da fosforilação iniciada por PkcA em *A. fumigatus*, como pode ser observado na figura 21.

**Figura 21: A mutação *pkcA*<sup>G579R</sup> reduz a fosforilação da MAP quinase MpkA na presença de estresse de parede celular**



As linhagens foram cultivadas durante 24 horas em meio mínimo a 37 °C, na sequência, 300 µg/mL de CR foram adicionados às culturas. Estas foram incubadas por 0, 15, 30 e 60 minutos, na presença do agente indutor. As proteínas foram extraídas e posteriormente quantificadas a partir do método de "Bradford", e após realizou-se a corrida do gel de SDS-PAGE 12%. As proteínas foram transferidas para a membrana de PVDF, bloqueadas e marcadas com o anticorpo anti phospho P44/42 MAPK (Cell Signaling). Como controle de carregamento foi utilizado o anticorpo anti β-tubulina (Abcam).

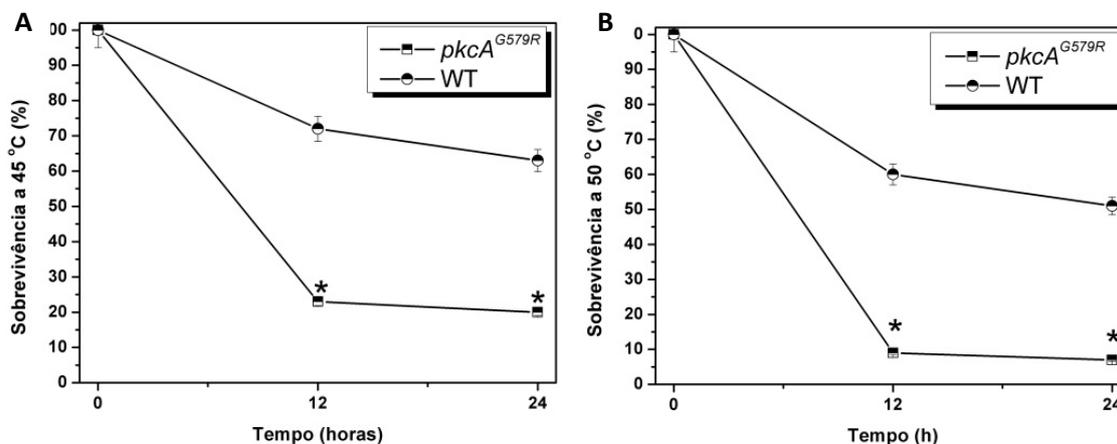
#### 4.6. Análise da relação da PkcA de *A. fumigatus* com a termotolerância deste patógeno

Conforme mencionado anteriormente, a termotolerância é um traço genético importante para a virulência em *A. fumigatus* durante a infecção, esta é uma característica poligênica e a abordagem mais direta para identificar genes envolvidos neste programa genético é a identificação de vias de sinalização relacionadas à adaptação térmica (ALBRECHT et al., 2010).

O fator de transcrição de choque térmico (HSF1) que impulsiona essa resposta é conservado desde leveduras até seres humanos, sendo essencial para a viabilidade em leveduras (LEACH et al., 2012). Estas observações refletem a importância fundamental da adaptação de choque térmico em todos os organismos.

Em testes iniciais de caracterização fenotípica observou-se que a redução do crescimento radial da linhagem *pkcA*<sup>G579R</sup>, está relacionada à tolerância ao choque térmico neste organismo (figura 8). A partir desta observação, a linhagem selvagem e mutante foram expostas ao estresse térmico nas temperaturas de 45 e 50 °C, e após esta exposição determinou-se a viabilidade dos conídios.

Observou-se que a linhagem *pkcA*<sup>G579R</sup> apresentou uma redução significativa da viabilidade dos conídios em relação a linhagem selvagem, que obteve uma redução da viabilidade de cerca 50% a 45 °C e a 50 °C. Esta queda da viabilidade dos conídios é um indicativo de que PkcA de *A. fumigatus* pode estar relacionada a tolerância ao choque térmico, como pode ser observado na figura 22A-B.

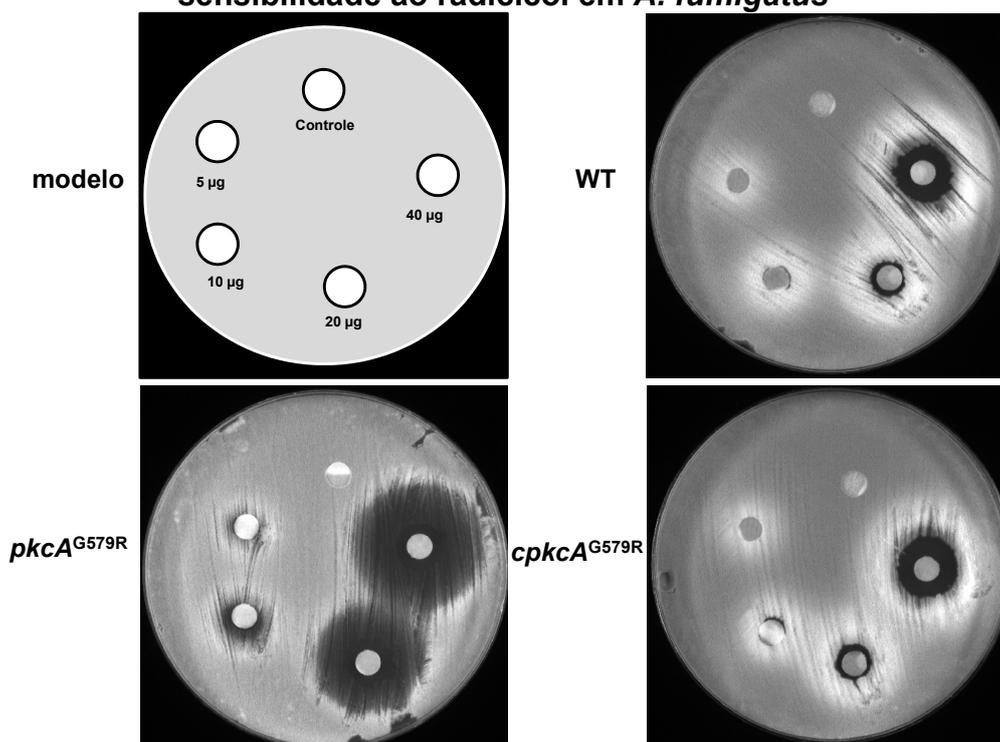
**Figura 22: PkcA de *A. fumigatus* está relacionado a resistência ao choque térmico**

200 conídios de cada linhagem foram expostos às temperaturas de 45 e 50 °C por 12 e 24 horas e em placa de Petri contendo meio completo sólido YG. Após os tempos de exposição determinado, as placas foram incubadas a 37 °C para a recuperação por 24 horas. A porcentagem de colônias viáveis foi obtida em relação ao controle não exposto ao choque térmico na linhagem selvagem e mutante.

Em *S. cerevisiae* a MAP quinase Mpk1, (homólogo de MpkA em *A. fumigatus*) (VALIANTE et al., 2008) é um componente essencial da CWI, sendo também uma proteína cliente da chaperona molecular Hsp90 (TRUMAN et al., 2007).

Os inibidores farmacológicos clássicos da Hsp90, geldanamicina e radicicol, se ligam no sítio de ligação do ATP no domínio amino-terminal da proteína Hsp90 inibindo sua função. Em *S. cerevisiae* a inibição de Hsp90 culmina na ativação defeituosa da CWI (TRUMAN et al., 2007). Diante disso avaliou-se a susceptibilidade da linhagem mutante frente ao inibidor radicicol. Os experimentos de sensibilidade de difusão em discos de radicicol mostraram que houve um aumento da susceptibilidade da linhagem mutante a esta droga, o que sugere que a ativação defectiva da CWI em *A. fumigatus* está relacionada à tolerância ao choque térmico.

**Figura 23: A mutação *pkcA*<sup>G579R</sup> *A. fumigatus* promove o aumento da sensibilidade ao radicicol em *A. fumigatus***



$2 \times 10^6$  conídios foram inoculados com swab em placa de Petri contendo meio completo YG sólido. Discos de papel filtro estéreis que foram previamente impregnados com diferentes quantidades de radicicol foram aplicados na placa de petri previamente inoculadas com esporos das linhagens. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas, para a leitura dos resultados.

O choque térmico tem como principal efeito em *A. fumigatus* a manutenção do “folding” das proteínas mediado pela proteção promovida por chaperonas e co-chaperonas moleculares que exercem sua função em proteínas clientes. Essa associação permite a função correta das proteínas clientes levando a ativação de vias envolvidas na integridade da parede celular, organização do citoesqueleto, transporte molecular e vesicular, geração de energia, defesa contra o stress oxidativo e transdução de sinal (ALBRECHT, et al., 2010).

A fim de se compreender as bases transcricionais da termotolerância defectiva do mutante *pkcA*<sup>G579R</sup>, a expressão do fator de transcrição *hsf1* e das chaperonas moleculares *hsp30*, *hsp90*, *ssc1* e *ssp1*, foram avaliadas na linhagem selvagem e mutante em condições de estresse térmico.

A expressão de *pkcA* foi aumentada na célula em exposição ao choque térmico na linhagem selvagem, tanto a 37 quanto a 48 °C, indicando que PkcA

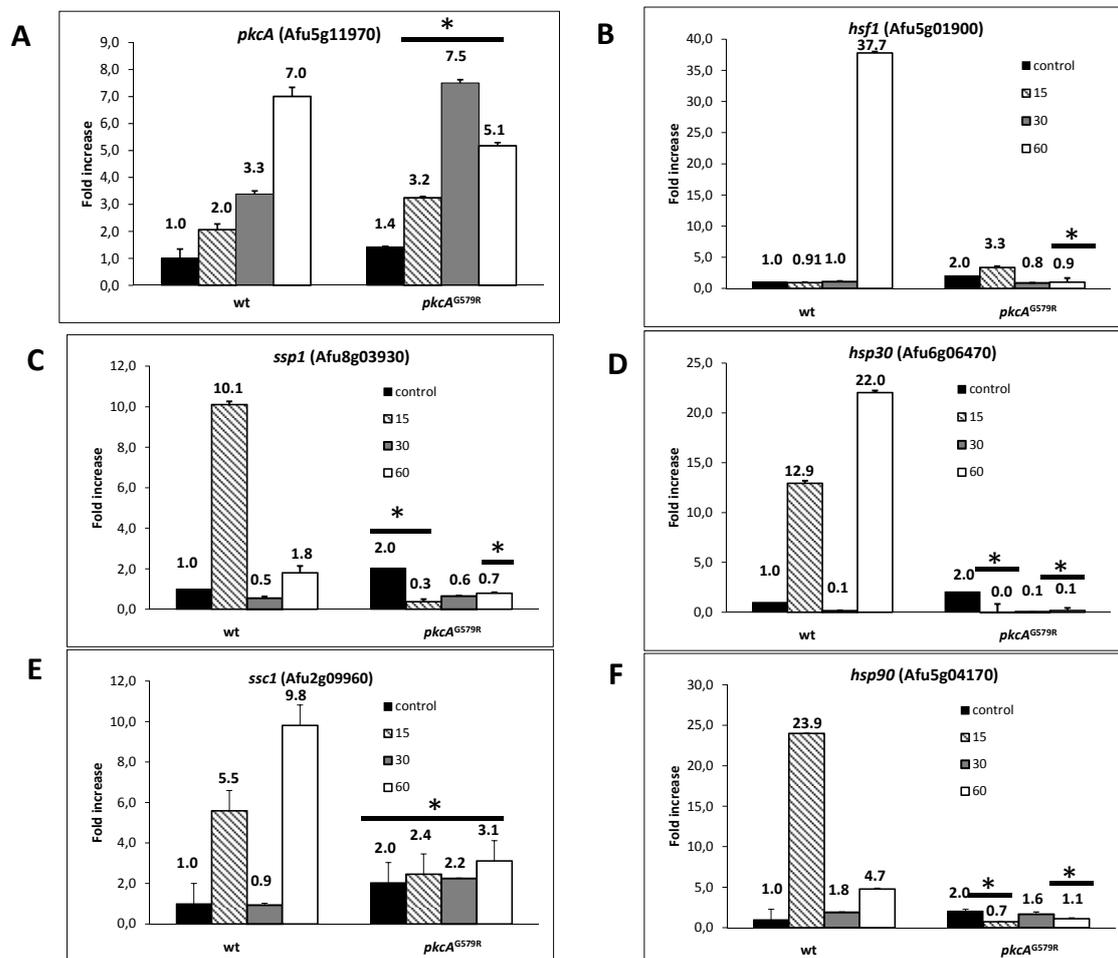
está envolvida na ativação de proteínas “downstream” relacionadas a termotolerância em *A. fumigatus*.

Foram observados redução dos níveis de transcritos no “background” mutante *pkcA*<sup>G579R</sup> em todos os tempos de exposição a 37 °C nos genes testados, os quais são conhecidamente envolvidos na resposta ao choque térmico em *A. fumigatus*: o fator de transcrição *hsf1*, as chaperonas moleculares *hsp90* e *hsp30*, e *ssp1* que codifica uma chaperona (*hscA*) a qual é membro da família da HSP70 (figuras 24 B, C,D, E,F). Além disso, a chaperona molecular *ssp1* obteve o aumento da sua expressão na linhagem mutada quando esta ainda não havia sido exposta ao choque térmico (figura 25C).

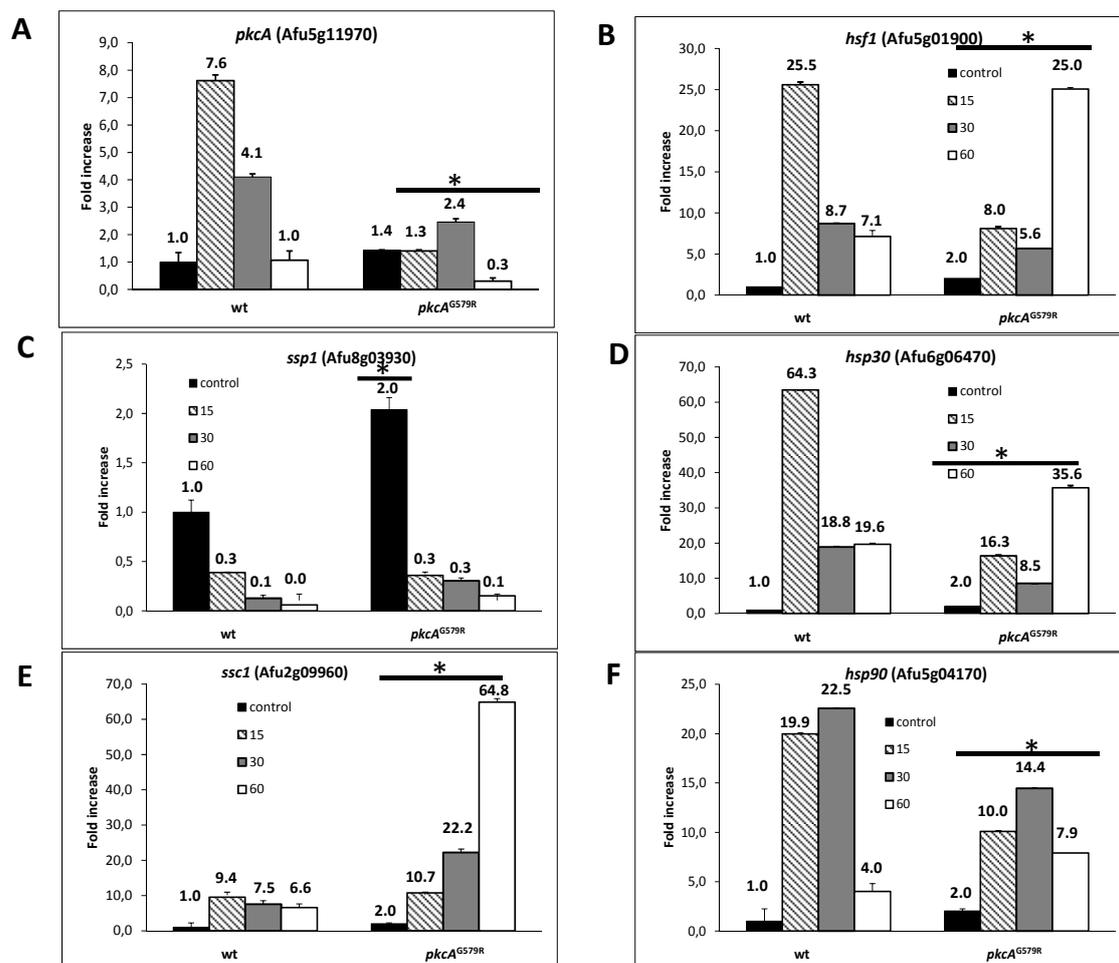
A 48 °C, a chaperona molecular *hsp90* obteve o aumento do número de transcritos com 30 minutos de exposição (figura 25F). Após 60 minutos de exposição a 48 °C, um aumento do número de transcritos foi observado no fator de transcrição *hsf1* e nas chaperonas moleculares *hsp30* e *ssc1* (figura 25 B, D, E respectivamente).

Esses resultados, demonstram a participação de *pkcA* na modulação transcricional de diversos genes envolvidos na resistência ao choque térmico em *A. fumigatus* e portanto sua relação na termotolerância.

**Figura 24: Análise transcricional dos genes envolvidos no choque térmico de *A. fumigatus* a 37 °C**



As linhagens foram cultivadas durante 24 horas em meio mínimo a 30 °C. As culturas foram incubadas por 0, 15, 30 e 60 minutos, a 37 °C. O RNA total foi extraído, tratado com DNase turbo (Ambion®) e as transcrições reversas foram realizadas para obtenção do cDNA que foi usado como molde nas reações de RT-PCR em tempo real. O gene da tubulina (*tubA*) foi usado como normalizador dessas reações e a quantificação relativa foi obtida comparando-se a expressão da linhagem *pkcA*<sup>G579R</sup> em relação a linhagem selvagem (wt) sem exposição ao choque térmico.

**Figura 25: Análise transcricional dos genes envolvidos no choque térmico de *A. fumigatus* a 48 °C**

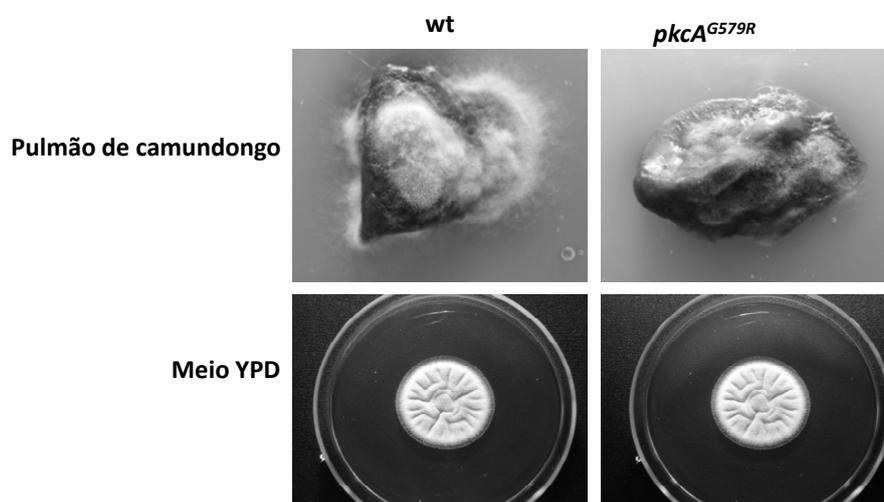
As linhagens foram cultivadas durante 24 horas em meio mínimo a 30 °C. As culturas foram incubadas por 0, 15, 30 e 60 minutos, a 48 °C. O RNA total foi extraído, tratado com DNase turbo (Ambion®) e as transcrições reversas foram realizadas para obtenção do cDNA que foi usado como molde nas reações de RT-PCR em tempo real. O gene da tubulina (*tubA*) foi usado como normalizador dessas reações e a quantificação relativa foi obtida comparando-se a expressão das linhagens em relação a linhagem selvagem (wt) sem exposição ao choque térmico.

#### 4.7. PkcA é requerida para o crescimento de *A. fumigatus* em pulmão murino

A versatilidade nutricional é um dos fatores que contribuem para a virulência de *A. fumigatus* (ABAD et al., 2010). Este patógeno possui proteases extracelulares que reciclam a matéria orgânica no meio ambiente e estas mesmas proteases durante o processo de infecção do hospedeiro quebram barreiras estruturais para a obtenção de nutrientes (NIERMAN et al., 2005), sendo assim a alteração da versatilidade nutricional de *A. fumigatus* pode contribuir para a redução ou aumento da virulência neste patógeno.

Para verificarmos se PkcA estaria afetando a versatilidade nutricional de *A. fumigatus*, a linhagem selvagem e mutante foram inoculadas em pulmão fresco de camundongo. Pode-se verificar que a linhagem mutante *pkcA*<sup>G579R</sup> apresentou um menor crescimento em relação a linhagem selvagem após 24 horas de crescimento (figura 26). Esta diferença não foi observada em meio rico YPD. Por outro lado a linhagem *pkcA*<sup>G579R</sup> teve uma taxa de crescimento equiparada à da linhagem selvagem em ágar soro fetal bovino 10% utilizado como fonte nutricional (dados não apresentados).

**Figura 26: Análise do crescimento do mutante *pkcA*<sup>G579R</sup> em tecido pulmonar murino**



$1 \times 10^7$  esporos foram inoculados em pulmão fresco de camundongo em placa de petri contendo agarose 5% estéril. Como controle foi utilizado placas de petri contendo o meio YPD. Ambas foram incubadas a 37 °C por 24 horas e fotografadas. O experimento foi acompanhado por até 72 horas.

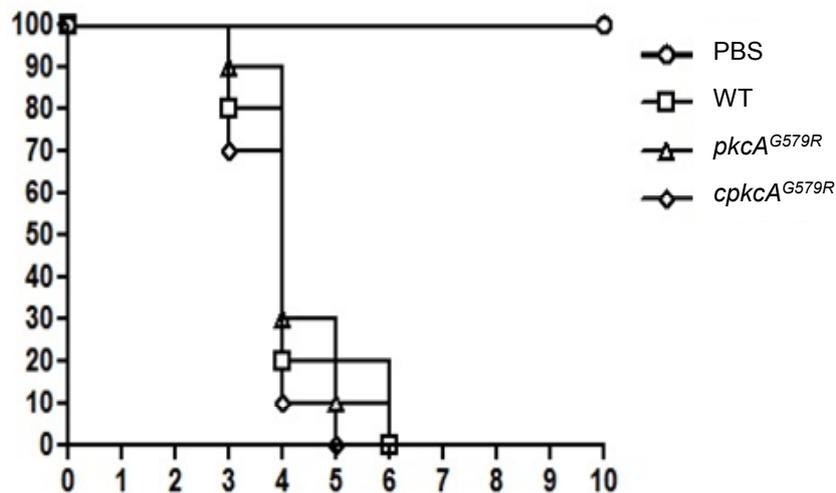
#### 4.8. Análise da virulência das linhagens em modelo murino neutropênico de aspergilose pulmonar invasiva

A análise comparativa da virulência da linhagem selvagem, e complementante em relação à linhagem mutante e *pkcA*<sup>G579R</sup> foi realizada em modelo murino neutropênico de aspergilose pulmonar invasiva.

Através desta análise foi possível observar que apesar dos efeitos fenotípicos observados ao longo deste trabalho, a mutação pontual *pkcA*<sup>G579R</sup> não foi suficiente para atenuar a virulência de *A. fumigatus*, como pode ser observado na figura 27.

Embora a CWI esteja funcionando de forma defeituosa nesse mutante, a perda de função de PkcA causada pela mutação G579R pode ser compensada na célula gerando plena infecção no modelo animal. Como ainda não é possível verificar se *pkcA* é um gene essencial em *A. fumigatus*, é inadequado dizer que não houve atenuação da virulência pois não se sabe se *pkcA* é completamente dispensável para tal ou se a função parcial de *pkcA* na linhagem mutante é capaz de manter a capacidade infectiva e adaptativa no hospedeiro mamífero.

**Figura 27: Análise da virulência da linhagem *pkcA*<sup>G579R</sup> em modelo murino de aspergilose pulmonar invasiva**



$5 \times 10^4$  esporos de cada linhagem foram inoculados por via intranasal em camundongos BALBc submetidos ao regime de imunossupressão conforme descrito em materiais e métodos. Os animais de controle foram inoculados apenas com tampão salina fosfato (PBS 1x).

---

## **5.0. DISCUSSÃO**

## 5.0. DISCUSSÃO

A parede celular é a estrutura responsável pelos sinais de sensoriamento entre o microorganismo e o ambiente, interações fungo e hospedeiro, reconhecimento de receptores, adesão, colonização, invasão e imunomodulação (PITARCH et al., 2002; GLASER et al., 2009).

As vias de sinalização da integridade da parede celular são comuns em vários organismos fúngicos, sendo esta bem compreendida na levedura *S. cerevisiae* (FUJIOKA et al., 2007). Levin et al. (1990), descreve a Pkc1 de *S. cerevisiae* no topo da cascata de sinalização da via da integridade da parede celular sinalizando os eventos iniciais nessa via. Essa via de transdução de sinal está também envolvida na resposta a uma série de estresses, incluindo o estresse térmico (KAMADA et al., 1995).

A via da integridade da parede celular de *A. fumigatus* está parcialmente caracterizada, porém o mecanismo pelo qual esta é ativada ainda não é completamente esclarecido.

O alinhamento de sequências da região C1 de *S. cerevisiae* demonstrara que Pkc1 não se liga a DAG (SCHMITZ et al., 2001) e pertence à chamada classe de domínios C1 atípicos. O mesmo não é verdadeiro para os outros membros da família de PKCs fúngicas (KHATUN e LACKING, 2010), como em *N. crassa* onde o homólogo de PKC é ativada por DAG exógeno e ésteres de forbol (KHATUN e LACKING, 2010).

Os compostos da classe dos azóis inibem a síntese de ergosterol, o esteroíde da membrana celular fúngica (HERBRECHT et al., 2012), de forma que a fragilidade da parede celular fúngica facilita o seu mecanismo de ação (DIRR et al., 2010). Em *S. cerevisiae* a inibição da função da PKC, bloqueia a rápida evolução da resistência a azóis (FUCHS e MYLONAKIS et al., 2009).

A produção de EROs pelos fagócitos no hospedeiro é um dos mecanismos de combate à invasão do *A. fumigatus*, sendo a resistência ao estresse oxidativo um dos determinantes de virulência deste organismo (LAMBOU et al., 2010). Pkc1 é necessária para a transmissão do sinal de estresse oxidativo em *S. cerevisiae*, através da ativação da CWI (ELSZTEIN et

al., 2011). A função da PkcA de *A. fumigatus* em resposta ao estresse oxidativo necessita de maiores estudos para ser esclarecida.

Em *S. cerevisiae* Pkc1 está localizada no sítio de crescimento polarizado e no “bud neck” (ADREWS e START, 2000). Em *A. nidulans* PkcA está localizada na ponta da hifa, no citoplasma e no septo (KATAYAMA et al., 2012). Através da construção da linhagem *alcA::pkcA::GFP* observou-se que PkcA de *A. fumigatus* possui localização homóloga a *A. nidulans* e *S. cerevisiae*. Acredita-se que a emergência do tubo germinativo possui um processo similar ao brotamento de leveduras (MOMANY, 2000). Durante o crescimento isotrópico do conídio, substratos e enzimas necessárias para a síntese da parede celular encontram-se dispersas no córtex celular, concentrando-se no ponto de emergência do tubo germinativo (MOMANY, 2004). A redução do crescimento polarizado devido a mutação na PkcA, juntamente a localização da PkcA de *A. fumigatus*, faz com que esta proteína seja adicionada a uma lista cada vez maior de proteínas localizadas na parte apical da hifa que estão relacionadas ao crescimento polarizado. Em *A. nidulans* foi verificado uma interação genética entre *pkcA* e *atmA*, um gene envolvido na resposta celular ao dano ao DNA e também no crescimento polarizado em *A. nidulans* (MALAVAZI et al., 2007).

Em *A. nidulans* PkcA não promoveu alterações no desenvolvimento normal da hifa e na esporulação assexuada (TEEPE et al., 2006), o que sugere que a função de PkcA na resposta ao estresse de parede celular é regulada de forma independente do crescimento normal da hifa. O fenótipo observado na mutação da PkcA em *A. nidulans* pode ser explicado com base em seu papel regulador na via de integridade da parede celular (TEEPE et al., 2006).

Proteínas da parede celular são de particular interesse na formação de biofilme, pois além do seu papel esperado na adesão, a parede celular possui um papel de sensoriamento na indução de respostas (BENARD e LATGÉ, 2001; LATGÉ, 2005). A parede conidial de *A. fumigatus* é pigmentada por hidrofobinas denominadas “rodlets”, estas dentre outras funções em *A. fumigatus* estão relacionadas à adesão (FANNING e MITCHELL, 2012). A redução da formação do estágio inicial de formação de biofilme observada neste trabalho, acrescida da redução significativa dos “rodlets”, e sendo a parede celular o

suporte para as hidrofobinas em *A. fumigatus* (BENARD e LATGÉ, 2001; LATGÉ, 2005) sugere que PkcA de *A. fumigatus* está relacionada a adesão.

Watanabe et al., (2005), descreve que o fator de transcrição Rlm1 de *S. cerevisiae* é ativado através da fosforilação deste pela MAP quinase MPK1, que é ativada através da fosforilação inicial de Pkc1 localizada no topo da cascata de sinalização (ver figura 3) (WATANABE et al., 2005). De acordo com Jung e Levin, (1999), Rlm1 regula a expressão de pelo menos 25 genes relacionados à síntese e reforço da parede celular. Estes genes são, portanto dependentes da ativação da CWI por Pkc1 em *S. cerevisiae* (JUNG e LEVIN, 1999).

Sendo Pkc1 de *S. cerevisiae* homóloga a PkcA de *A. fumigatus*, coube a este trabalho responder as questões: Seria PkcA de *A. fumigatus* componente da CWI neste patógeno? Quais genes responsáveis pela biossíntese da parede celular de *A. fumigatus* estão sob controle da ativação da CWI por PkcA?

Para responder as estas questões a linhagem *pkcA*<sup>G579R</sup> e a linhagem selvagem foram expostas a 300 µg/mL de CR, e em seguida avaliou-se quais destes genes estariam sendo regulados por *pkcA* de *A. fumigatus*.

As análises sugerem que tanto *pkcA* quanto *mpkA* são induzidos transcricionalmente frente ao estresse de parede celular causado por CR.

Em *A. fumigatus* α-1,3 glucana é o polissacarídeo mais abundante na parede celular, e a sua formação é regulada pela expressão de 3 genes (*agsA-B-C*) que correspondem a *agsE-D-A* respectivamente em *A. niger*. Em *A. nidulans*, que possui somente duas α-1,3 glucanas (*agsA-B*), estas correspondem aos homólogos *agsA-B* de *A. fumigatus* (BEAUVIS et al., 2001). Os níveis de transcritos de *agsE-A* de *A. niger* aumentam quando este é exposto ao tratamento com CFW (DAMVELD et al., 2005). Em *A. nidulans* a deleção de *mpkA* e *rlmA* promoveu em ambas as linhagens mutantes a redução de transcritos de *agsB* e aumento dos transcritos de *agsA* quando exposto ao micafungina (uma equinocandina), indicando que a CWI tem um papel repressor na expressão de *agsA* e um papel indutor na expressão de *agsB* (FUJIOKA et al., 2007). Em *A. fumigatus* a mutação *pkcA*<sup>G579R</sup> promoveu a queda na abundância de transcritos dos genes *agsB* e *agsC* indicando o papel de *pkcA* na regulação positiva da expressão desses genes.

Adicionalmente para o gene *agsA* os valores de acúmulo dos transcritos no maior tempo de exposição ao CR mostram um aumento o qual como observado em *A. nidulans*. Estes dados concluem que os genes que codificam  $\alpha$ -1,3 glucanas, *agsA-B-C*, são dependentes de PkcA em *A. fumigatus*.

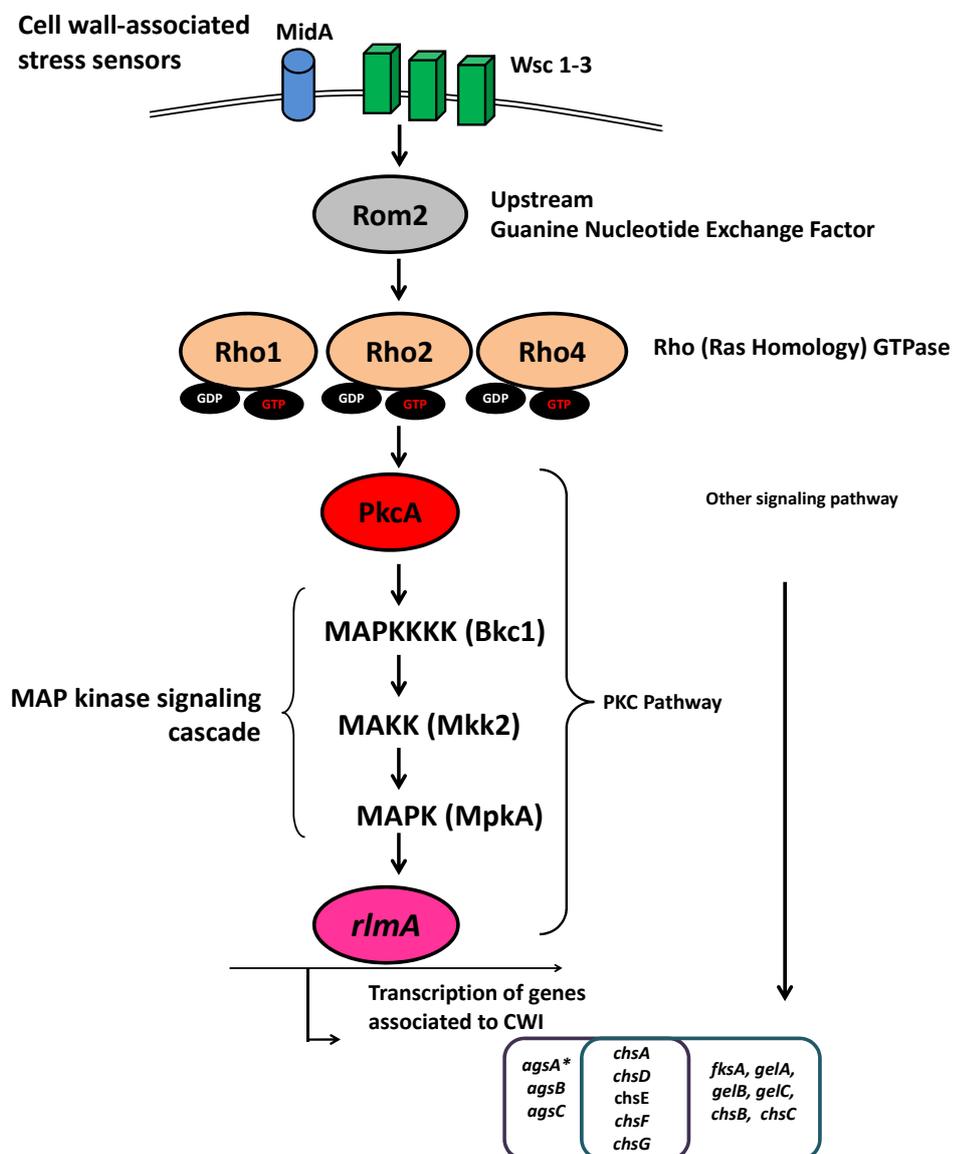
As quitinas são classificadas de acordo com a sequência de aminoácidos que as compõem, e de tal forma são divididas em 6 classes (MELLADO et al., 1995) sendo a classe I representada pela ChsA e a classe II pela ChsB. Estas quitinas pertencentes às classes I e II são responsáveis pela formação de septo em *A. fumigatus* (ICHINOMYA et al., 2007). A classe III é representada pelas quitinas sintases ChsC e ChsG, sendo que ambas ao serem deletadas promoveram a atenuação da virulência de *A. fumigatus* (MELLADO et al., 2003). A classe VI a qual pertence à *chsD*, que assim como a classe IV composta pela *chsF* ainda não possuem função esclarecida em *A. fumigatus* (MELLADO et al., 2003). A classe V é composta pela ChsE que está relacionada a taxa de crescimento radial e ramificação das hifas em *A. fumigatus* (MELLADO et al., 2003). Sendo importante ressaltar que as classes III, V e VI são exclusivas de fungos filamentosos. Damvel et al., 2005, descreveu a dependência das quitinas sintases ao fator de transcrição Rlm1 em *A. niger*, pois quando o mutante  $\Delta rlm1$  foi exposto ao agente estressor de parede celular CFW houve uma queda na deposição de quitina em relação a linhagem selvagem, ele propôs que tal mecanismo é amplamente disseminado em fungos filamentosos (DAMVEL et al., 2005). Os dados encontrados neste trabalho corroboram com os de Damvel et al., (2005), quanto a expressão dos genes relacionados a produção de quitinas em *A. fumigatus* podendo-se concluir que a alteração da expressão de algumas das quitinas sintases é parcialmente dependente da ativação da CWI em *A. fumigatus* através da fosforilação mediada por PkcA. ChsB e ChsC entretanto parecem ter sua expressão independente da ativação da CWI por PkcA em *A. fumigatus*. De modo interessante a quitina ChsE parece inclusive ser modulada negativamente pela atividade de PkcA.

Os genes *fksA*, *glaA-B-C* estão relacionados à síntese de  $\beta$ -1,3 glucanas em diversas espécies de *Aspergillus* (MOUYANA et al., 2005). A transcrição de *FKS1-2* em *S. cerevisiae* é regulada pela ativação da CWI por Pkc1 que ativa o fator de transcrição Rlm1 (JUNG E LEVIN, 1999). Em *A. nidulans* os valores de

transcritos de *fksA*, *gelA-B*, não alteraram na presença das mutações  $\Delta rlmA$  e  $\Delta mpkA$  em relação a linhagem selvagem quando expostos à micafungina (FUJIOKA et al., 2007). Neste trabalho os níveis de transcritos destes mesmos genes e de *gelC* também não tiveram alteração na linhagem *pkcA*<sup>G579R</sup> em relação a linhagem selvagem quando exposta ao CR. Esses dados levam a concluir que em *A. fumigatus* estes genes não dependem da ativação da CWI por *pkcA* e que possivelmente são induzidos por uma outra via de sinalização. A presença de outra via de transdução do sinal além da CWI em *A. nidulans* também foi proposta por Fujioka et. al (2007) o que também parece ocorrer em *A. fumigatus*. Curiosamente a ativação de *fksA* (a subunidade catalítica da  $\beta$ -1,3 glucana sintase) é também independente de PkcA, porém esse gene é o alvo das drogas da classe das equinocandinas, as quais são eficientemente usadas na clínica para o tratamento da aspergilose (PERLIN, 2011). Esses dados indicam que outros alvos da parede celular de fungos como *A. fumigatus* ainda guardam grande potencial para a identificação de novos compostos inibidores de sua síntese. Entretanto deve se ter em mente a capacidade desses organismos de manipular a sua parede celular de uma forma dinâmica em resposta a perturbações da parede celular (MUNRO, 2013).

Baseado nos resultados reportados nesse trabalho foi possível propor um modelo de regulação dos genes relacionados com a composição e manutenção da parede celular em *A. fumigatus* (figura 28).

**Figura 28: Esquema do modelo transcricional regulado por PkcA de *A. fumigatus* na CWI baseado neste estudo**



Neste modelo observa-se que os genes que codificam as  $\alpha$ 1,3 glucana sintase *agsA-B-C* são regulados exclusivamente pela ativação da PkcA na CWI de *A. fumigatus*, sendo que *agsA*\* demonstrou ter um perfil de indução quando exposto a 60 minutos por um agente estressor, este mesmo comportamento foi observado no *agsA* de *A. nidulans* por Fujioka et al., (2007). Os genes que codificam a glucanosiltransferase *gelB*, e as quitinas sintases *chsA-D-E-F-G* são dependentes da ativação da CWI por PkcA porém, há outra via controlando a sua transcrição, esta conclusão embasea-se no fato de que estes genes obtiveram alteração no número de transcritos, porém o seu perfil de transcrição frente a exposição ao CR na linhagem *pkcA*<sup>G579R</sup> foi semelhante ao da linhagem selvagem (wt) Os genes responsáveis pela formação de  $\beta$  1,3 glucanas *fksA, gelA-B-C*, e as quitinas sintases *chsB-C* não dependem da ativação da CWI por

PkcA em *A. fumigatus*, pois estes se comportaram da mesma maneira na linhagem *pkcA*<sup>G579R</sup> e na linhagem selvagem (wt), o que sugere que estes sejam regulados por outra via acessória a esta.

A termotolerância é um importante traço genético responsável pela sobrevivência do *A. fumigatus* durante a infecção do hospedeiro (ALBRECHT et al., 2010). Em eucariotos a resposta ao choque térmico é controlada através dos “heat shock transcription factor” (HSF) (TRUMAN et al., 2009).

Dinamarco et al., (2012) demonstrou que quando a linhagem selvagem de *A. fumigatus* é exposta ao choque térmico de 48 °C há um aumento dos níveis de transcritos de *hsf1*, *hsf30* e *hsp90* (DINAMARCO et al., 2012) o que corrobora com o que foi observado neste trabalho. Na presença da mutação *pkcA*<sup>G579R</sup> ocorreu aumento significativo da expressão de *hsf1*, *hsp30*, *hsp90* e *ssc1* em relação a linhagem selvagem. Este dado é sugestivo da importância de PkcA de *A. fumigatus* na tolerância ao choque térmico, os valores de expressão de *pkcA* também foram aumentados durante o choque térmico. Truman et al., (2010) demonstrou que Hsf1 em *S. cerevisiae* é responsável pela ativação da via da integridade da parede celular, iniciada através da fosforilação promovida por Pkc1 e Mpk1 de *S. cerevisiae* sendo que Mpk1 é uma proteína cliente de Hsp90 (TRUMAN et al., 2010). A 37 °C observou-se que há uma significativa redução do número de transcritos de *hsf1*, *hsp30*, *hsp90* e *ssc1*.

Cowen, (2013) demonstrou que Hsp90 é responsável por controlar a resposta a drogas que promovem estresse da parede celular e estresse de membrana em fungos patogênicos (COWEN, 2013). Lamonth et al., (2012), demonstrou que a repressão de *hsp90* em *A. fumigatus* resultou em alterações da conidiação, germinação, e crescimento da hifa (LAMONTH et al., 2012), e Katayama et al., (2012) demonstrou que em *A. nidulans* PkcA desempenha um papel na germinação dos conídios em condições de estresse térmico, sendo esta requerida para a polarização da hifa durante o estresse de temperatura (KATAYAMA et al., 2012). A mutação *pkcA*<sup>G579R</sup> aumentou a susceptibilidade do *A. fumigatus* ao inibidor farmacológico de *hsp90* radicicol. Juntamente ao observado por Lamonth et al., (2012) este dado sugere que em *A. fumigatus* Hsp90 está relacionada a CWI.

Dinamarco et al., (2012) demonstrou que *ssp1*, um possível membro da família e HSP70 tem o aumento do número de transcritos quando *A. fumigatus* é exposto ao choque térmico a 37 °C, porém não a 48 °C (DINAMARCO et al., 2012), o mesmo foi observado neste trabalho em relação a linhagem selvagem. Porém na presença da mutação *pkcA*<sup>G579R</sup> foi observado o perfil transcricional inverso.

Este trabalho demonstrou que a CWI de *A. fumigatus* é dependente da ativação de PkcA, porém neste patógeno, esta via não é a única que controla genes responsáveis pela formação da parede celular. Apesar da mutação *pkcA*<sup>G579R</sup> não ter demonstrado atenuação na virulência no hospedeiro mamífero, determinar se PkcA é essencial para *A. fumigatus* é importante devido a sua relação com a formação da parede celular e a termotolerância, que são dois importantes fatores de virulência que propiciam a infecção por *A. fumigatus*.

---

## **6.0. CONCLUSÕES**

## 6.0 CONCLUSÕES

Este trabalho propôs inicialmente identificar genes envolvidos na via de sinalização da integridade da parede celular em *A. fumigatus*, através da construção do mutante *pkcA*<sup>G579R</sup> em *A. fumigatus* e sua caracterização fenotípica. Com base nos resultados podemos concluir que:

- A mutação G579R no gene que codifica PkcA em *A. fumigatus* localizada no domínio regulador rico em cisteína C1B é suficiente para prejudicar a via de integridade da parede celular neste fungo.
- A perda de função de *pkcA* de *A. fumigatus* influencia a morfologia das hifas, o crescimento polarizado, e a resposta da célula a agentes promotores de estresse oxidativo como menadiona e paraquat.
- Através das análises de RT-PCR em tempo real foi possível verificar que os genes da via de sinalização da integridade da parede celular *mpkA* e *rlmA* apresentam indução transcricional mediante o estresse da parede celular causado por CR.
- As análises de RT-PCR em tempo real permitiram também verificar que os genes que participam da composição da parede celular *agsA-B-C* que codificam as  $\alpha$ -1,3-glucanas parecem ser os únicos que diretamente são regulados pela CWI através do fator de transcrição *rlmA*.
- Foi verificada interação entre a PkcA e Hsp90 através da inibição farmacológica de Hsp90 pela droga radicicol no “background” genético da mutação *pkcA*<sup>G579R</sup> demonstrando pela primeira vez a função de *pkcA* na resistência ao choque térmico em *A. fumigatus*. O gene *pkcA* de *A. fumigatus* pode facilitar o crescimento sob condições de nutrição limitada evidenciando um papel na versatilidade nutricional deste fungo.

---

do mutante *pkcA*<sup>G579R</sup> que codifica o homólogo da proteína quinase C, no fungo patogênico *Aspergillus fumigatus*

- A perda de função parcial de *pkcA* não causou atenuação da virulência em um modelo murino para a aspergilose pulmonar invasiva, o que pode ser atribuído à alta redundância das vias de sinalização da CWI, que ao contrário de *S. cerevisiae*, não controla a maioria dos genes alvos para a biossíntese e reforço da parede celular.
- Outra via de sinalização e/ou um fator de transcrição não identificado pode estar envolvido na regulação de genes como *fksA*, *gelA-C* e outros, os quais, não estão sob o controle transcricional do circuito PkcA-MpkA-RlmA.

---

## **7.0. REFERÊNCIAS**

## 7.0. REFERÊNCIAS

- ABAD, A. et al. What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. **Rev Iberoam Micol**, v. 27, n. 4, p. 155-82, 2010.
- AGUILAR-USCANGA B, FRANÇOIS JM. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. **Lett Appl Microbiol**, v. 37, n.03, p. 268-274, 2003.
- ALBRECHT, D. et al. Integrative analysis of the heat shock response in *Aspergillus fumigatus*. **BMC Genomics**, v. 11, p. 32, 2010.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**, 1996. New York: John Wiley & Sons, Inc.865p.
- AMICH J, KRAPPMANN S. Deciphering metabolic traits of the fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*: redundancy vs. essentiality. **Front Microbiol**, v. 3, p. 1-6, 2012.
- ANDREWS PD, STARK MJ. Dynamic, Rho1p-dependent localization of Pkc1p to sites of polarized growth. **J Cell Sci**, n. 113, v. 15, p. 2685-2693, 2000.
- BEAUVAIS A, DRAKE R, NG K, DIAQUIN M, LATGÉ JP. Characterization of the 1,3-beta-glucan synthase of *Aspergillus fumigatus*. **J Gen Microbiol**, v. 139, n. 12, p. 3071-3078, 1993.
- BELL RM, BURNS DJ. Lipid activation of protein kinase C. **J Biol Chem**, v. 266, n. 08, p. 4661-4664, 1991.
- BEAUVAIS, A. et al. Glucan synthase complex of *Aspergillus fumigatus*. **J Bacteriol**, v. 183, n. 7, p. 2273-9, Apr 2001.
- BELL RM, BURNS DJ. Lipid activation of protein kinase C. **J Biol Chem**, v. 266, n. 08, p. 4661-4664, 1991.
- BERNARD, M.; LATGE, J. P. *Aspergillus fumigatus* cell wall: composition and biosynthesis. **Med Mycol**, v. 39 Suppl 1, p. 9-17, 2001.

BOLARD J.,LEGRAND P, VERTUT-DOÏ A. Liposomal amphotericin B bases of therapeutic index increase. **Biomater Artif Cells Immobilization Biotechnol**, v. 21, n. 03, p. 407-413, 1993.

BRAKHAGE, A. A.; LIEBMANN, B. Aspergillus fumigatus conidial pigment and cAMP signal transduction: significance for virulence. **Med Mycol**, v. 43 Suppl 1, p. S75-82, May 2005.

BUSTIN SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **J Mol Endocrinol**, v. 25, n. 02, p. 169-193, 2000.

CASADEVALL A, PIROFSKI LA. Immunoglobulins in defense, pathogenesis, and therapy of fungal diseases. **Cell Host Microbe**, v. 11, n. 05, p. 447-456, 2012 .

CHAFFIN WL, RINGLER L, LARSEN HS. Interactions of monospecific antisera with cell surface determinants of Candida albicans. **Infect Immun**. v. 56, n. 12, p. 3294-3296, 1988.

CHAZALET, V. et al. Molecular typing of environmental and patient isolates of Aspergillus fumigatus from various hospital settings. **J Clin Microbiol**, v. 36, n. 6, p. 1494-500, Jun 1998.

COLABARDINI, A. C.; DE CASTRO, P. A.; DE GOUVEA, P. F.; SAVOLDI, M.; MALAVAZI, I.; GOLDMAN, M. H.; GOLDMAN, G. H. Involvement of the Aspergillus nidulans protein kinase C with farnesol tolerance is related to the unfolded protein response. **Mol Microbiol**, v. 78, p. 1259-1279, 2011.

COWEN, L. E. The fungal Achilles' heel: targeting Hsp90 to cripple fungal pathogens. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, p. 377-384, 2013.

DAGUE, E.; ALSTEENS, D.; LATGE, J. P.; DUFRENE, Y. F. High-resolution cell surface dynamics of germinating Aspergillus fumigatus conidia. **Biophys J**, v. 94, p. 656-660, 2008.

DAMVELD, R. A. et al. The *Aspergillus niger* MADS-box transcription factor RlmA is required for cell wall reinforcement in response to cell wall stress. **Mol Microbiol**, v. 58, n. 1, p. 305-19, Oct 2005.

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

DEL C., CALVO I., FEDOR-CHAIKEN M., SONG J.C., STARLINGER V., YOO J., MATLIN K.S., MATTHEWS J.B. Dynamic regulation of Na<sup>(+)</sup>-K<sup>(+)</sup>-2Cl<sup>(-)</sup> cotransporter surface expression by PKC- $\epsilon$  in Cl<sup>(-)</sup> secretory epithelia. **Am. J. Physiol. Cell Physiol**, v. 289, p. 1332–1342, 2005.

DENNING, D. W. Invasive aspergillosis. **Clin Infect Dis**, v. 26, n. 4, p. 781-803; quiz 804-5, Apr 1998.

DENNING M.F., Epidermal keratinocytes: regulation of multiple cell phenotypes by multiple protein kinase C isoforms. **Int. J. Biochem. Cell**, v. 36, p. 1141–1146, 2004.

DICHTL, K. et al. Farnesol misplaces tip-localized Rho proteins and inhibits cell wall integrity signalling in *Aspergillus fumigatus*. **Mol Microbiol**, v. 76, n. 5, p. 1191-204, Jun 1 2010.

DICHTL, K. et al. Deciphering cell wall integrity signalling in *Aspergillus fumigatus*: identification and functional characterization of cell wall stress sensors and relevant Rho GTPases. **Mol Microbiol**, v. 83, n. 3, p. 506-19, 2012.

DINAMARCO TM, ALMEIDA RS, DE CASTRO PA, BROWN NA, DOS REIS TF, RAMALHO LN, SAVOLDI M, GOLDMAN MH, GOLDMAN GH. Molecular characterization of the putative transcription factor SebA involved in virulence in *Aspergillus fumigatus*. **Eukaryot Cell**, v. 11, n. 04, p. 518-531, 2012.

DIRR, F. et al. AfMkk2 is required for cell wall integrity signaling, adhesion, and full virulence of the human pathogen *Aspergillus fumigatus*. **Int J Med Microbiol**, v. 300, n. 7, p. 496-502, 2010.

DOONAN JH. Cell division in *Aspergillus*. **J Cell Sci**, v. 03, p.599-611, 1992.

ELSZTEIN C, DE LUCENA RM, DE MORAIS MA JR. The resistance of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to the biocide polyhexamethylene biguanide: involvement of cell wall integrity pathway and emerging role for YAP1. **BMC Mol Biol**, v. 19, p. 2199-3038, 2011.

FANNING S, MITCHELL AP. Fungal biofilms. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 04, p. 1-4, 2012.

FONTAINE T, MAGNIN T, MELHERT A, LAMONT D, LATGE JP, FERGUSON MA. Structures of the glycosylphosphatidylinositol membrane anchors from *Aspergillus fumigatus* membrane proteins. **Glycobiology**, v. 13, n. 03, p. 169-177, 2003.

FUCHS BB, MYLONAKIS E. Our paths might cross: the role of the fungal cell wall integrity pathway in stress response and cross talk with other stress response pathways. **Eukaryot Cell**, v. 8, n. 11, p. 1616-1625, 2009.

FUJIOKA, T. et al. MpkA-Dependent and -independent cell wall integrity signaling in *Aspergillus nidulans*. **Eukaryot Cell**, v. 6, n. 8, p. 1497-510, 2007.

GANESAN LT, MANAVATHU EK, CUTRIGHT JL, ALANGADEN GJ, CHANDRASEKAR PH. In-vitro activity of nikkomycin Z alone and in combination with polyenes, triazoles or echinocandins against *Aspergillus fumigatus*. **Clin Microbiol Infect**, v. 10, n. 11, p. 961-966, 2004.

GARCÍA C. S., GÓMEZ-FERNÁNDEZ JC. Protein kinase C regulatory domains: the art of decoding many different signals in membranes. **Biochim Biophys Acta**, v. 1761, n. 07, 2006.

GIRARDIN H, PARIS S, RAULT J, BELLON-FONTAINE MN, LATGÉ JP. The role of the rodlet structure on the physicochemical properties of *Aspergillus conidia*. **Lett Appl Microbiol**, v. 29, n. 06, p. 364-369, 1999.

GLASER AG, KIRSCH AI, ZELLER S, MENZ G, RHYNER C, CRAMERI R. Molecular and immunological characterization of Asp f 34, a novel major cell wall allergen of *Aspergillus fumigatus*. **Allergy**, v. 64, n.08, p. 1144-1151, 2009.

GUTCHER I., WEBB P.R., ANDERSON N.G. The isoform-specific regulation of apoptosis by protein kinase C. **Cell Mol Life Sci**, v. 60, p. 1061–1070, 2003

HARRIS SD, MORRELL JL, HAMER JE. Identification and characterization of *Aspergillus nidulans* mutants defective in cytokinesis. **Genetics**, v. 136, n. 02, p. 517-532, 1994.

HARRIS SD. Morphogenesis is coordinated with nuclear division in germinating *Aspergillus nidulans* conidiospores. **Microbiology**, v. 10, p. 2747-2756, 1999.

HARTMANN T, SASSE C, SCHEDLER A, HASENBERG M, GUNZER M, KRAPPMANN S. Shaping the fungal adaptome stress responses of *Aspergillus fumigatus*. **Int J Med Microbiol**, v. 301, n. 05, p. 408-416, 2011.

HERRMANN, M.; SPROTE, P.; BRAKHAGE, A. A. Protein kinase C (PkcA) of *Aspergillus nidulans* is involved in penicillin production. **Appl Environ Microbiol**, v. 72, p. 2957-2970, 2006.

HERBERT J.M. , AUGEREAU” J.M. , GLEYEE J. , MAFFRAND J.P.. Chelerythrine is a potent and specific inhibitor of Protein kinase C. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 172, n. 3, p. 993-999, 1990. November 15, 1990

HERBRECHT R, BORIES P, MOULIN JC, LEDOUX MP, LETSCHER-BRU V. Risk stratification for invasive aspergillosis in immunocompromised patients. **Ann N Y Acad Sci**, v.1272, p.23-30, 2012.

HILL TW, LOPRETE DM, MOMANY M, HA Y, HARSCH LM, LIVESAY JA, MIRCHANDANI A, MURDOCK JJ, VAUGHAN MJ, WATT MB. Isolation of cell wall mutants in *Aspergillus nidulans* by screening for hypersensitivity to Calcofluor White. **Mycologia**, v. 98, n.03, p.399-409.

HOHMANN, S. Osmotic adaptation in yeast--control of the yeast osmolyte system. **Int Rev Cytol**, v. 215, p. 149-187, 2002.

- HORN, F. et al. Systems biology of fungal infection. **Front Microbiol**, v. 3, p. 108, 2012.
- HOSPENTHAL, D. R.; KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. Concentrations of airborne *Aspergillus* compared to the incidence of invasive aspergillosis: lack of correlation. **Med Mycol**, v. 36, n. 3, p. 165-8, 1998.
- HOUSE C, KEMP BE. Protein kinase C contains a pseudosubstrate prototope in its regulatory domain. **Science**, v. 238, n. 4834, p. 1726-1728.
- ICHINOMIYA M, UCHIDA H, KOSHI Y, OHTA A, HORIUCHI H. A protein kinase C-encoding gene, *pkcA*, is essential to the viability of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 71, n. 11, p. 2787-2799, 2007.
- ISHIBASHI K, MIURA NN, ADACHI Y, OGURA N, TAMURA H, TANAKA S, OHNO N. DNA array analysis of altered gene expression in human leukocytes stimulated with soluble and particulate forms of *Candida* cell wall beta-glucan. **Int Immunopharmacol**, v. 4, n.03, p. 387-401, 2004.
- JACOBY T, FLANAGAN H, FAYKIN A, SETO AG, MATTISON C, OTA I. J. Two protein-tyrosine phosphatases inactivate the osmotic stress response pathway in yeast by targeting the mitogen-activated protein kinase, Hog1. **Biol Chem**, v. 272, n. 28, p. 17749-17755.
- JIANG Y., BERK M., SINGH L.S., TAN H., YIN L., POWELL C.T., XU Y. KiSS1 suppresses metastasis in human ovarian cancer via inhibition of protein kinase C alpha. **Clin Exp Metastasis**, v. 22, p 369–376, 2005.
- JUNG, U. S.; LEVIN, D. E. Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway. **Mol Microbiol**, v. 34, n. 5, p. 1049-57, 1999.
- KAMADA, Y. et al. The protein kinase C-activated MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* mediates a novel aspect of the heat shock response. **Genes Dev**, v. 9, n. 13, p. 1559-71, 1995.

KAZANIETZ MG, WANG S, MILNE GW, LEWIN NE, LIU HL, BLUMBERG PM. Residues in the second cysteine-rich region of protein kinase C delta relevant to phorbol ester binding as revealed by site-directed mutagenesis. **J Biol Chem**, v. 270, n. 37, p. 21852-21859, 1995.

KHATUN R, LAKIN-THOMAS P. Activation and localization of protein kinase C in *Neurospora crassa*. **Fungal Genet Biol**, v. 48, n. 4, p. 465-473. 2010.

KATAYAMA T, UCHIDA H, OHTA A, HORIUCHI H. Involvement of protein kinase C in the suppression of apoptosis and in polarity establishment in *Aspergillus nidulans* under conditions of heat stress. **PLoS One**, v. 7, n. 11, 2012.

KITAJIMA Y., AOYAMA Y., SEISHIMA M. Transmembrane signaling for adhesive regulation of desmosomes and hemidesmosomes, and for cell-cell detachment induced by pemphigus IgG in cultured keratinocytes: involvement of protein kinase C, **J. Invest Dermatol Symp Proc**, v. 4, p. 137-144, 1999.

KLIS FM, MOL P, HELLINGWERF K, BRUL S. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol Rev**, v. 26, n. 03, p. 239-256, 2002.

KLIS, F. M.; BOORSMA, A.; DE GROOT, P. W. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 23, n. 3, p. 185-202, Feb 2006.

KLIS FM, DE JONG M, BRUL S, DE GROOT PW. Extraction of cell surface-associated proteins from living yeast cells. **Yeast**. v. 24, n. 04, p. 253-258, 2007.

KLIS, F. M.; DE GROOT, P.; HELLINGWERF, K. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. **Med Mycol**, v. 39 Suppl 1, p. 1-8, 2001.

KOBAYASHI T., ITO A, SHINKAI M, HONDA H, YOSHIKAWA K, SAGA S, WAKABAYASHI T, YOSHIDA J. Heat shock protein 70 expression induces antitumor immunity during intracellular hyperthermia using magnetite nanoparticles. **Cancer Immunol Immunother**, v. 52, n. 02, p. 80-88, 2003.

- KURANDA, K. et al. Investigating the caffeine effects in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* brings new insights into the connection between TOR, PKC and Ras/cAMP signalling pathways. **Mol Microbiol**, v. 61, n. 5, p. 1147-66, Sep 2006.
- KWON, M. J. et al. Functional characterization of Rho GTPases in *Aspergillus niger* uncovers conserved and diverged roles of Rho proteins within filamentous fungi. **Mol Microbiol**, v. 79, n. 5, p. 1151-67, Mar 2011.
- LAMBOU K, LAMARRE C, BEAU R, DUFOUR N, LATGE JP. Functional analysis of the superoxide dismutase family in *Aspergillus fumigatus*. **Mol Microbiol**, v. 75, n. 04, p. 910-923, 2010.
- LASCANO, R.; MUÑOZ, N.; ROBERT, G.; RODRIGUEZ, M.; MELCHIORRE, M.; TRIPPI, V.; QUERO, G. Paraquat: An Oxidative Stress Inducer. **M N Herbicides**, 2012.
- LATGÉ, J.-P. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. **Mol Microbiol**, v. 66, p. 279-290, 2007.
- LATGE, J. P. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. **Clin Microbiol Rev**, v. 12, n. 2, p. 310-50, Apr 1999.
- LATGE, J. P. et al. Specific molecular features in the organization and biosynthesis of the cell wall of *Aspergillus fumigatus*. **Med Mycol**, v. 43 Suppl 1, p. S15-22, May 2005.
- LATGÉ JP. Tasting the fungal cell wall. **Cell Microbiol**, v. 12, n. 07, p. 863-872, 2010.
- LEACH MD, BUDGE S, WALKER L, MUNRO C, COWEN LE, BROWN AJ. Hsp90 orchestrates transcriptional regulation by Hsf1 and cell wall remodelling by MAPK signalling during thermal adaptation in a pathogenic yeast. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 12, p. 1-20, 2012.
- LESAGE G, BUSSEY H. Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 70, n. 02, p. 317-343, 2006.

LESSING, F. et al. The *Aspergillus fumigatus* transcriptional regulator AfYap1 represents the major regulator for defense against reactive oxygen intermediates but is dispensable for pathogenicity in an intranasal mouse infection model. **Eukaryot Cell**, v. 6, n. 12, p. 2290-302, 2007.

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

LEVIN DE, FIELDS FO, KUNISAWA R, BISHOP JM, THORNER J. A candidate protein kinase C gene, PKC1, is required for the *S. cerevisiae* cell cycle. **Cell**, v. 62, n.02, p. 213-224, 1990.

LIPKE PN, OVALLE R. Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. **J Bacteriol**, v. 180, n. 15, p. 3735-3740, 1998.

LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) **Method Methods**, v. 25, n.4, p. 402-408, 2001.

MACKAY HJ, TWELVES CJ. Targeting the protein kinase C family: are we there yet? **Nat Rev Cancer**, v. 7, n. 07, p. 554-562, 2007.

MAGNELLI, P. E.; CIPOLLO, J. F.; ROBBINS, P. W. A glucanase-driven fractionation allows redefinition of *Schizosaccharomyces pombe* cell wall composition and structure: assignment of diglucan. **Anal Biochem**, v. 336, p. 202-212, 2005.

MAHESHWARI R, BHARADWAJ G, BHAT MK. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. **Microbiol Mol Biol Rev**, v.64, n.03, p. 461-488, 2000.

MALAVAZI I, SAVOLDI M, DA SILVA FERREIRA ME, SORIANI FM, BONATO PS, DE SOUZA GOLDMAN MH, GOLDMAN GH. Transcriptome analysis of the *Aspergillus nidulans* AtmA (ATM, Ataxia-Telangiectasia mutated) null mutant. **Mol Microbiol**, v. 66, n. 01, p. 74-99, 2007.

- MALAVAZI, I.; GOLDMAN, G. H. Gene disruption in *Aspergillus fumigatus* using a PCR-based strategy and in vivo recombination in yeast. **Methods Mol Biol**, v. 845, p. 99-118, 2012.
- MASCHMEYER, G.; HAAS, A.; CORNELLY, O. A. Invasive aspergillosis: epidemiology, diagnosis and management in immunocompromised patients. **Drugs**, v. 67, n. 11, p. 1567-601, 2007.
- MAUBON D, PARK S, TANGUY M, HUERRE M, SCHMITT C, PRÉVOST MC, PERLIN DS, LATGÉ JP, BEAUVAIS A. AGS3, an alpha(1-3)glucan synthase gene family member of *Aspergillus fumigatus*, modulates mycelium growth in the lung of experimentally infected mice. **Fungal Genet Biol**, v. 43, n. 05, p. 366-375, 2006.
- MELLADO E, AUFAUVRE-BROWN A, SPECHT CA, ROBBINS PW, HOLDEN DW. A multigene family related to chitin synthase genes of yeast in the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus*. **Mol Gen Genet**, v. 246, n. 03, p.353-359, 1995.
- MELLADO E, DUBREUCQ G, MOL P, SARFATI J, PARIS S, DIAQUIN M, HOLDEN DW, RODRIGUEZ-TUDELA JL, LATGÉ JP. Cell wall biogenesis in a double chitin synthase mutant (chsG-/chsE-) of *Aspergillus fumigatus*. **Fungal Genet Biol**, v. 38, n. 01, p. 98-109, 2003.
- MOMANY M, TAYLOR I. Landmarks in the early duplication cycles of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus nidulans*: polarity, germ tube emergence and septation. **Microbiology**, v. 146, n. 12, 2000.
- MOUYNA, I.; LATGE, J. P.; TEKAIA, F.; BEAUVAIS, A.; DEBEAUPUIS, J. P.; NIERMAN, W. Specific molecular features in the organization and biosynthesis of the cell wall of *Aspergillus fumigatus*. **Med Mycol**, v. 43 Suppl 1, p. S15-22, 2005.
- MOTT HR, CARPENTER JW, ZHONG S, GHOSH S, BELL RM, CAMPBELL SL. The solution structure of the Raf-1 cysteine-rich domain: a novel ras and phospholipid binding site. **Proc Natl Acad Sci U S A**, vol. 93, n. 16, p. 8312-8317, 1996.

MUNRO CA. Chitin and glucan, the yin and yang of the fungal cell wall, implications for antifungal drug discovery and therapy. **Adv Appl Microbiol**, v. 83, n, 145-172, 2013.

O'GORMAN CM, SWILAIMAN SS, BALAJEE SA, DYER PS. Discovery of a sexual cycle in *Aspergillus lentulus*, a close relative of *A. fumigatus*. **Eukaryot Cell**, V.12, n.07, p. 962-969, 2013.

OKA M., KIKKAWA U. Protein kinase C in melanoma. **Cancer Metastasis**, v. 24, p. 287–300, 2005.

ORR JW, NEWTON AC. Requirement for negative charge on "activation loop" of protein kinase C. **J Biol Chem**, v. 269, n. 44, p. 27715-27718, 1994.

OSMANI SA, MAY GS, MORRIS NR. Regulation of the mRNA levels of *nimA*, a gene required for the G2-M transition in *Aspergillus nidulans*. **J Cell Biol**, v. 104, n. 6, 1495-1504, 1987.

OSMANI SA, MIRABITO PM. The early impact of genetics on our understanding of cell cycle regulation in *Aspergillus nidulans*. **Fungal Genet Biol**, v. 41, n. 4, p. 401-410, 2004.

PAOLETTI M, BUCK KW, BRASIER CM. Cloning and sequence analysis of the MAT-B (MAT-2) genes from the three Dutch elm disease pathogens, *Ophiostoma ulmi*, *O. novo-ulmi*, and *O. himal-ulmi*. **Mycol Res**, v.109, n.09,p.983-991,2005

PERLIN DS. Current perspectives on echinocandin class drugs. **Future Microbiol**, v.6, n.04, p. 441-457, 2011.

PITARCH A, SÁNCHEZ M, NOMBELA C, GIL C. Sequential fractionation and two-dimensional gel analysis unravels the complexity of the dimorphic fungus *Candida albicans* cell wall proteome. **Mol Cell Proteomics**. v. 1, n. 12, p. 967-982, 2002.

PITARCH, A. et al. Analysis of the *Candida albicans* proteome. I. Strategies and applications. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 787, n. 1, p. 101-28, 2003.

- RAJAVEL, M. et al. Mid2 is a putative sensor for cell integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Cell Biol**, v. 19, n. 06, p. 3969-76, 1999.
- RAM AF, KLIS FM. Identification of fungal cell wall mutants using susceptibility assays based on Calcofluor white and Congo red. **Nat Protoc**, v. 1, n. 06, 2006.
- RIPPON JW, LARSON RA, ROSENTHAL DM, CLAYMAN J. Disseminated cutaneous and peritoneal hyalohyphomycosis caused by *Fusarium* species: three cases and review of the literature. **Mycopath**, v.101, n. 02 , p. 105-111.
- RHODES, J. C.; OLIVER, B. G.; ASKEW, D. S.; AMLUNG, T. W. Identification of genes of *Aspergillus fumigatus* up-regulated during growth on endothelial cells. **Med Mycol**, v. 39, p. 253-260, 2001.
- RHODES JC. *Aspergillus fumigatus*: growth and virulence. **Med Mycol**, v. 44, p. 77-81, 2006.
- RHOME R, DEL POETA M. Sphingolipid signaling in fungal pathogens. **Adv Exp Med Biol**, v. 688, p.232-237 2010.
- ROGG LE, FORTWENDEL JR, JUVVADI PR, LILLEY A, STEINBACH WJ. The chitin synthase genes *chsA* and *chsC* are not required for cell wall stress responses in the human pathogen *Aspergillus fumigatus*. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 411, n.03, p. 549-554, 2011.
- RONCERO C, VALDIVIESO MH, RIBAS JC, DURÁN A. Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to Calcofluor white. **J Bacteriol**, v.170, n.04, p.1950-1954, 1988.
- ROMERO B, TURNER G, OLIVAS I, LABORDA F, DE LUCAS JR. The *Aspergillus nidulans* *alcA* promoter drives tightly regulated conditional gene expression in *Aspergillus fumigatus* permitting validation of essential genes in this human pathogen. **Fungal Genet Biol**, v. 40, n.2, p.103-114, 2003.
- RONEN, R. et al. The *Aspergillus nidulans* *pkcA* gene is involved in polarized growth, morphogenesis and maintenance of cell wall integrity. **Curr Genet**, v. 51, n. 5, p. 321-9, 2007.

SAMANTARAY S, NEUBAUER M, HELMSCHROTT C, WAGENER J. Role of the guanine nucleotide exchange factor Rom2 in cell wall integrity maintenance of *Aspergillus fumigatus*. **Eukaryot Cell**, v. 12, n. 03, p. 288-298, 2013.

SCHMITZ HP, JÖCKEL J, BLOCK C, HEINISCH JJ. Domain shuffling as a tool for investigation of protein function: substitution of the cysteine-rich region of Raf kinase and PKC eta for that of yeast Pkc1p. **J Mol Biol**, v. 311, n. 01, p.1-7, 2001.

SHEA JM, DEL POETA M. Lipid signaling in pathogenic fungi. **Curr Opin Microbiol**, v. 9, n. 04, 2006.

SUGITA T, TAKEO K, OHKUSU M, VIRTUDAZO E, TAKASHIMA M, ASAKO E, OHSHIMA F, HARADA S, YANAKA C, NISHIKAWA A, MAJOROS L, SIPCZKI M. Fluconazole-resistant pathogens *Candida inconspicua* and *C. norvegensis*: DNA sequence diversity of the rRNA intergenic spacer region, antifungal drug susceptibility, and extracellular enzyme production. **Microbiol Immunol**, v. 48, n. 10, p. 761-766, 2004.

STEINBACH WJ, BENJAMIN DK. New antifungal agents under development in children and neonates. **Curr Opin Infect Dis**, v. 18, n. 06, p. 484-489, 2005.

STEINBACH WJ, MARR KA, ANAISSIE EJ, AZIE N, QUAN SP, MEIER-KRIESCHE HU, APEWOKIN S, HORN DL. Clinical epidemiology of 960 patients with invasive aspergillosis from the PATH Alliance registry. **J Infect**, v.65, n.05, p. 453-464, 2008.

STEVENS DA. Vaccinate against aspergillosis! A call to arms of the immune system. **Clin Infect Dis**, v. 38, n.08, p. 1131-1136, 2004.

SUGIYAMA K, KAWAMURA A, IZAWA S, INOUE Y. Role of glutathione in heat-shock-induced cell death of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochem J**, v. 352, n. 01, p. 71-78, 2000.

PALOUŠOVÁ D, LENGEROVÁ M, VOLFOVÁ P, BEJDÁK P, KOČMANOVÁ I, MAYER J, RÁČIL Z. Invasive fungal infections in immunocompromised patients with focus on aspergillosis and its causative agents. **Klin Mikrobiol Infekc Lek**, v.18, n.04, p.96-101, 2012.

PATTERSON K, STREK ME. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. **Proc Am Thorac Soc**, v.7, n.03, p.237-244, 2010.

TEEPE AG, LOPRETE DM, HE Z, HOGGARD TA, HILL TW. The protein kinase C orthologue PkcA plays a role in cell wall integrity and polarized growth in *Aspergillus nidulans*. **Fungal Genet Biol**, v. 44, n. 06, p. 554-562, 2006.

TRUMAN AW, KIM KY, LEVIN DE. Mechanism of Mpk1 mitogen-activated protein kinase binding to the Swi4 transcription factor and its regulation by a novel caffeine-induced phosphorylation. **Mol Cell Biol**, v. 29, n. 24, p. 6449-6461, 2009.

VALIANTE V, HEINEKAMP T, JAIN R, HÄRTL A, BRAKHAGE AA. The mitogen-activated protein kinase MpkA of *Aspergillus fumigatus* regulates cell wall signaling and oxidative stress response. **Fungal Genet Biol**, v. 24, n. 05, p. 618-627, 2007.

VALIANTE, V. et al. The MpkA MAP kinase module regulates cell wall integrity signaling and pyomelanin formation in *Aspergillus fumigatus*. **Fungal Genet Biol**, v. 46, n. 12, p. 909-18, Dec 2009.

VERNA, J. et al. A family of genes required for maintenance of cell wall integrity and for the stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 25, p. 13804-9, Dec 9 1997.

VERWER PE, VAN DUIJN ML, TAVAKOL M, BAKKER-WOUDENBERG IA, VAN DE SANDE WW. Reshuffling of *Aspergillus fumigatus* cell wall components chitin and  $\beta$ -glucan under the influence of caspofungin or nikkomycin Z alone or in combination. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 03, p. 1595-1598, 2012.

WALSH TJ, DRISCOLL T, MILLIGAN PA, WOOD ND, SCHLAMM H, GROLL AH, JAFRI H, ARRIETA AC, KLEIN NJ, LUTSAR I. Pharmacokinetics, safety, and tolerability of voriconazole in immunocompromised children. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 10, p. 4116-4123, 2010.

WARING RB, MAY GS, MORRIS NR. Characterization of an inducible expression system in *Aspergillus nidulans* using *alcA* and tubulin-coding genes. **Gene**, v. 79, n. 01, p. 119-130, 1989.

WATANABE, M.; CHEN, C. Y.; LEVIN, D. E. *Saccharomyces cerevisiae* PKC1 encodes a protein kinase C (PKC) homolog with a substrate specificity similar to that of mammalian PKC. **J Biol Chem**, v. 269, n. 24, p. 16829-36, 1994.

WATANABE, Y.; IRIE, K.; MATSUMOTO, K. Yeast RLM1 encodes a serum response factor-like protein that may function downstream of the Mpk1 (Slf2) mitogen-activated protein kinase pathway. **Mol Cell Biol**, v. 15, n. 10, p. 5740-9, Oct 1995.

YKEN HM ,DAGUE E, BITAR R, RANCHON H, DURAND F, FRANÇOIS JM. An atomic force microscopy analysis of yeast mutants defective in cell wall architecture. **Yeast**, v. 27, n. 08, p. 673-84, 2010.

ZYGMUNT WA. Intracellular Loss of Potassium in *Candida albicans* After Exposure to Polyene Antifungal Antibiotics. **Appl Microbiol**, v. 14, n. 06, p. 953-956, 1966.