



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
CURSO DE FARMÁCIA**

NATHÁLIA CARVALHO PINHEIRO

CARACTERIZAÇÃO DO MUTANTE DA HIDROFOBINA HydA DE *FONSECAEA PEDROSOI*.

BRASÍLIA, 2019.

NATHÁLIA CARVALHO PINHEIRO

CARACTERIZAÇÃO DO MUTANTE DA HIDROFOBINA HydA DE *FONSECAEA PEDROSOI*.

Monografia de Conclusão de Curso apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Farmacêutico, na Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia.

Orientador: Profa. Dra. Larissa Fernandes Matos

BRASÍLIA, 2019.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

PP654c Pinheiro, Nathália
Caracterização do mutante da hidrofobina HydA de
Fonsecaea pedrosoi / Nathália Pinheiro; orientador Larissa
Matos. -- Brasília, 2019.
55 p.

Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade de
Brasília, 2019.

1. Fonsecae pedrosoi. 2. hidrofobina. 3.
hidrofobicidade. 4. conídio. 5. proteína. I. Matos, Larissa,
orient. II. Título.

NATHÁLIA CARVALHO PINHEIRO

**CARACTERIZAÇÃO DO MUTANTE DA HIDROFOBINA HydA DE
FONSECAEA PEDROSOI.**

BANCA EXAMINADORA


Profa. Dra. Larissa F. Matos
Universidade de Brasília
FCE/UNB
Matr. FUB 1029088

Orientador: Profa. Dra. Larissa Fernandes Matos
(Universidade de Brasília – UnB / Faculdade de Ceilândia - FCE)

Prof. Dr. Alex Pereira Leite
(Universidade de Brasília – UnB / Faculdade de Ceilândia - FCE)

Profa. Dra. Patrícia Andrade Albuquerque Nicola
(Universidade de Brasília – UnB / Faculdade de Ceilândia - FCE)

BRASÍLIA, 2019.

AGRADECIMENTOS

Finalmente, chegou o fim. O fim de uma dura e incrível jornada acadêmica. Olhando para trás eu vejo o quanto Deus foi bom e misericordioso comigo. Ele me proporcionou oportunidades que nem eu mesma imaginava ter. Durante a graduação tive o prazer de participar de projetos, congressos, pesquisas. Recebi bolsas de fomento à pesquisa e extensão. Conheci pessoas incríveis. Viajei para lugares maravilhosos. E uma palavra que resume isso tudo é gratidão.

Agradeço a Deus pelo cuidado.

Aos meus pais (Ivone e Jessé) e minha irmã (Amanda), por serem minha base, minha segurança e motivação.

Aos familiares e amigos pelas palavras de incentivo.

Ao meu noivo (Erick) pelo companherismo e paciência.

Aos meus colegas de laboratório pelas trocas de conhecimento.

Ao meu grupo de pesquisa por todo suporte técnico e emocional, especialmente, à Luísa que foi meu braço direito desde o começo desse trabalho.

Ao Lucas pelo engajamento e realização de todos os experimentos de imunologia.

Ao Rafael pela ajuda nas análises estatísticas.

À professora Anamélia pela colaboração.

Ao CNPq, FAP-DF e UnB pelas bolsas de fomento.

Por fim, agradeço à Professora Larissa, minha orientadora, por todo conhecimento e tempo dedicado à mim. Ao meu ensino, ao meu crescimento pessoal e profissional.

Por tudo isso e muito mais, estendo a todos meu muitíssimo obrigada !

*“Você não sabe o quanto eu caminhei
para chegar até aqui.”*
Cidade Negra

RESUMO

O gene *hydA* produz uma proteína hidrofóbica da classe das hidrofobinas. As hidrofobinas são um grupo de proteínas de baixo peso molecular que apresentam em sua constituição vários aminoácidos hidrofóbicos, quatro pontes dissulfeto e oito resíduos de cisteína em padrão conservado. A camada hidrofóbica produzida por essas proteínas medeiam interações entre o fungo e ambiente, exercendo papéis no ciclo de vida e na patogenicidade dos fungos, além de modular a resposta imune do hospedeiro. Por meio da construção de um mutante *knock out*, foi possível analisar o papel do gene *hydA* na biologia e patogenicidade de *Fonsecaea pedrosoi*, o principal agente etiológico da comoblastomicose. Mediante a construção de uma árvore filogenética foi possível identificar alta similaridade de HydA com hidrofobinas de classe 1, porém por microscopia eletrônica de varredura não foi observada a presença de *rodlet* na superfície do conídio de *F. pedrosoi*. A ausência do gene proporcionou alterações na superfície e na morfologia do conídio o que pode ter contribuído para alterar o caráter hidrofóbico do conídio, visto que apresentaram maior afinidade pela água. Essas alterações não influenciaram na susceptibilidade a agentes osmóticos e estressores da parede com exceção ao SDS em que o mutante se mostrou mais resistente. Por microscopia de fluorescência, identificou-se que a expressão da proteína HydA parece ser conídio-específica. É provável que HydA não exerça um papel imunoprotetor na CBM, mas promove modulação da IL-10. Nessa perspectiva, apesar de HydA parecer não desempenhar um papel importante na imunoproteção é essencial para estrutura, morfogênese e hidrofobicidade do conídio de *F.pedrosoi*.

Palavras-chave: Hidrofobinas, *Fonsecaea pedrosoi*, hidrofobicidade, conídio.

ABSTRACT

The *hydA* gene produces a hydrophobic protein of the hydrophobin class. Hydrophobins are a group of low molecular weight proteins that have in their constitution several hydrophobic amino acids, four disulfide bridges and eight conserved cysteine residues. The hydrophobic layer produced by these proteins mediated interactions between the fungi and the environment playing role in the fungi life cycle and pathogenicity also modulating the host immune response. Through the construction of a knock out mutant, it was possible to analyze the functions of the *hydA* gene in the biology and pathogenicity of *Fonsecaea pedrosoi*, the main etiological agent of comoblastomycosis. Through the construction of a phylogenetic tree it was possible to identify high similarity of HydA with class 1 hydrophobins. However, by scanning electron microscopy the presence of rodlet on the surface of *F. pedrosoi* conidial was not observed. The absence of the gene led to changes in the surface and morphology of the conidial, which may have contributed to alter the hydrophobic character of the conidial because they showed great affinity for water and easy wettability. These changes did not influence the susceptibility to osmotic agents and wall stressors except for the SDS that the mutant was more resistant. By fluorescence microscopy, it was identified that HydA protein expression appears to be conidial-specific. It is likely that HydA does not play an immunoprotective role in CBM, but promotes IL-10 modulation. Therefore, although HydA does not appear to play an important role in immunoprotection, it is essential for the structure, morphogenesis and hydrophobicity of *F. pedrosoi* conidial.

Keywords: Hydrophobins, *Fonsecaea pedrosoi*, hydrophobicity, conidial.

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Oligonucleotídios utilizados nesse trabalho	9
--	---

LISTA DE FIGURA

Figura 1: Hidrofobinas presentes na superfície de conídios observadas por microscopia de varredura.....	5
Figura 2: Alinhamento das sequências de aminoácidos entre as hidrofobina de <i>A. fumigatus</i> e <i>F.pedrosoi</i>	17
Figura 3: Construção do cassete de deleção por PCR-DJ e Eletroforese para confirmação da amplificação dos fragmentos do cassete de deleção.....	18
Figura 4: Obtenção dos transformantes a 25 °C após 20 dias de crescimento.....	19
Figura 5: Confirmação da deleção de <i>hydA</i> em <i>F. pedrosoi</i>	20
Figura 6: Avaliação do crescimento e viabilidade de $\Delta hydA$	21
Figura 7: Avaliação da hidrofobicidade dos conídios de $\Delta hydA$	24
Figura 8: Morfologia dos conídios por microscopia de varredura.....	26
Figura 9: Susceptibilidade a agentes osmóticos e estressores de parede após 14 dias a 25°C em Sabouraud ágar suplementado com CalcoFluor White 1,5 mg/mL, Congo Red 1%, NaCl 0,75M, Sorbitol 0,75 M e SDS 0,0125%.....	28
Figura 11: Reconstituição do gene <i>hydA</i>	32
Figura 12: Infecção subcutânea em coxim plantar de camundongos Nude de BALB/c com propágulos fúngicos de <i>F.pedrosoi</i>	34

LISTA DE SIGLAS

CEUA – Comissão de Ética no Uso Animal
CO₂ – Dióxido de Carbono
HYG – Higromicina B
DNA – Ácido Desoxirribonucléico
EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
ELISA – Ensaio de Ligação Imunoenzimático
EPI – Equipamento de Proteção Individual
EtOH – Etanol
HCl – Ácido Clorídrico
IL – Interleucina
kb – Kilobase
LACEN – Laboratório Central de Saúde Pública
mL – Mililitro
mM – Milimolar
µg – Microgramas
µm – Micrômetro
NaCl – Cloreto de Sódio
NaOAc – Acetato de Sódio
NAT – Nourseotricina
NCBI – National Center for Biotechnology Information
nm – Nanômetro
ORF – Fase de Leitura Aberta
pb – Pares de base
PBS – Tampão Fosfato Salino
PCR – Reação em Cadeia de Polimerase
pg – Picogramas
pH – Potencial Hidrogeniônico
RPM – Rotações por minuto
RNase A – Ribonuclease A
SAB – Sabouraud
SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

TNF – Fator de Necrose Tumoral

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

WT – Linhagem selvagem

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 Cromoblastomicose - Uma doença negligenciada.....	2
2.2 Fonsecaea pedrosoi – O fungo negro	3
2.3 Hidrofobinas – Proteínas hidrofóbicas	4
2.4 Caracterização do papel das hidrofobinas em fungos filamentosos.....	6
3. JUSTIFICATIVA	7
4. OBJETIVOS	8
4.1 Objetivo Geral	8
4.2 Objetivos Específicos	8
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	8
5.1 Linhagem e cultivo de F. pedrosoi.....	8
5.2 Desenho de oligonucleotídeos para construção dos cassetes.....	8
5.3 Construção do cassete de deleção.....	10
5.4 Transformação por Biobalística	10
5.5 Extração de DNA.....	11
5.6 PCR e Southern Blot para confirmação da deleção.....	11
5.7 Construção do cassete para citolocalização.....	12
5.8 Construção do cassete para reconstituição do gene hydA	12
5.9 Análise da sequência de aminoácidos.....	13
5.10 Estabilidade mitótica.....	13
5.11 Germinação dos conídios	13
5.12 Viabilidade dos conídios.....	13
5.13 Solubilidade do conídio em água e óleo	14
5.14 Tempo de absorção da gota de água	14
5.15 Morfologia dos conídios.....	14
5.16 Susceptibilidade aos agentes osmóticos e estressores de parede	15
5.17 Infecção in vivo com propágulos fúngicos de F. pedrosoi e análise da progressão da doença	15
5.17.1 Carga fúngica em coxim plantar.....	15
5.17.2 Dosagem de citocinas.....	16
5.17.3 Análises estatísticas	16
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
6.1 Análise da sequência de hydA	16
6.2 Obtenção do mutante de HydA	18
6.3 Caracterização funcional de HydA.....	20

6.3.1 Citolocalização de HydA	28
6.4 Reconstituição do gene HydA	31
6.5 Caracterização do papel de HydA na patogenicidade de <i>F. pedrosoi</i>	32
7. CONCLUSÃO.....	36
8. REFERÊNCIAS.....	37

1. INTRODUÇÃO

As hidrofobinas foram descobertas mediante análise dos genes que eram expressos durante desenvolvimento de conidiosporos de *Schizophyllum commune*. Sem conhecer a natureza das proteínas, mas com base no padrão das sequências proteicas, Wessels *et al.*(1991) caracterizou as hidrofobinas como proteínas com baixo peso molecular, que apresentam alta proporção de aminoácidos hidrofóbicos, 4 pontes dissulfeto e a presença de 8 resíduos de cisteínas. Após a descoberta em *S. commune*, as hidrofobinas foram identificadas em diversos fungos filamentosos (LINDER *et al.*, 2005).

A primeira hidrofobina a ser caracterizada foi a RodA em *Aspergillus fumigatus*. Por meio de microscopia eletrônica foi possível identificar que a proteína estava localizada na superfície do conídio e era responsável por formar feixes ordenados semelhantes a digitais denominadas *rodlet* (THAU *et al.*, 1994; VELSECCHI *et al.*, 2018). A segunda foi caracterizada em *Aspergillus nidulans* mediante a expressão de DewA. Observou-se que apesar de contribuir para hidrofobicidade do conídio, DewA não alterava a estrutura de *rodlet* do conídio indicando que apesar de estarem relacionadas às características hidrofóbicas nem todas as hidrofobinas são capazes de formar *rodlet* e nem todos os fungos apresentam apenas uma hidrofobina (GRÜNBERGER *et al.*, 2014)

A camada hidrofóbica apesar de exercer função morfológica e estrutural, também está relacionada a vários processos morfogênicos fúngicos como germinação, desenvolvimento, viabilidade e dispersão de conídios. Além disso, exerce papel imunoprotetor, uma vez que impede o reconhecimento do patógeno pelo sistema imune inato e adaptativo dificultando o combate à infecção. (QUARANTIN *et al.*, 2019). Conforme dados obtidos por Zhang *et al.* (2011) nem sempre a ausência dos genes de hidrofobina gera fenótipos distinguíveis entre as linhagens selvagem e mutante, indicando que as hidrofobinas podem exercer papéis diferentes a depender do fungo.

Fonsecaea pedrosoi é o principal agente etiológico da cromoblastomicose, doença fúngica com distribuição mundial e prevalência em regiões tropicais e subtropicais (SANTOS *et al.*, 2007). A doença é adquirida por meio da implantação traumática de propágulos fúngicos que penetram no tecido subcutâneo e ao longo de anos desenvolvem lesões polimórficas (ALMEIDA *et al.*, 2014). Estas são apenas

removidas por métodos físicos, já que os antifúngicos disponíveis não são eficientes no tratamento. Esse fator leva, muitas vezes, à perda total ou parcial da capacidade funcional do membro atingido.

Pouco se sabe sobre os mecanismos que se *F. pedrosoi* utiliza para persistir no hospedeiro e desencadear a doença. Sendo assim, esse trabalho visa elucidar o papel do hidrofobina HydA na biologia e no estabelecimento da patogênese de *F. pedrosoi*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cromoblastomicose - Uma doença negligenciada.

A cromoblastomicose é uma doença fúngica ocupacional (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017) causada por *F. pedrosoi* que é um fungo filamentoso demáceo. Apresenta distribuição mundial, sendo prevalente em áreas de clima quente e úmido característico de regiões tropicais e subtropicais. África, Ásia e países da América Latina apresentam maior incidência. No Brasil, as áreas endêmicas se concentram no norte, sul e sudeste do país (SANTOS *et al.*, 2007).

A ausência de alguns dados sobre essa micose se deve ao fato de que ela não é uma doença de notificação compulsória. Sendo assim, a cromoblastomicose é enquadrada como doença negligenciada. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), doenças negligenciadas são causadas por microorganismos e parasitas que afetam pessoas em situação de vulnerabilidade social. Como moradores de áreas rurais, zonas de conflito e favelas urbanas possuem pouco acesso à saúde e baixo apoio político, as doenças que os afetam não estão na lista de prioridades para o sistema público de saúde. (QUEIROZ-TELLES, 2015; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017).

Diante desse cenário, os trabalhadores rurais envolvidos na agricultura são classificados como principal grupo de risco para o desenvolvimento da cromoblastomicose, visto que, normalmente, não fazem uso de EPI's (equipamentos de proteção individual). Isso contribui para o aumento da exposição e do contato com o agente etiológico que está presente no solo e na vegetação favorecendo a auto inoculação. (SILVA,2017).

A inoculação acontece de forma traumática. Isso possibilita a penetração de fragmentos de hifas e conídios no tecido subcutâneo levando o aparecimento de lesões polimórficas que podem ser placas, nódulos ou verrugas. À vista disso, membros inferiores são comumente mais afetados, porém orelha, pescoço, abdômen, peitoral, mãos, braços e face também podem ser lesionados (SANTOS *et al.*, 2007, ALMEIDA *et al.*, 2014)

Há um longo período entre a inoculação e o estabelecimento da doença. Devido a cronicidade, as lesões apresentam maiores chances de sofrerem transformações neoplásicas o que pode favorecer o desenvolvimento de câncer de pele. Além disso, são bastante susceptíveis a infecções e podem progredir para erisipela, linfedema e elefantíase o que pode incapacitar o indivíduo de maneira permanente e comprometer sua qualidade de vida. (ALMEIDA *et al.*, 2014; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2015; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017; SILVA, 2017).

2.2 *Fonsecaea pedrosoi* – O fungo negro

Proveniente da família *Herpotrichiellaceae*, *F. pedrosoi* é considerado um fungo ubíquo. Pode ser encontrado no solo, água, matéria orgânica em decomposição e vegetação como a planta *Mimosa pudica*, conhecida popularmente como dormideira, que é fonte natural de infecção. *F. pedrosoi* é o agente etiológico mais prevalente na cromoblastomicose, porém em menor incidência, há casos descritos com outros patógenos como *Phialofora verrucosa*, *Cladosporium carrionii* e *Rhinocladiella aquaspersa* (FERRAZ, 2011; ALMEIDA *et al.*, 2014).

As colônias de *F. pedrosoi* são negras, felpudas e aveludadas, elevadas no centro e planas nas extremidades. Em meio de cultura o crescimento é lento. As hifas são septadas e possuem coloração levemente marrom. Os conídios apresentam morfologia similar a um barril com coloração castanha. Os conidiósporos têm pigmentação escura devido a presença de melanina. A melanina permite o desenvolvimento do fungo em ambientes ensolarados, uma vez que favorece capacidade fotoprotetora. Além disso, atua como um fator de virulência contribuindo para mecanismos de evasão da resposta imune no hospedeiro. (HAYAKAWA *et al.* 2006; SANTOS *et al.*, 2007; ALMEIDA *et al.*, 2014).

As espécies de *Fonsecaea* apresentam ótimo crescimento a 33°C e crescimento máximo a 37°C (SALGADO, 2010). Em se tratando de virulência, o

desenvolvimento de um microrganismo pode ser favorecido pela produção de determinados componentes como enzimas (fosfolipase, urease, lipase), componentes da parede celular e pigmentos (melanina). Em *F. pedrosoi* não só a presença da melanina, mas também a capacidade de diferenciação celular das hifas e conídios em células muriformes contribuem para a virulência do fungo. (SILVA, 2017).

As células muriformes, forma patogênica de *F. pedrosoi*, são comumente encontradas no tecido lesionado, sendo um achado patognomônico para o diagnóstico da cromoblastomicose. Também conhecidas como células escleróticas, as células muriformes possuem divisão transversa e longitudinal, apresentam parede espessa e coloração marrom, visto que a melanina faz parte de sua composição. Para o fungo, o dimorfismo não é apenas uma forma de adaptação ao hospedeiro, mas um parasitismo bem-sucedido que é refletido na cronicidade da doença (MOUCHALOUAT, 2008).

Os eventos que contribuem para a patogenicidade desse fungo ainda são pouco conhecidos, porém sabe-se que, até o presente momento, o fungo não responde positivamente ao tratamento com os antifúngicos disponíveis no mercado. Ou seja, há baixa efetividade terapêutica e graves efeitos colaterais (SANTOS *et al.*, 2007). Diante disso, entende-se a importância da constante busca de conhecimento sobre o fungo e a doença a fim de auxiliar no melhor entendimento de aspectos fisiopatológicos de *F. pedrosoi* para que, futuramente, terapias mais eficientes e seguras possam ser desenvolvidas para o combate da cromoblastomicose.

2.3 Hidrofobinas – Proteínas hidrofóbicas

Hidrofobinas são proteínas anfifílicas de baixo peso molecular produzidas por fungos filamentosos. Porém não são exclusivas desse grupo, uma vez que também foram encontradas em fungos dimórficos, ou seja, fungos que apresentam em seu ciclo de vida a forma filamentosa como *Paracoccidioides brasiliensis* (ALBUQUERQUE *et al.*, 2004). As hidrofobinas podem representar até 10% do total de proteínas secretadas por esses fungos. Suas principais características são o perfil de hidrofobicidade, a presença de 8 resíduos de cisteínas em padrão conservado e 4 pontes de sulfeto intramolecular. (MOSBACH *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2011; DUBEY *et al.*, 2014; GRÜNBACHER *et al.*, 2014; VELSECCHI *et al.*, 2017;

QUARANTIN *et al*, 2019).

Presentes na superfície externa da parede celular, as hidrofobinas formam uma camada anfifílica que medeia interações entre o fungo e o ambiente. A região hidrofóbica fica exposta para o ambiente externo enquanto que a região hidrofílica fica em contato com os polissacarídeos da parede celular. Essa disposição confere ao conídio propriedades repelentes à água que favorece a dispersão pelo ambiente, evita dessecação ou umedecimento. Em alguns fungos, as hidrofobinas também estão presentes na parede das hifas impedindo que elas não se dissolvam em substratos aquosos e possam desenvolver micélios aéreos (MOSBACH *et al.*, 2011; DUBEY *et al.*, 2014; QUARANTIN *et al*, 2019)

De acordo com o perfil de hidrofobicidade, os padrões de hidropatia e morfologia das camadas hidrofóbicas, as hidrofobinas são classificadas em classe 1 e classe 2. As de classe 1 apresentam fibras amilóides funcionais organizadas em camadas (*rodlet*) presentes na superfície da parede e conferem alta hidrofobicidade. Sendo assim, são insolúveis em água, SDS e ácidos fortes. Já as hidrofobinas de classe 2 não apresentam hastes fibrilares proporcionando camadas sem morfologia definida, fator que diminui a hidrofobicidade e torna possível a solubilização com solventes orgânicos e SDS. (DUBEY *et al.*, 2014; VELSECCHI *et al.*, 2017) Um método comum para identificação de hidrofobina de classe 1 é a detecção das fibras amilóides semelhantes a digitais que podem ser observadas por microscopia eletrônica ou de força atômica.

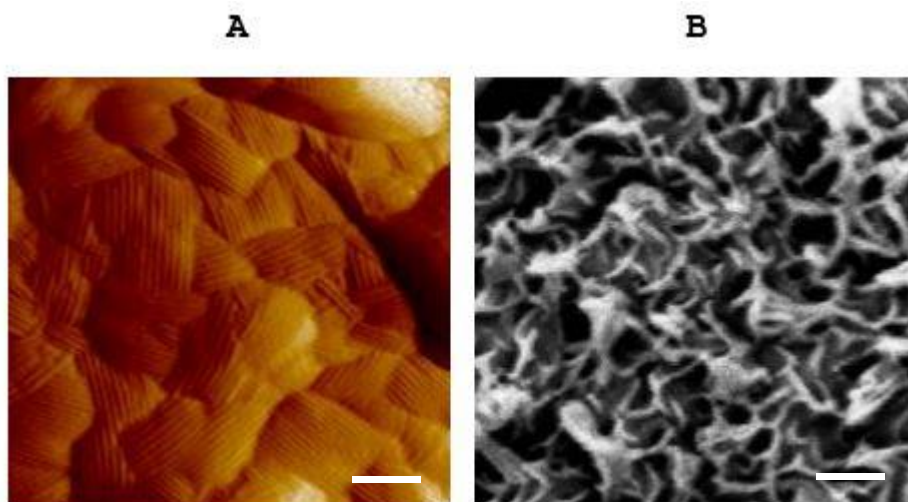


Figura 1: Camada hidrofóbica presente na superfície de conídios observadas por microscopia de varredura. A) Hidrofobina de classe 1 presente no conídio de *Aspergillus fumigatus* (200 nm). B) Hidrofobina de classe 2 presente no conídio de *Botrytis cinerea* (250nm). Fonte: (VELSECCHI *et al*, 2017 e MOSBACH *et al*, 2014)

As hidrofobinas exercem diversas funções: atuam como surfactante natural diminuindo a tensão superficial do meio e facilitam adesão à superfície do hospedeiro favorecendo o desenvolvimento de estruturas de penetração durante as interações simbióticas ou patogênicas. Além disso, estão envolvidas no processo de esporulação, germinação, dispersão de conídios, desenvolvimento de hifas aéreas e formação de corpos de frutificação. (HEDDERGOTT *et al.*, 2012; DUBEY *et al.*, 2014; VELSECCHI *et al.*, 2018).

As proteínas hidrofóbicas também podem contribuir para virulência do fungo uma vez que conseguem modular a resposta imune do hospedeiro, visto que a camada hidrofóbica mascara componentes imunogênicos presentes na parede celular dificultando o reconhecimento, a fagocitose do conídio e a ativação de células imunes (CARRION *et al.*, 2013).

2.4 Caracterização do papel das hidrofobinas em fungos filamentosos

No dermatófito *Arthroderma benhamiae*, o mutante de *hypA* apresentou maior capacidade de absorção de água tanto em hifas quanto conídios indicando perda da hidrofobicidade em ambos morfotipos. A ausência da camada de *rodlet* tornou a superfície do conídio amorfa. Houve melhor reconhecimento do patógeno pelo sistema imune o que ocasionou aumento da ativação de neutrófilos e células dendríticas, da formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) e da produção de imunomediadores como IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- α . (HEDDERGOTT *et al.*, 2012)

No fungo patogênico humano *A. fumigatus*, o mutante de *rodA* apresentou perda da camada de *rodlet* o que proporcionou característica amorfa à superfície do conídio contribuindo para o aumento da hidrofiliabilidade e plasticidade do conídio. Houve alteração na morfologia dos conídios, maior permeabilidade, maior resistência aos agentes estressores de parede como Calcofluor White e Congo Red e maior sensibilidade a choques mecânicos. Os conídios foram facilmente reconhecidos pelo sistema imune, proporcionaram indução e maturação de células dendríticas e liberação de citocinas como IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 E TNF- α , porém foram tão virulentos quanto a linhagem selvagem. (THAU *et al.*, 1994; AIMANIANDA *et al.*, 2009; VALSECCHI *et al.*, 2017). Em *Neurospora crassa* a proteína hidrofóbica produzida por EAS é homóloga à proteína RodA produzida por

A. fumigatus e *Aspergillus nidulans*. Sendo assim, o mutante de EAS também apresentou perda da camada de *rodlet* e presença de uma superfície conidial amorfa (LAUTER *et al.*, 1992)

A ausência de hidrofobinas no fitopatógeno *Fusarium graminearum* proporcionou redução no crescimento, mas não na esporulação. Não foram observados defeitos na morfologia das estruturas de infecção do fungo, porém as hifas apresentaram menor capacidade de penetração na interface água-ar o que contribuiu para reduzir a virulência, uma vez que elas apresentam dificuldades para aderir em superfícies hidrofóbicas. (QUARANTIN *et al.*, 2019).

No entanto, os mutantes do fitopatógeno *B. cinerea*, quando comparados a linhagem selvagem, não apresentaram diferenças nas propriedades da superfície do esporo e do micélio, nem durante a germinação, crescimento, formação de escleródio e virulência. Por microscopia de varredura, identificou-se que as superfícies dos conídios, seja de linhagem de mutante ou selvagem, não apresentaram as típicas camadas de *rodlet* formadas pelas hidrofobinas. Esse achado quebra o paradigma de que as hidrofobinas estão envolvidas na formação da superfície hidrofóbica que confere hidrofobicidade ao conídio e coloca em cheque o papel universal das hidrofobinas em fungos filamentosos. (MOSBACH *et al.*, 2011)

F.pedrosoi apresenta em seu genoma o gene *hydA*, mas nada se sabe sobre seu papel nesse fungo. Diante disso, esse trabalho se propõe a avaliar o papel da hidrofobina HydA em *F.pedrosoi* por meio da construção de um mutante *knock out*.

3. JUSTIFICATIVA

O gene *hydA* foi escolhido para avaliação do papel de hidrofobina em *F.pedrosoi* porque ele é responsável por produzir uma camada hidrofóbica que recobre a parede celular de conídios. Em diversos fungos, a presença dessa proteína está relacionada a propriedades estruturais, reprodutivas, patológicas e imunológicas do conídio. Nessa perspectiva, o estudo funcional da proteína hidrofóbica expressa por *hydA* será importante para análise de fatores biológicos e fisiopatológicos ainda pouco conhecidas para o fungo patogênico humano *F. pedrosoi*.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Elucidar o papel da hidrofobina expressa pelo gene *hydA* na biologia e no estabelecimento da patogênese de *F. pedrosoi*.

4.2 Objetivos Específicos

1. Construir cassete de deleção de *hydA* para avaliar o papel da hidrofobina em *F. pedrosoi*;
2. Deletar o gene *hydA* para obter o mutante $\Delta hydA$;
3. Caracterizar o fenótipo e patogenicidade do mutante .

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Linhagem e cultivo de *F. pedrosoi*

CBS 271.37 (ATCC® 18658) foi a linhagem de *F. pedrosoi* utilizada. Ela e os mutantes aqui gerados foram mantidos em ágar Sabouraud (4% dextrose, 1% peptona e 2% ágar, pH 5,6) a 28 °C e 170 rpm. Para obtenção de conídios, as culturas foram iniciadas a partir de conídios armazenados a -80° C em glicerol 25% inoculados em caldo batata (10% batata e 1% dextrose, pH 5,6) e incubados a 28 °C por 7 dias sob agitação constante. Após este período, os conídios foram purificados com filtros de lãs de vidro, lavados e resuspendidos com solução salina (0,9% NaCl).

5.2 Desenho de oligonucleotídeos para construção dos cassetes

O banco de dados NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) foi o utilizado para identificação do gene e da sequência proteica de *hydA* (XP_013289316.1) de *F. pedrosoi* após uso da ferramenta BLASTp com a sequência de RodA (EAL91643.1) de *A. fumigatus*. Para o desenho dos oligonucleotídeos foi utilizado programa online Primer3Plus(<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>).

Parâmetros como temperatura de anelamento, formação de hairpin, selfdímero e heterodímero foram avaliadas.

Tabela 1- Oligonucleotídeos utilizados nesse trabalho.

Oligonucleotídeo	Sequência 5' - 3'
1 >> Fp 139	AGTGCCACCCGATCAGACTC
2 >> Fp 140	AATATCAGTTAACGTCGCGGGAGCTGGGGAGAGGACATGA
3 >> Fp 90	CCGCGACGTTAACTGATATT
4 << Fp 15	CGTCTGCTGCTCCATAACAAGC
5 >> Fp 16	CATATGCGCGATTGCTGATCC
6 << Fp 91	GTGGAGCCAAGAGCGGATT
7 >> Fp 141	AATCCGCTCTTGGCTCCACCAACGACGTGGTTCCCTTTC
8 << Fp 142	CCCAGGTATCTCGAGGCTTTC
9 >> Fp 143	AGGGGTTCTGCAAGGTGACA
10 << Fp 144	AAATACGCTACCCCGGACCA
11 >> Fp 145	CGAGTTGACTGTGACCAAG
12 << Fp 146	ACCCTGAGCGATGTTAGGTG
Fp 178	AAGGCCGATGGGAGTGCA
Fp 179	TGCACTCCCATCGGCCTTTCTATCACCATGGTGAGCAAG
Fp 180	GGAATTCCATATGTCTCTGAAACCAGGAAGC

5.3 Construção do cassete de deleção

O cassete foi construído por PCR *Double Joint* conforme descrito por Kim *et al.* (2009). A primeira etapa da construção se deu pela amplificação das regiões flanqueadoras 5' (992 pb) e 3' (995 pb) de *HydA* usando os oligonucleotídios Fp 139 + Fp 140 e Fp 141 + 142, respectivamente. E as regiões 5' (1109 pb) e 3' (984 pb) do gene de Resistência à Higromicina B (*HYG^R*) com os oligonucleotídios Fp 90 + Fp 15 e Fp 91 + Fp 16, respectivamente. Nessa etapa, utilizou-se a enzima *UnitaqDNA* polimerase®. A segunda etapa possibilita a fusão dos produtos obtidos na PCR anterior produzindo dois novos fragmentos: 5'*hydA*+*HYG^R* (2,1 kb) com a combinação dos oligonucleotídios Fp 139 + Fp 15 e 3'*hydA*+*HYG^R* (1,9 kb) com os oligonucleotídios Fp 142 + Fp 16. A enzima *LongAmp*® foi utilizada nessa etapa. A terceira e última etapa é a inserção do cassete de deleção em conídios germinados de *F. pedrosoi* via biobalística. Dentro do fungo, o cassete de deleção poderá substituir o gene de origem (*hydA*) por recombinação homóloga. (Figura 3A)

5.4 Transformação por Biobalística

A linhagem CBS 271.37 foi inoculada em caldo de batata a 28°C, 170 rpm e crescida por 7 dias. Após esse período, os conídios foram purificados com filtro de lã de vidro e lavados com solução salina (NaCl 0,9%). Em seguida, 1×10^9 conídios foram inoculados em 100 mL de Sabouraud líquido para germinar por 48h. Os conídios germinados foram centrifugados, lavados com solução salina (NaCl 0,9 %) e distribuídos em membrana de celofane sobre placas de Sabouraud ágar. Após secarem por 1 h no fluxo laminar, os conídios de *F. pedrosoi* foram bombardeados com 5 µg do cassete de deleção precipitado em partículas de tungstênio M10 conforme descrito por Florencio *et al.* (2018). As placas foram incubadas em estufa a 25° C por 24h. Após esse período, as placas foram raspadas com solução salina (NaCl 0,9 %) e a suspensão de conídios foi transferida para um meio seletivo (SAB com 50 µg/mL de Higromicina B). Após 20 dias, as colônias que cresceram no meio seletivo foram escolhidas aleatoriamente para extração de DNA genômico.

5.5 Extração de DNA

As colônias foram coletadas com palito diretamente do meio seletivo. O material coletado foi adicionado em um microtubo de 1,5 mL contendo pérolas de vidro 600 nm; 0,25 mL de tampão TENTS (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM, NaCl 100mM, Triton 2% e SDS 1%) e 0,25 mL de fenol clorofórmio. A mistura foi incubada no gelo por 5 min e transferida para o Tissue lyser 33 Hz por 10 min . Após isso, a amostra foi centrifugada por 5 min na velocidade máxima para separação de fases. A fase aquosa foi transferida para um novo microtubo onde foram adicionados 25 µL NaOAc 3M e 500µL de EtOH 100% o qual foi centrifugado por 15 min a velocidade máxima para precipitação do DNA. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e houve adição de 100 µL de EtOH 70% sobre o pellet o qual foi centrifugado por 5 min a velocidade máxima. Descartou-se o sobrenadante e os tubos ficaram secando no fluxo por 5 min. Em seguida, foram adicionados nos tubos 30 µL de água MiliQ + RNase A 150 µg/mL. Estes foram incubados no banho maria a 37 °C por 1 hora. Após esse período, as amostras foram quantificadas no nanofotômetro.

5.6 PCR e Southern Blot para confirmação da deleção

A confirmação da deleção gênica foi avaliada por um PCR convencional que amplifica uma região da ORF de *hydA* (Oligonucleotídios Fp 145 e Fp 146 amplificam um fragmento com 342 pb) e outra que amplifica regiões flangeadoras 5' e 3' do gene de resistência (Oligonucleotídios Fp 139 e Fp 15 com amplificação de um fragmento com 2,3 kb e Oligonucleotídios Fp 16 e Fp 142 com amplificação de um fragmento com 2,0 kb) respectivamente. A presença dos fragmentos foi observada por eletroforese em gel de agarose (0,8%). Para a confirmação por Southern Blot, o 12 µg de DNA genômico foram digeridos com a enzima de restrição PvuII (3U/µg de DNA). A amplificação da sonda para hibridização foi realizada com o kit: PCR DIG PROBE SYNTHESIS KIT (ROCHE, CAT# 11636090910) e a utilização dos oligonucleotídios Fp 141 e 142 que amplificam um fragmento de 995pb (Figura 5).

5.7 Construção do cassete para citolocalização

O cassete foi contruído por fusão gênica. Primeiramente, a partir do DNA genômico de CBS 271.37, com oligonucleotídeos Fp139 + Fp 178, foi amplificado um fragmento de 1.588 pb contendo o promotor e a ORF do gene *hydA* sem os códons referente ao códon de parada . Em seguida o gene que codifica a proteína fluorescente vermelha mCherry foi amplificado a partir do pCN51 (Fp179 + Fp 180, 818 pb) .Os dois fragmentos foram fusionados por uma nova PCR resultando e um único cassete de 2406 pb que contém o gene *hydA* fusionado a região 5' de mCherry (Figura 10A). Por co-transformação via biobalística, 5µg desse fragmento e 5µg do plasmídeo pFpNAT foram inseridos em conídios germinados do mutante de HydA de *F.pedrosoi*. A confirmação da inserção do cassete *hydA::mCherry* se deu por PCR com utilização dos oligonucleotídeos Fp 145 + Fp 180 para obter o fragmento esperado de 1,2 kb

5.8 Construção do cassete para reconstituição do gene *hydA*

A construção iniciou com a amplificação de um fragmento contendo o gene de *hydA* com 2,8kb (oligonucleotídios Fp 143 + Fp 144). LongAmp® foi a enzima utilizada. Como esse fragmento apresenta os sítios de restrição para NdeI e NsiI, ele foi digerido com as respectivas enzimas o que produziu um novo fragmento com 1,9 kb. O fragmento digerido foi ligado ao plasmídeo pFpNAT aberto com NdeI e NsiI (Figura 11A). A ligação se deu com a enzima T4 DNA Polimerase e seguiu as especificações do fabricante (NEB). A construção foi transformada em *Escherichia coli* (DH5α) por eletroporação (2,5 V , 25µF e 200 Ω). Os clones foram selecionados em meio L com ampicilina 100µg/mL para realização da MINEPREP (Extração de DNA plasmidial em pequena escala). A confirmação dos clones pFpNAT+*hydA* se deu por digestão com a enzima NcoIHF. Um clone positivo foi escolhido para transformação via biobalística dos conídios germinados do mutante de HydA. A confirmação da inserção do gene *hydA* no mutante se deu pela PCR usando os oligonucleotídeos Fp145 + Fp146 (342 pb).

5.9 Análise da sequência de aminoácidos

O banco de dados NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>) foi utilizado para identificação da sequência FASTA das proteínas de hidrofobina RodA (EAL91643.1) de *A. fumigatus* e HydA (XP_013289316.1) de *F. pedrosoi*. Em seguida, as sequências foram alinhadas e analisadas pelo programa online Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). A árvore filogenética foi gerada pelo programa Mega.

5.10 Estabilidade mitótica

As linhagens selvagem e mutante foram inoculadas em placas contendo apenas SAB e SAB com Higromicina B (50 µg/mL). Estas foram incubados em estufas a 25°C e 37°C para avaliar a taxa de crescimento por meio da medida do diâmetro das colônias ao longo de 28 dias. O crescimento foi fotografado. A capacidade de manter a marca de resistência do mutante foi avaliada por meio de 4 sucessivas passagens em meio não seletivo. O experimento foi realizado em triplicata.

5.11 Germinação dos conídios

Após purificação dos conídios, 5×10^7 conídios/mL foram inoculados em caldo batata líquido e incubados a 25 °C e 37 °C. A germinação foi avaliada por microscopia óptica a qual verificou a capacidade dos conídios desenvolverem o tubo germinativo após 24 h e 48 h. O experimento foi realizado em triplicata com análise de 3 lâminas independentes em cada repetição.

5.12 Viabilidade dos conídios

100µL de uma suspensão contendo 5×10^3 conídios/mL foi plaqueada em meio SAB e incubada a 25 °C e 37 °C. Após 7 dias, houve a contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC). O experimento foi realizado em triplicata

com análise de 2 placas independentes.

5.13 Solubilidade do conídio em água e óleo

Uma suspensão com 5×10^7 conídios/mL foi preparada em solução salina (0,9%). Em tubos de vidro foram adicionados 4mL da suspensão e 4 mL de vaselina líquida. Os tubos foram agitados vigorosamente com o vórtex por 2 minutos. A distribuição dos conídios entre as fases aquosa e orgânica foi fotografada. O experimento foi realizado em duplicata.

5.14 Tempo de absorção da gota de água

10 μ L de água MilliQ foram cuidadosamente pipetados sobre colônias crescidas por 14 dias em meio batata (10% batata, 1% dextrose e 2% ágar, pH 5,6). A absorção da gota pela colônia foi registrada em vídeo. O tempo de absorção foi avaliado pelo programa Kinovea® 0.8.15. O experimento foi realizado em triplicata.

5.15 Morfologia dos conídios

Para avaliação da morfologia dos conídios 10 μ L do inóculo crescido por 7 dias em caldo batata líquido foi aplicado sobre uma lâmina e observado por microscopia óptica. Foram analisadas 3 lâminas independentes. O experimento foi realizado em triplicada. Para análise da superfície da parede por microscopia de varredura, os conídios purificados de caldo batata foram aderidos a lamínula com poli-L-Lysine 0,1% e fixados com tetróxido de ósmio 2%. A desidratação foi realizada com concentrações crescentes de acetona (50%, 70%, 90%, 100%) e a lavagem com CO₂ líquido.

As imagens das amostras foram obtidas em um microscópio eletrônico de varredura de alta resolução (MEV-FEG) Jeol JSM 7100F com tensão de aceleração de elétrons de 10kV no modo de detecção de elétrons secundários (SED).

5.16 Susceptibilidade aos agentes osmóticos e estressores de parede

Os agentes osmóticos Sorbitol 0,75M e NaCl 0,75M e estressores de parede Calcofluor White 1,5 mg/mL, Congo Red 1% e o detergente SDS 0,0125% foram adicionados separadamente em meio SAB. Após purificação de conídios, foi realizada diluição seriada a partir de 5×10^7 conídios/mL até 5×10^2 conídios/mL. 10 μ L de cada diluição foi plaqueada sobre os meios. As placas foram incubadas a 25 °C e observadas ao longo de 15 dias. O experimento foi realizado em triplicata.

5.17 Infecção *in vivo* com propágulos fúngicos de *F. pedrosoi* e análise da progressão da doença

Os experimentos de infecção animal, sob responsabilidade da Profa. Anamélia Lorenzetti Bocca, seguiram protocolo aprovado pelo CEUA/UnB nº 46/2017. Quatro camundongos do tipo Nude de BALB/c, sendo dois animais para linhagem selvagem e dois para o mutante, foram infectados via subcutânea no coxim plantar com 50 μ L de PBS contendo $7,5 \times 10^5$ propágulos fúngicos (hifas e conídios na proporção 3:1) por pata. A cada três dias, com auxílio do paquímetro, foi realizada avaliação morfométrica, que consiste em medir o diâmetro da lesão, a fim de avaliar a progressão da doença. Após 78 dias a partir da infecção, os camundongos foram sacrificados para dosagem de citocinas e avaliação da carga fúngica na lesão. Experimento com n=2 realizado apenas uma vez.

5.17.1 Carga fúngica em coxim plantar.

Para determinação da carga fúngica presente nas lesões dos camundongos, fragmentos da lesão foram pesados, macerados com macerador de vidro em 700 μ L de PBS estéril e centrifugados a $1000 \times g$ por 2 minutos. O precipitado foi ressuscitado em PBS, e semeado em Sabouraud ágar contendo 50 μ g/mL gentamicina. As células viáveis foram determinadas por contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) após 7 dias de crescimento a 25 °C. O experimento foi realizado uma vez.

5.17.2 Dosagem de citocinas

O sobrenadante coletado no ensaio de determinação de carga fúngica em coxim plantar foi utilizado para dosagem de citocinas pela técnica de ELISA (Ensaio de Ligação Imunoenzimático) com objetivo de mensurar os níveis de citocinas presentes nas amostras. Com a utilização de kits comerciais (Ready-Set-Go!; eBioscience) foi possível realizar dosagem de IL-6, IL-10 e TNF- α . Os resultados foram obtidos em valores absolutos (pg/mL). O experimento foi realizado uma vez.

5.17.3 Análises estatísticas

Os experimentos com apenas uma variável foram avaliados por One-Way ANOVA ou Unpaired T-test. Já os experimentos com duas ou mais variáveis foram avaliados por Two-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey ou Sidak. As análises estatísticas foram feitas com o programa GraphPadPrim® versão 8.0. Considera-se significativamente estatístico as diferenças com intervalo de confiança menor ou igual a 95 %, ou seja, $p \leq 0,05$ representado por * nos gráficos.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Análise da sequência de hydA

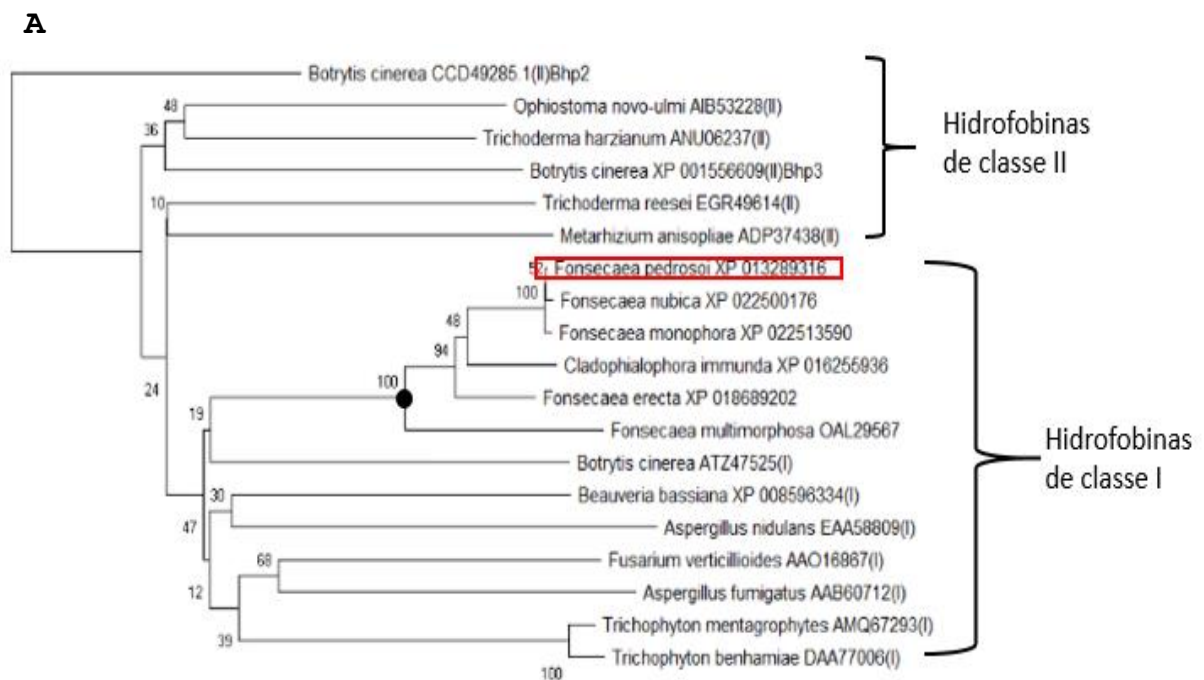
Entre todas as hidrofobinas de fungos patogênicos humanos já estudadas até o momento, a proteína RodA de *A. fumigatus* é a melhor caracterizada. É pertencente às hidrofobinas de classe 1, sendo assim, forma *rodlet* na superfície do conídio (VELSECCHI *et al.*, 2017).

Para avaliar se *F. pedrosoi* expressa alguma hidrofobina foi utilizado a sequência de aminoácidos da hidrofobina RodA de *A.fumigatus* para realizar um BLASTp. Após análise, apenas o número de acesso KIW85508 foi identificado. Esse achado sugere que *F. pedrosoi* apresenta apenas uma hidrofobina a qual foi nomeada neste trabalho de HydA.

Em seguida foi construída uma árvore filogenética com o método Neighbor-

Joining com 5.000 replicatas. Foram avaliadas diversas sequências de aminoácidos tanto para hidrofobinas de classe 1 quanto para de classe 2. Observou-se que a sequência de HydA de *F. pedrosoi* foi agrupada junto às hidrofobinas de classe 1, assim como todas as outras sequências de fungos causadores de cromoblastomicose (Figura 2A).

Por meio de alinhamento múltiplo foi possível identificar a similaridade da sequência de aminoácidos da proteína HydA de *F. pedrosoi* com a proteína de RodA de *A. fumigatus*. A proteína produzida por *hydA* é constituída por 117 aminoácidos sendo que 40% apresentam cadeia lateral hidrofóbica. Ao comparar a disposição dos 8 resíduos de cisteínas entre a hidrofobina de classe 1 e classe 2 observa-se que os padrões conservados em *F. pedrosoi* (X39-Cys-X7-Cys-Cys-X24-Cys-X17-Cys-X6-Cys-Cys-X11-Cys-X5) apresentam alta similaridade com a hidrofobina de classe 1 de *A. fumigatus* (X56-Cys-X7-Cys-Cys-X39-Cys-X21-Cys-X5-Cys-Cys-X11-Cys-X5) porém possuem diferenças significativas entre a hidrofobina de classe 2 de *T. reesei* (X32-Cys-X10-Cys-Cys-X11-Cys-X16-Cys-X8-Cys-Cys-X10-Cys-X6), principalmente na quantidade de aminoácidos que separam a quarta e a quinta cisteína. Sendo assim, apesar do espaçamento não ser a principal característica para classificação, mas tendo em vista o agrupamento na árvore filogenética, HydA parece se enquadrar nos padrões de hidrofobinas de classe 1.



B

A.fumigatus_RodA(I)	MKFSLSAAVLAFVAVSVAALPQHDVNAAGNGVGNKGNANVRFVPPDDITVKQATEKCGDQ-	59
T.reesei_Hfb2(II)	MQY--SAIVALFATLAVAAPAQEAA-----ADIALDGFCTAGVTN	39
F.pedrosoi_HydA	-----MYTLILVTLAATGVF-A--GVP---MKARGMDSGSELTVDQAAANQCGNG-	43
	:: :: .	::: : .*
A.fumigatus_RodA(I)	AQLSCCNKATYAGDVTDIDEGILAGTLKNLIGGGSGTEGLGLFNQCSKLDLQIPIIGIPI	
T.reesei_Hfb2(II)	NIPMCCGSGILDLLYLDCEPTQATSVLNP LSAVCGRVG--LQAKCCTLGI--ADLGVLC	95
F.pedrosoi_HydA	QVISCCNTSTSSGDVGG-----LSGSLNGLLGGSC-----SPIPNNVLGVQVP-	87
	**... .	: : : : : : : :
A.fumigatus_RodA(I)	QDLVNQCKQNI-ACCQNSPSDASGSLIGLGLPCIALGSIL	159
T.reesei_Hfb2(II)	QDALPE-----	101
F.pedrosoi_HydA	---LQQACGNNQAACCAGDQTGL-----VNVQCTPIGL--	117

Figura 2: Análise das sequências de aminoácidos de hidrofobinas. A) Árvore filogenética de diversas hidrofobinas de classe 1 e classe 2. A ramificação que contém as hidrofobinas dos fungos causadores da cromoblastomicose está sinalizada com círculo preto. B) Alinhamento múltiplo entre sequências de aminoácidos da hidrofobina de classe 1 (RodA) de *Aspergillus Fumigatus*, classe 2 (Hfb2) de *Trichoderma reesei* e (HydA) de *Fonsecaea pedrosoi*. Cisteínas destacadas em amarelo. A similaridade dos aminoácidos entre os grupos é representada por (*) idêntico, (:) propriedades semelhantes e (.) propriedades pouco semelhantes.

6.2 Obtenção do mutante de HydA

A avaliação do papel da hidrofobina HydA em *F.pedrosoi* se deu pela construção do cassete de deleção por PCR Double Joint (KIM et al, 2009). Os fragmentos 1+2 (992 pb) e 7+8 (995 pb) foram amplificados (Figura 3B), no entanto os fragmentos correspondentes a marca de resistência à Higromicina B 3+4 (1,1 kb) e 5+6 (984 pb) por já estarem disponíveis no estoque do laboratório não foram amplificados. A fusão dos fragmentos anteriores se deu por uma nova PCR resultando nos fragmentos 1+4 (2,1 kb) e 5+8 (1,9 kb) (Figura 3C). Esses fragmentos foram introduzidos em conídios germinados de *F. pedrosoi* por biobalística possibilitando a deleção por recombinação homóloga (Figura 3A)

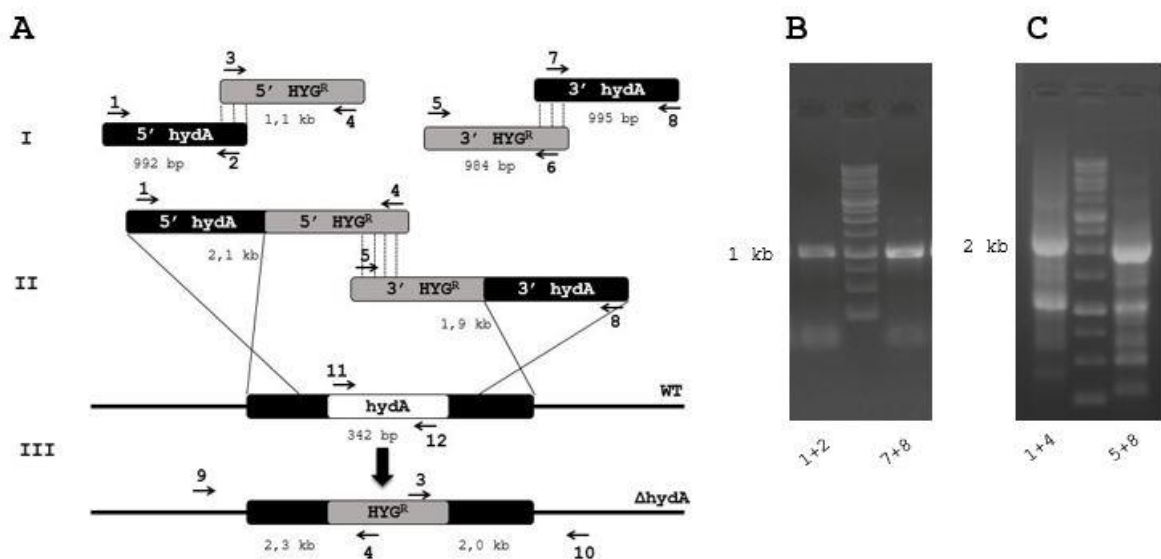


Figura 3: Construção do cassete de deleção por PCR-DJ e Eletroforese para confirmação da deleção.

amplificação dos fragmentos do cassete de deleção. A) Esquema representativo da técnica de PCR – Double Joint I – 1ª etapa da PCR –DJ. II – 2ª etapa da PCR-DJ. III- Recombinação homóloga após inserção do cassete de deleção por biobalística em conídios germinados de *F. pedrosoi*. B) Fragmentos PCR-DJ 1ª etapa, 1+2 (5'hydA) 992pb e 7+8 (3'hydA) 995pb. Os fragmentos 3+4 (3'HYG^R) 1,1kb e 5+6 (5'HYG^R) 984 pb não foram amplificados, pois já estavam disponíveis em estoque. C) Fragmentos PCR – DJ 2ª etapa 1+4 (5'hydA+ HYG^R) 2,1kb e 5+8 (3'hydA+ HYG^R) 1,9kb.

Após 20 dias da transformação, obteve-se 88 colônias as quais foram selecionadas com 50 µg/mL de HYG em meio SAB (Figura 4B). Nota-se que todas as colônias apresentam resistência ao antibiótico, visto que o crescimento do controle (WT) é inibido nessa condição. Para confirmar que a inserção ocorreu no locus gênico de *hydA* foi extraído DNA para realizar PCR convencional (Figura 5A, 5B) e Southern Blot (Figura 5C, 5D).

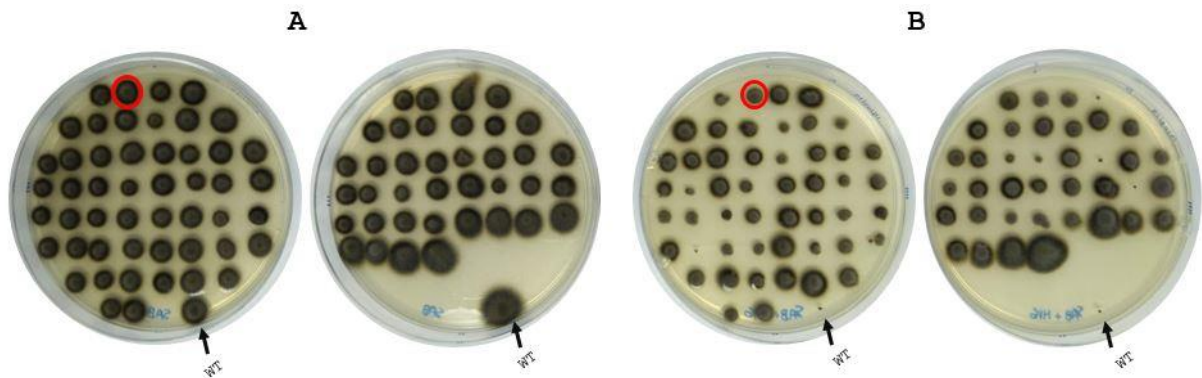


Figura 4: Obtenção dos transformantes a 25 °C após 20 dias de crescimento. A) Colônias em Sabouraud. B) Colônias selecionadas com 50 µg/mL de Higromicina B. WT: Linhagem selvagem (CBS 271.37) usada como controle. O círculo vermelho indica colônia Δ hydA confirmada.

A escolha dos transformantes para extração do DNA se deu de maneira aleatória, visto que as colônias não apresentaram, visualmente, nenhuma característica fenotípica diferencial. Foi extraído o DNA de 47 colônias, porém a deleção do gene *hydA* foi identificada em apenas uma colônia (Figura 4). A confirmação da deleção se deu (1) pela ausência da amplificação de uma região interna do gene *hydA* (342pb) (Figura 5A), (2) pela amplificação usando combinação de oligonucleotídeos específicos para as regiões externas ao locus *hydA* e para a marca de resistência HYG^R 5' (2,3kb) e 3' (2,kb) (Figura 5B) e (3) pela identificação por Southern Blot de fragmentos hibridizados com sonda que resulta na diferença de padrão entre selvagem (3kb) e mutante (6,3kb) (Figura 5D). O locus selvagem *hydA* apresenta 3 sítios para enzima de restrição PvuII enquanto que o Δ hydA (*hydA*::HYG^R) apresenta apenas dois. Isto é decorrente da presença do gene de resistência que elimina um dos sítios de PvuII possibilitando que sonda reconheça

fragmentos de DNA com tamanhos distintos (Figura 5C). Estes resultados confirmam que de fato todo o cassete de deleção entrou no locus gênico de *hydA*.

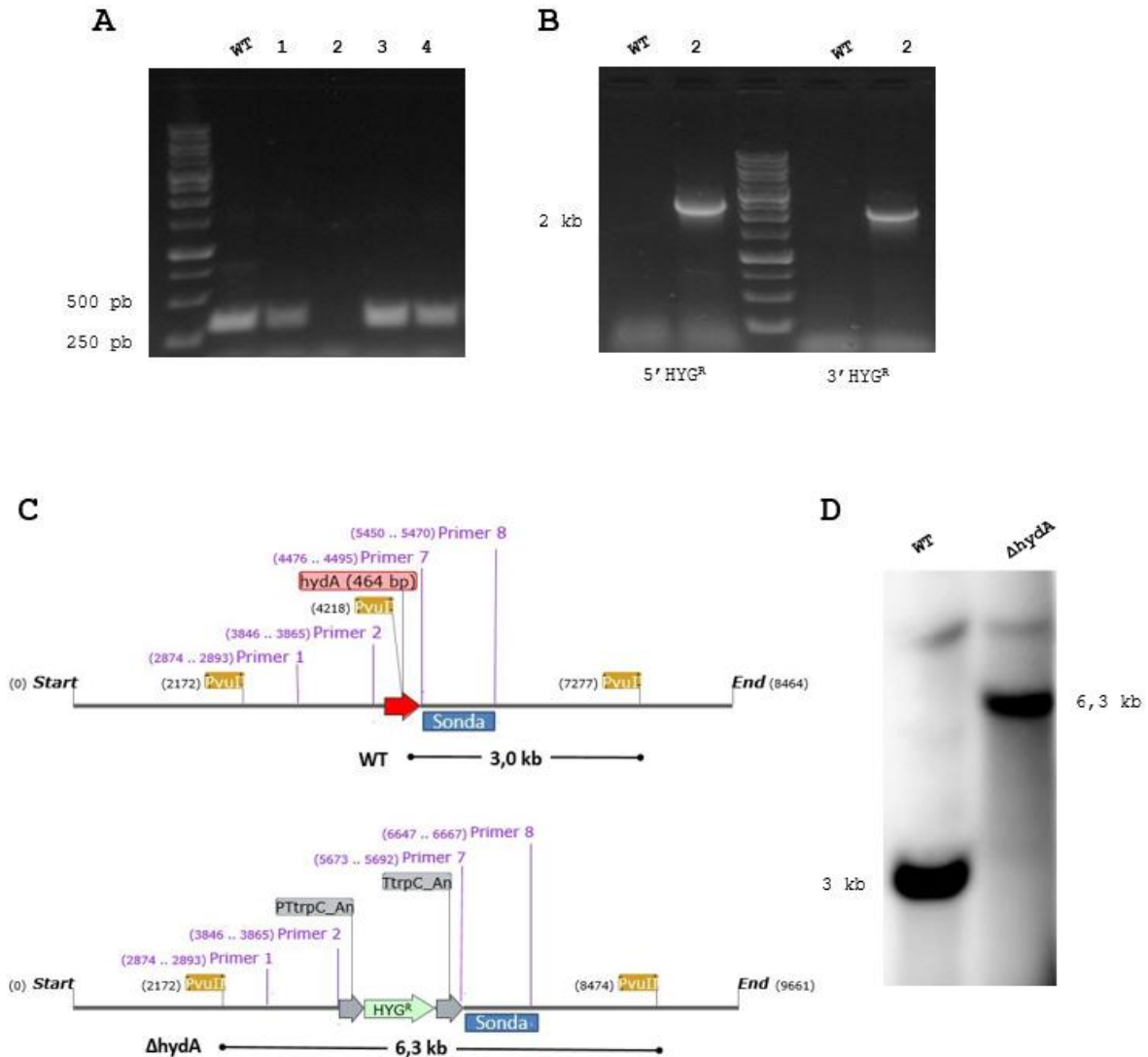


Figura 5: Confirmação da deleção de *hydA* em *F. pedrosoi*. A) Eletroforese da PCR de uma região interna de *HydA* (342pb). O transformante 2 não amplificou sugerindo deleção gênica. B) Eletroforese da PCR das regiões flangeadoras 5'*HYG*^R (2,3kb) e 3'*HYG*^R (2 kb). A amplificação para o mutante indica que houve inserção do gene de resistência à Higromicina B no locus gênico de *HydA*. C) Esquema para digestão do DNA genômico com *PvuII* para confirmação do mutante por Southern Blot. D) Confirmação da deleção por Southern Blot.

6.3 Caracterização funcional de *HydA*

Após confirmação do mutante, iniciaram-se os testes de fenótipo. Primeiramente, avaliou-se a estabilidade mitótica do mutante. Observou-se que após quatro sucessivas passagens de Δ *hydA* em meio não seletivo e posterior repique em

meio contendo Higromicina B houve a manutenção do crescimento indicando que a marca de resistência era estável. De acordo com Salgado (2010), 33 °C é uma temperatura ótima para o crescimento das espécies de *Fonsecaea*, porém 37 °C é considerada temperatura limite. Diante disso, ao longo de 28 dias as taxas de crescimento do mutante foram acompanhadas (Figura 6A). Notou-se que o crescimento a 37°C é menor que a 25°C tanto para o selvagem quanto para o mutante, porém não foram observadas diferenças estatísticas significativas (Figura 6B). Sendo assim, a temperatura é um fator limitante para o crescimento do fungo, porém esse parâmetro não está relacionado com a ausência do gene *hydA*.

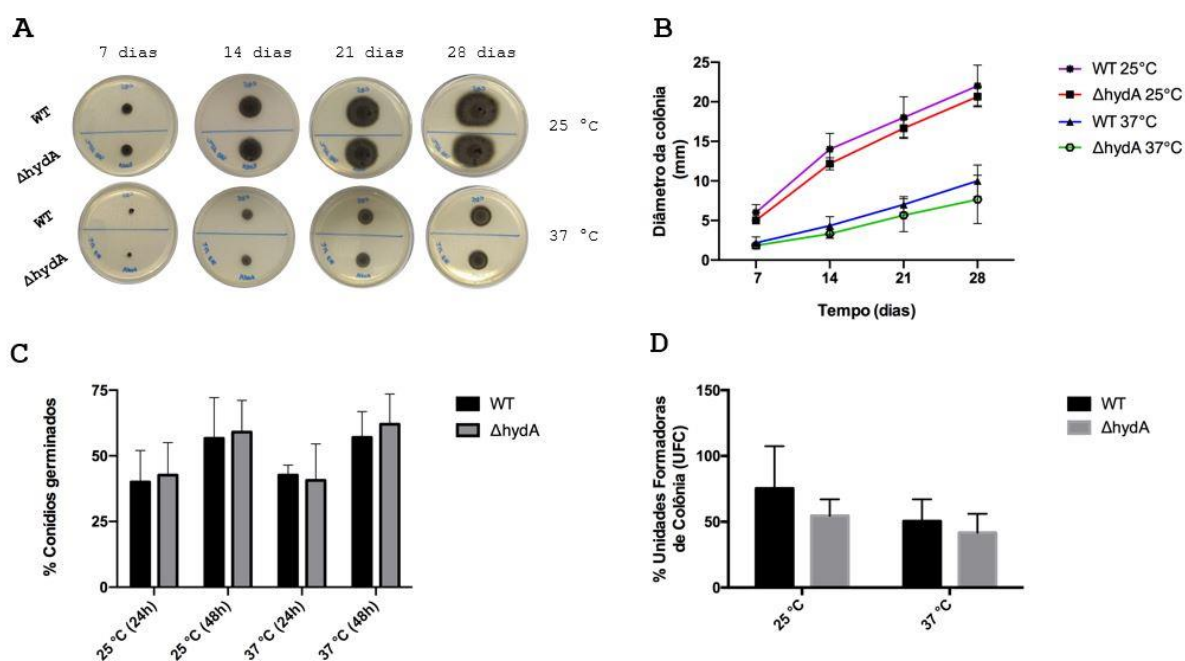


Figura 6: Avaliação do crescimento e viabilidade de $\Delta hydA$. A) Crescimento das colônias a 25 °C e 37 °C em meio Sabouraud ágar ao longo de 28 dias. B) Taxa de crescimento das colônias. C) Capacidade de germinação dos conídios em Sabouraud líquido. D) Viabilidade dos conídios avaliada por contagem de UFC em em meio Sabouraud ágar após incubação a 25 °C. Análise estatística realizada por Two-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey em B e D e pós-teste de Sidak em C.

Apesar das hidrofobinas recobrirem a superfície do conídio, a expressão dessas proteínas é reduzida quando o conídio inicia o processo de germinação como foi observado para *Metarhizium anisopliae*, *Clonostachys rosea*, *Beauveria bassiana*, *A. fumigatus* e *A. nidulans* (AIMANIANDA *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2011; DUBEY *et al.*, 2014 e GRÜNBAKER *et al.*, 2014). Para avaliar a influência de *HydA* na germinação dos conídios de *F. pedrosoi*, a germinação de conídios foi

acompanhada ao longo de 48 h em diferentes temperaturas (Figura 6C). Observou-se que quanto maior o tempo de incubação maiores são as taxas de germinação tanto para a linhagem selvagem como para o mutante $\Delta hydA$. Apesar da temperatura ser um fator limitante para o crescimento da colônia de *F. pedrosoi*, não foi limitante para a germinação dos conídios. Porém um fenótipo diferente foi observado para o mutante de *B. bassiana* que apresentou melhor germinação a altas temperaturas em comparação ao selvagem (ZHANG *et al.* 2011). O mutante $\Delta hydA$ de *F. pedrosoi* se assemelha ao mutante $\Delta hyd1$ de *C. rosea* (DUBEY *et al.*, 2014) pois não apresentou diferenças estatísticas significativas em relação à linhagem selvagem durante o processo de germinação em diferentes temperaturas

Frequentemente, a deleção de genes de hidrofobina em diferentes espécies de fungos resulta em fenótipos variáveis e, às vezes, contraditórios. A deleção de *hyd1* e *hyd2* em *C. rosea* aumenta a taxa de crescimento e esporulação (DUBEY *et al.*, 2014), porém reduz em *Metarhizium brunneum* (SEVIM *et al.*, 2012). A redução de esporulação também é vista em *A. fumigatus* com a deleção de *rodA*. Porém, a supressão dos genes HCF-1 e HCF-2 em *Cladosporium fulvum*, HFB1 em *Trichoderma reesei* e HypA em *A. benhamiae* não promove alteração na esporulação quando os mutantes são comparados ao selvagem. (ZHANG *et al.*, 2011; HEDDERGOTT *et al.*, 2012; VALSECCHI *et al.*, 2017). Em se tratando de *F. pedrosoi*, a deleção de *hydA* apesar de gerar um percentual menor na recuperação de colônias em meio Sabouraud ágar não apresenta diferença significativa quando comparada ao selvagem, mesmo em temperaturas diferentes (Figura 6D).

Segundo Mosbach *et al.* (2011), a consequência da deleção de hidrofobinas de classe I, em diversos fungos, é a presença de um conídio com fenótipo hidrofílico, ou seja, o conídio apresenta maior capacidade de absorção de água quando comparado ao conídio da linhagem selvagem. Devido a hidrofiliidade, a dispersão e a transmissão dos conídios pelo ar são afetadas, uma vez que há uma maior tendência em permanecerem na fase aquosa como observado para *A. benhamiae*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *B. beuveria* e *M. brunneum*. (THAU *et al.*, 1994; ZHANG *et al.*, 2011; HEDDERGOTT *et al.*, 2012; SEVIM *et al.*, 2012; GRÜNbacher *et al.*, 2014).

Essa tendência também foi observada durante a caracterização da hidrofobicidade gerada por HydA em *F. pedrosoi*. Ao avaliar a capacidade de dispersão dos conídios em água e óleo (Figura 7A), observou-se que os conídios

WT concentraram-se na fase orgânica (fase superior) o que indica maior afinidade pelo óleo, enquanto que os conídios $\Delta hydA$ se distribuíram tanto no meio hidrofílico quanto hidrofóbico. O conídio de *F. pedrosoi*, assim como o de *A. fumigatus*, possui a parede celular recoberta por melanina (DHN-melanina), que por sua vez, também apresenta características hidrofóbicas. Sendo assim, pode ser que a maior exposição da melanina no conídio de $\Delta hydA$ tenha contribuído para manter parcialmente o caráter hidrofóbico da superfície celular. Para avaliar essa questão os conídios de $\Delta hydA$ serão crescidos na presença de inibidor da síntese de melanina.

A redução da hidrofobicidade também pode ser avaliada pela rapidez com que uma gota de água sobre uma colônia esporulada é absorvida. Thau *et al.* (1994) e Heddergott *et al.* (2012) constataram que para os mutantes de RodA e HypA, respectivamente, *A. fumigatus* e *A. benhamiae*, a absorção da gota era praticamente instantânea enquanto que nas linhagens selvagens a gota permanecia sobre a colônia por um certo período de tempo. O mesmo foi observado para o mutante $\Delta hydA$ de *F. pedrosoi*. Por meio de gravação de vídeo foi possível documentar o processo da absorção da gota de água (Figura 7B). Nota-se que o selvagem demora cerca de 8 segundos para absorver a gota em quanto que o mutante absorve em menos de 3 segundos. Os resultados encontrados apresentam nível de significância de 95% ($p \leq 0,05$) (Figura 7C), fator que corrobora para confirmar que a ausência de HydA *F. pedrosoi* altera o caráter hidrofóbico da superfície externa dos conídios.

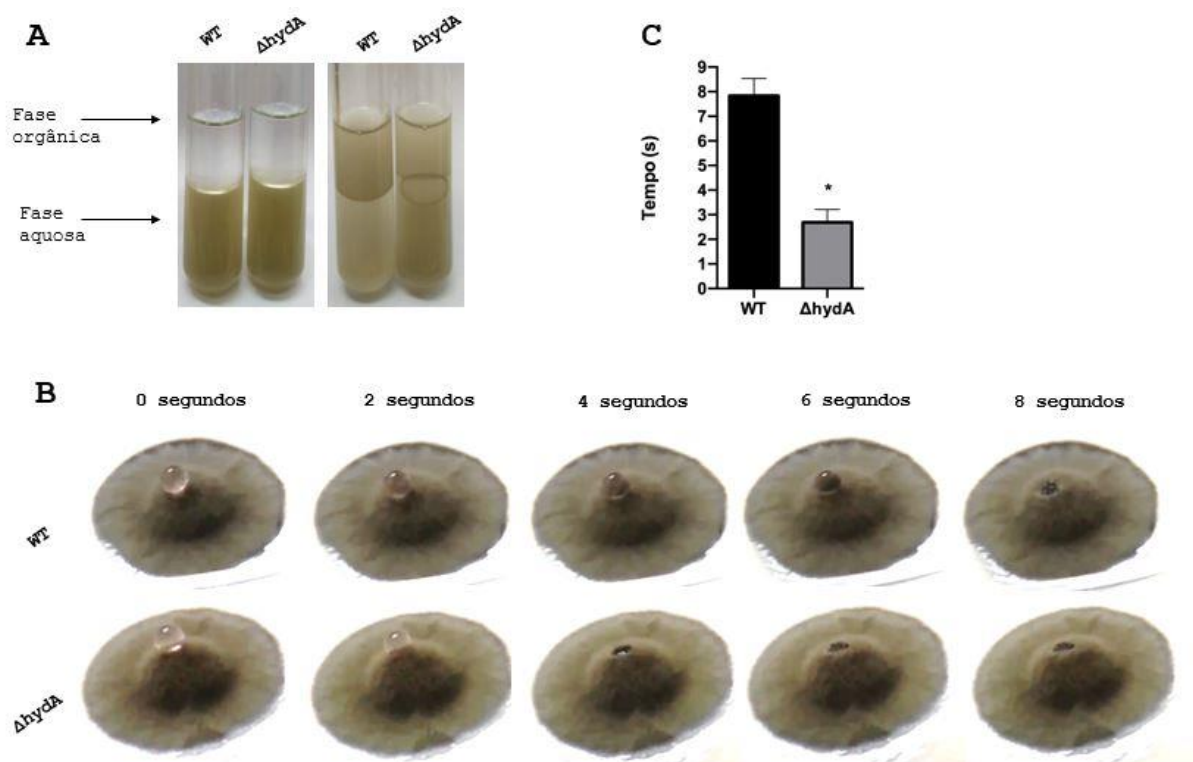


Figura 7: Avaliação da hidrofobicidade dos conídios de $\Delta hydA$. A) Dispersão dos conídios em água e óleo. Fase superior vaselina e inferior suspensão de conídios em água. Imagem à direita mostra distribuição dos conídios após agitação vigorosa. B) Absorção da gota ao longo do tempo documentado por gravação de vídeo C) Tempo de absorção da gota. Análise estatística realizada por Unpaired T-test em que * representa $p \leq 0,05$.

De acordo com Heddergott *et al.* (2012) e Valsecchi *et al.* (2017), em algumas espécies de fungos, as hidrofobinas são necessárias para o desenvolvimento de microconídios e sua ausência pode gerar defeitos na morfogênese dos conídios como visto para *A. fumigatus* em que a deleção de *rodA* proporcionou o aparecimento de conídios ovais, formas antes não detectadas. O mesmo fenômeno também foi observado para o mutante de *F. pedrosoi* com a deleção de *hydA*. Após crescimento em caldo batata, o WT apresentou 70% dos conídios com o morfotipo gota (presença de constrição em uma das extremidades) e 30% com morfotipo esférico (redondo), porém a ausência do gene *hydA* reduziu o morfotipo gota para cerca de 48% e proporcionou o aparecimento do morfotipo oval (forma alongada e sem constrição) que passou a representar cerca de 27% dos conídios (Figura 8 A).

As hidrofobinas também são componentes imprescindíveis para o revestimento dos conídios em fungos filamentosos. De acordo com a literatura, a primeira proteína hidrofóbica de fungos patogênicos humanos caracterizada foi RodA. Thau *et al.* (1994) e Valsecchi *et al.* (2017) observaram por microscopia de

força atômica e varredura que a presença dessa hidrofobina no conídio de *A. fumigatus* resultava em uma camada formada por feixes altamente ordenados, semelhante às digitais, nomeada de *rodlets*. Porém a ausência dessa proteína tornava a superfície dos conídios amorfa. Observou-se que a deleção do gene *hypA* de *A. benhamiae* também resultava no mesmo fenótipo (HEDDERGOTT *et al.*, 2012). Em *B. bassiana* os genes *hyd1* e *hyd2* interagem para formação da camada hidrofóbica, porém apenas a ausência de *Hyd1* proporcionou conídios lisos, ou seja, desprovidos de fascículas e feixes paralelos que são encontrados nos conídios da linhagem selvagem (ZHANG *et al.*, 2011).

No entanto, estudos realizados por Mosbach *et al.* (2011) identificaram que *B. cinerea* parece não possuir camada *rodlet* recobrando os conídios, pois a superfície espinhosa presente no conídio nada se assemelha às estruturas já observadas em outros fungos. Quando o mutante é comparado à linhagem selvagem nenhuma diferença na superfície é observada indicando que as hidrofobinas de *B. cinerea* não desempenham um papel importante no revestimento hidrofóbico dos esporos.

Por meio de microscopia de varredura foi possível visualizar a superfície do conídio de *F. pedrosoi*. Observou-se que a camada hidrofóbica que recobre o conídio muito se assemelha a de *B. cinerea*, visto que apresenta superfície espiculada semelhante à uma esponja do mar e não há a presença da camada de *rodlet*, e com a deleção de *hydA* o conídio torna-se liso (similar à *B. bassiana*), compacto e amorfo (Figura 8). Diante dos dados aqui compilados, observa-se que nem todas as hidrofobinas conferem hidrofobicidade ao conídio ou alteram a estrutura da superfície como visto em *B. cinerea*. Porém em *F. pedrosoi*, assim como para a maioria dos fungos aqui citados, a perda de hidrofobina altera a superfície do conídio contribuindo para alteração do caráter hidrofóbico.

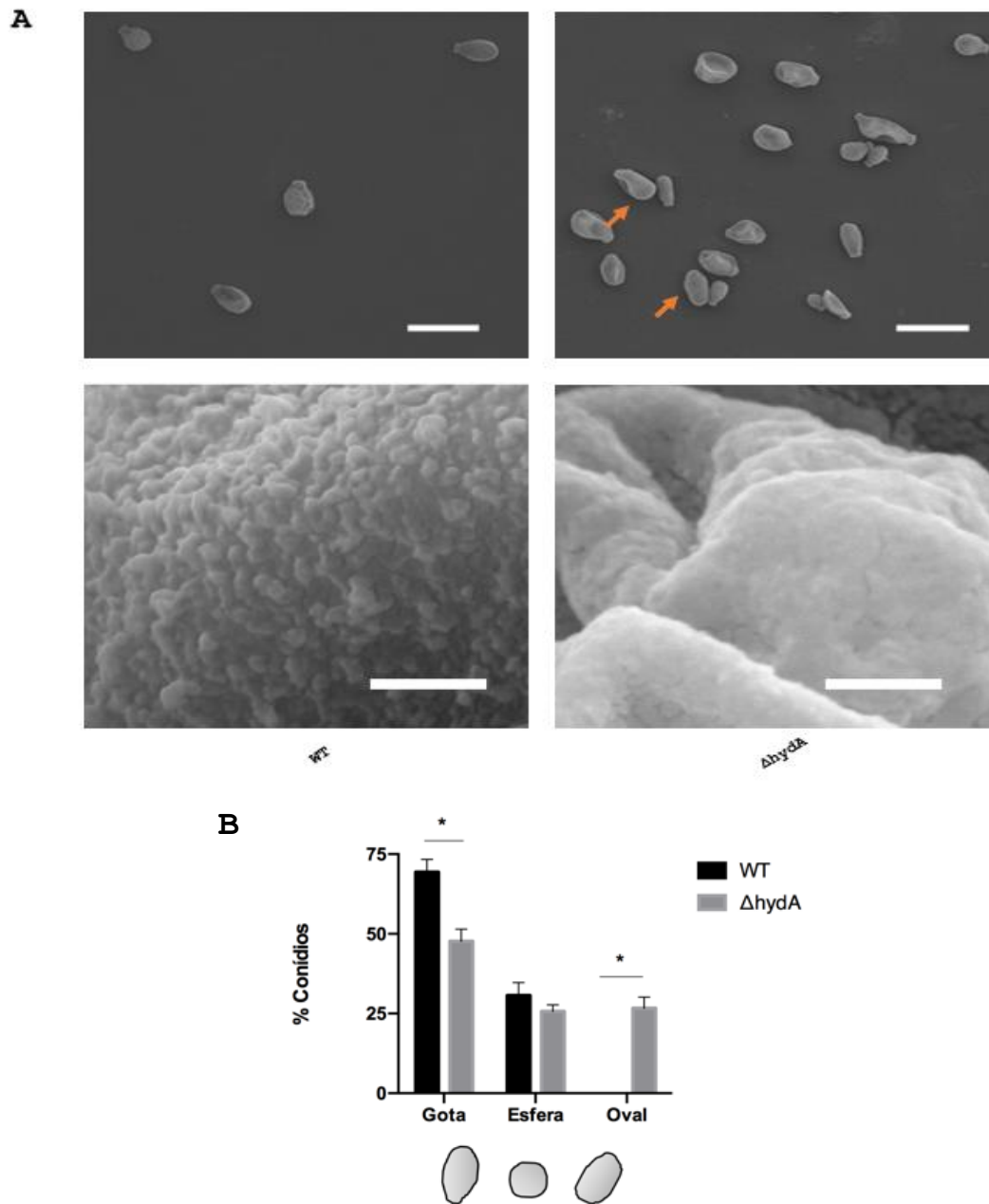


Figura 8: Morfologia dos conídios por microscopia de varredura. A) As setas indicam conídios com morfologia alterada (morfotipo oval presente apenas no mutante). Escala representa 3 μm . Em sequência, Superfície externa do conídio. Escala representa 100 nm. B) Porcentagem dos diferentes morfotipos dos conídios. Análise estatística realizada por Two-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Sidak em que * representa $p \leq 0,05$.

Além de proporcionar hidrofobicidade ao conídio, as hidrofobinas podem estar relacionadas (1) à manutenção da estrutura do conídios, já que a ausência da hidrofobina em *F. pedrosoi* e *A. fumigatus* ocasionou aumento da plasticidade do conídio, fenômeno observado pela presença de conídios com morfologia alterada (Figura 6) e (2) à permeabilidade do conídio, uma vez que o mutante de *A. fumigatus* se mostrou mais permeável a Isotiocianato de Fluoresceína (Fluorocromo) que a

linhagem selvagem (VALSECCHI *et al*, 2017)

Diante disso, em alguns fungos, um defeito nessa camada poderia impactar na sensibilidade a agentes estressores de superfície celular como parede e membrana. Com base nos estudos Zhang *et al* (2011) e Dubey *et al* (2014), quando os conídios de *C. rosea* e *A. nidulans* são germinados em meio líquido com estresse abiótico (CalcoFluor White; Congo Red; KCl; Sorbitol; SDS, Cafeína, NaCl, Sorbitol) as taxas de germinação dos mutantes são significativamente maiores que as taxas das linhagens selvagens. Os dados sugerem que as hidrofobinas atuam como um sensor que limita a germinação dos conídios em condições desfavoráveis (DUBEY *et al*, 2014). Para avaliar a susceptibilidade de *F. pedrosoi*, linhagem selvagem e mutante foram submetidos ao crescimento em sabouraud ágar na presença de agentes estressores de parede e osmóticos afim de identificar se as alterações morfológicas e químicas sofridas pelo conídio do mutante influenciaria na resposta do fungo a estas condições.

De acordo com experimentos realizados em meio sólido, Valsecchi e colaboradores. (2017) observaram que a ausência da hidrofobina de classe 1 RodA em *A.fumigatus* aumentou a resistência à agentes estressores da parede como Calcofluor White e Congo Red, porém o mesmo fenótipo não foi observado para os mutantes de hidrofobinas de classe 1 Δ hyd1, Δ hyd2, Δ hyd1hyd2 de *B. bassiana* e Δ hypA de *A. benhamiae*. Assim como para Δ hydA de *F. pedrosoi* (Figura 9). Em se tratando de agentes estressores osmóticos NaCl, Sorbitol e SDS a perda de hidrofobinas de classe 2 Δ hyd1 e Δ hyd3 de *C.rosea* não provocou diferença de crescimento entre selvagem e mutante . Assim como em *B. bassiana* para sorbitol e SDS e em *A. benhamiae* para SDS (ambos com deleções de hidrofobinas de classe 1). Em *F. pedrosoi*, observou-se que o mutante apresentou resistência ao crescimento em SDS 0,0125% (Figura 9), apenas. Porém apresentou o mesmo fenótipo dos fungos citados para NaCl e sorbitol

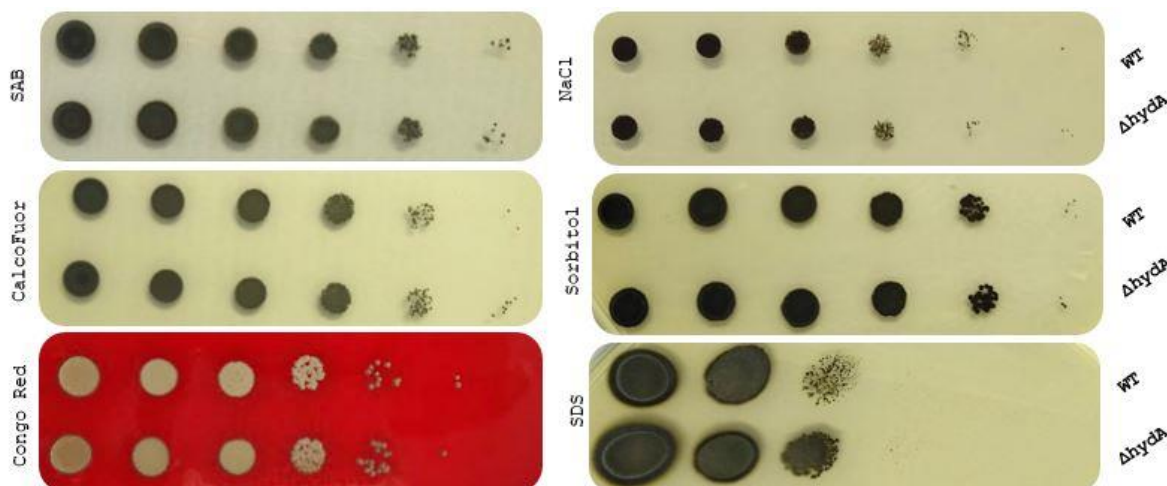


Figura 9: Susceptibilidade a agentes osmóticos e estressores de parede após 14 dias a 25°C em Sabouraud ágar suplementado com CalcoFluor White 1,5 mg/mL, Congo Red 1%, NaCl 0,75M, Sorbitol 0,75 M e SDS 0,0125%.

De acordo com Dubey *et al.* (2014) e Mosbach *et al.* (2011), em alguns casos, a deleção de genes de hidrofobina não gera diferenças fenotípicas entre selvagem e mutante. Diante disso, a caracterização funcional dessas proteínas mostrou que nem sempre elas estão ligadas ao revestimento hidrofóbico, virulência e desenvolvimento dos conídios como observado em *Fusarium verticilloides* e *B. cinerea*. Nesses casos, as hidrofobinas podem desempenhar outras funções ainda desconhecidas.

6.3.1 Citolocalização de HydA

Para avaliar a expressão de HydA em *F. pedrosoi* foi construído um cassete contendo o gene que codifica a proteína fluorescente vermelho mCherry fusionado ao gene *hydA*. O cassete foi introduzido em conídios germinados de $\Delta hydA$ por biobalística, usando como marcador seletivo a resistência à Nourseotricina. A transformação resultou em 22 colônias as quais foram selecionadas com 50 $\mu\text{g/mL}$ de HYG e 50 $\mu\text{g/mL}$ de NAT em SAB ágar. Observou-se que todos os transformantes eram resistentes a Higromicina B, porém alguns eram sensíveis a Nourseotricina (Figura 10A). Logo, a sensibilidade à NAT foi um fator de exclusão para a seleção de colônias para a extração de DNA, uma vez que a sensibilidade indica ausência da marca de seleção. Diante disso, 6 colônias foram escolhidas para extração de DNA e submetidas a PCR convencional para confirmar a inserção do

cassete no genoma do fungo. Apenas uma colônia apresentou à amplificação do fragmento esperado (1,2 kb) (Figura 10B). Mediante a confirmação do transformante, conídios e hifas, após cultivo em meio líquido, foram observados por microscopia de fluorescência.

Após a análise microscópica foi possível identificar sinais de fluorescência na superfície dos conídios, porém não foi detectada nenhuma fluorescência ao longo das hifas (Figura 10C). O mesmo resultado foi visto em *A. fumigatus*, *A. nidulans* e *B. bassiana*. Além da expressão da hidrofobina na superfície do conídio, em *A. fumigatus* foram identificados sinais no biofilme e na superfície das filíades (VALSECCHI et al., 2017), em *A. nidulans* sinais no citoplasma também foram identificados (GRÜNBACHER et al., 2014). Observou-se que em conídios germinados de *A. nidulans* e *B. bassiana* a fluorescência fica retida na base do conídio, não havendo fluorescência ao longo do tubo germinativo e das hifas. (ZHANG et al, 2011).

Diante disso, sugere-se que em *F. pedrosoi* a hidrofobina produzida por *hydA* parece ser conídio-específica. A análise da expressão de *hydA* por PCR quantitativo nas diferentes formas – conídios e hifas de *F. pedrosoi* para detectar se de fato esta hidrofobina é exclusivamente expressa em conídios, poderá esclarecer este achado.

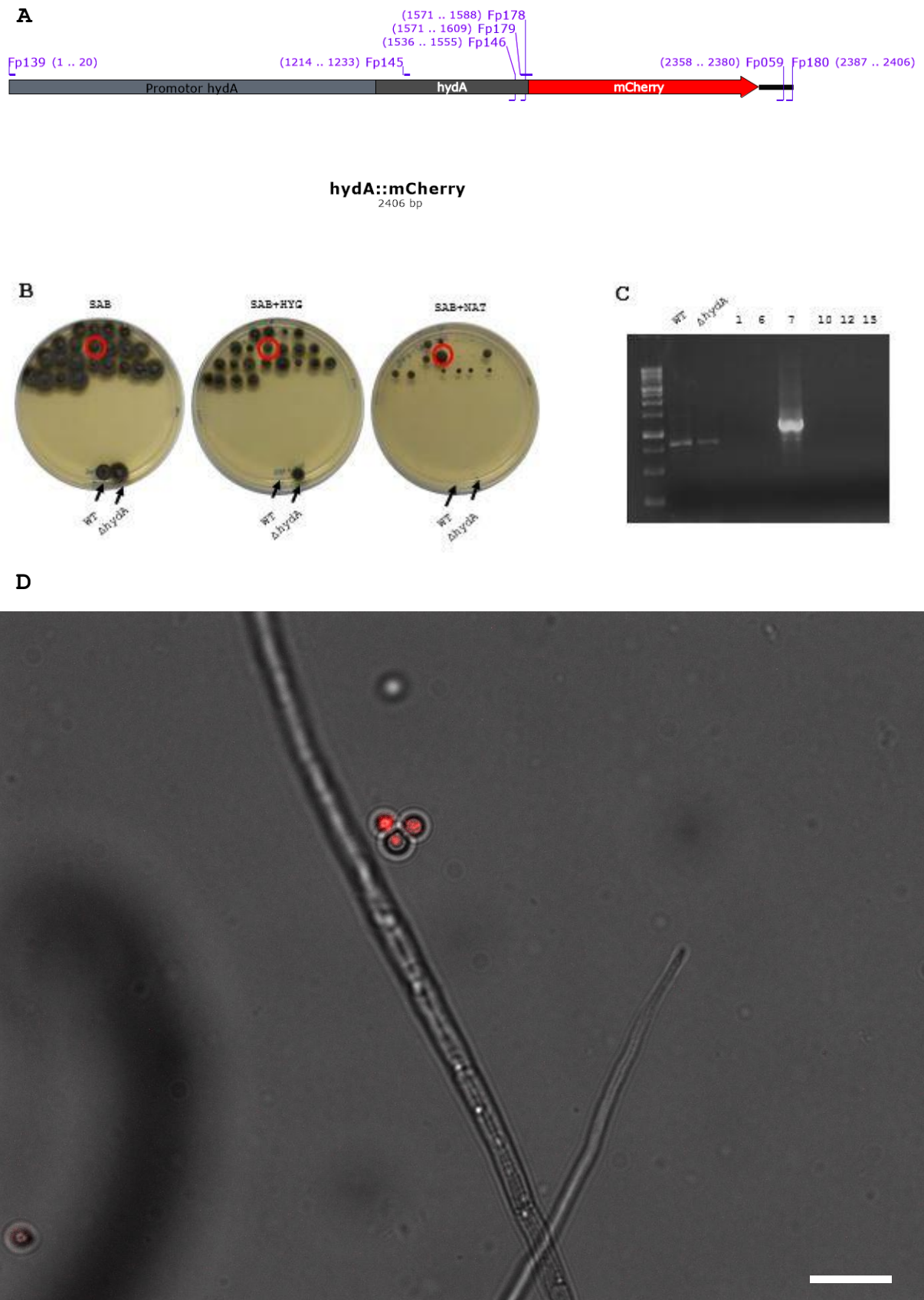


Figura 10: Obtenção do mutante *hydA::mCherry* para citolocalização da hidrofobina. A) Esquema para construção do cassete para citolocalização. B) Transformantes obtidos após 20 dias de crescimento a 25 °C em Sabouraud ágar. Estes foram selecionados mediante crescimento em meio Sabouraud ágar contendo 50µg/mL de Higromicina e 50µg/mL de Nourseotricina, separadamente.

WT e Δ hydA foram usados como controles. O círculo vermelho indica a colônia hydA:mCherry. C) Eletroforese em gel de agarose confirma a presença do fragmento esperado de 1,2 kb (oligonucleotídeos Fp 145 e Fp 180) para hydA:mCherry. WT e Δ hydA foram usados como controle negativo, sendo assim, não se espera amplificação de nenhum fragmento. D) Microscopia de fluorescência. Escala representa 10 μ m.

6.4 Reconstituição do gene HydA

Depois da avaliação dos fenótipos do mutante Δ hydA de *F. pedrosoi*, foi realizada a construção de um cassete para reintroduzir o gene hydA no mutante. O cassete foi construído com a marca de resistência à Nourseotricina e inserido por biobalística em conídios germinados de Δ hydA. Após 20 dias da transformação, obteve-se 74 colônias em meio Sabouraud ágar. As colônias foram selecionadas em placas contendo meio SAB com 50 μ g/mL de Higromicina e SAB com 50 μ g/mL de Nourseotricina. Observou-se que apesar da diferença no desenvolvimento das colônias todas cresceram no meio contendo HYG, porém algumas não cresceram em NAT (Figura 11A).

Para extração de DNA foram escolhidas 6 colônias as quais eram sensíveis à HYG e resistentes à NAT. Após a realização de PCR convencional para amplificação de uma região interna do gene hydA, 3 colônias amplificaram o fragmento esperado (342 pb) indicando a reintrodução do gene no genoma do fungo (Figura 11B). No entanto, a presença do gene não indica, necessariamente, que o mesmo está expresso e há reconstituição do fenótipo. Sendo assim, é necessário realizar os testes fenotípicos para avaliar se os transformantes 12, 16 e 18 voltam a expressar o fenótipo observado na linhagem selvagem (experimentos em andamento).

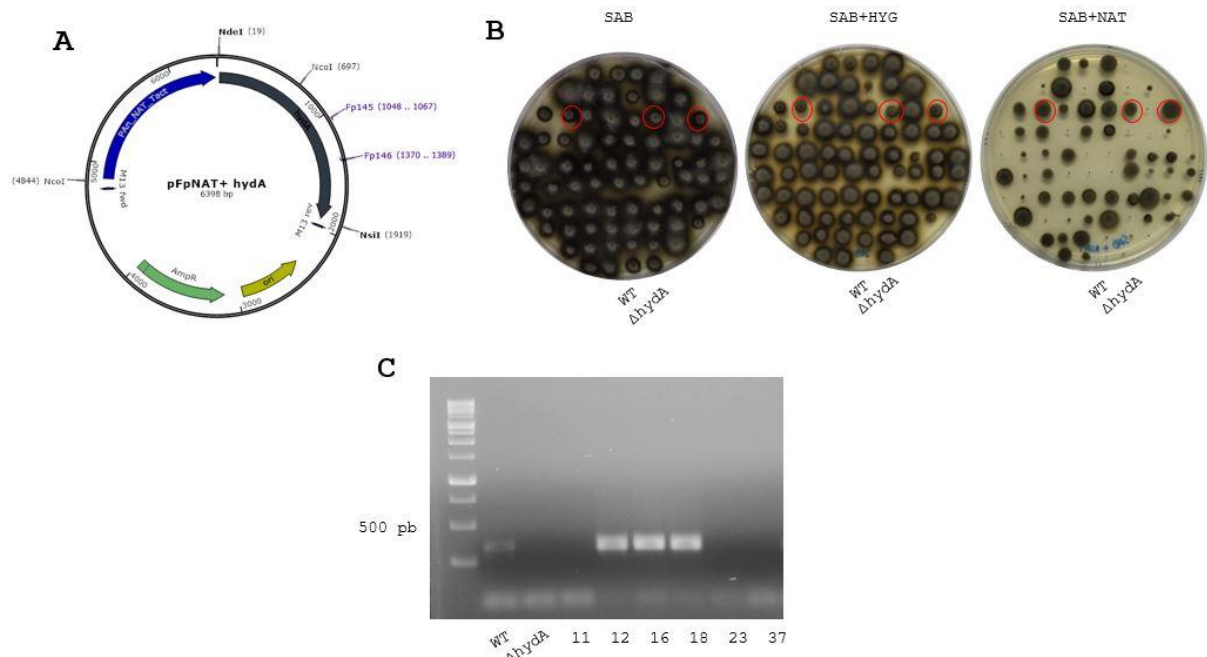


Figura 11: Reconstituição do gene *hydA*. A) Mapa do plasmídeo pFpNAT+ *hydA*. B) Transformantes obtidos após 20 dias de crescimento a 25 °C em Sabouraud ágar e selecionados em meio suplementado com 50µg/mL de Higromicina B ou 50µg/mL de Nourseotricina. WT e $\Delta hydA$ foram usados como controles. Os círculos vermelhos indicam as colônias em que o gene foi amplificado. C) Eletroforese em gel de agarose confirmando a presença do fragmento interno de 342 pb nos poços 12, 16 e 18 (oligonucleotídeos Fp 145 e Fp 146). WT usado com controle positivo (amplifica 342 pb) e $\Delta hydA$ negativo (não amplifica).

6.5 Caracterização do papel de *HydA* na patogenicidade de *F. pedrosoi*

Durante uma infecção por microorganismos patogênicos, um fator crucial para conter a progressão da doença é o reconhecimento do patógeno pelo sistema imune. Em se tratando de fungo, como a parede celular é constituída por biopolímeros, principalmente quitina e β -1,3 glucana, que não estão presentes nas células humanas, as células imunes podem reconhecê-la facilmente. Observou-se que a camada hidrofóbica presente na superfície dos conídios dos patógenos humanos *A. fumigatus* e *A. benhamiae* os tornam imunologicamente inertes, uma vez que esta camada mascara os componentes imunogênicos presentes na parede celular e reduz a resposta imunológica. No entanto, esse efeito imunoprotetor é inexistente quando a camada hidrofóbica é perdida por germinação, deleção gênica ou remoção química. (AIMANIANDA *et al.*, 2009; HEDDERGOTT *et al.*, 2012; VALSECCHI *et al.*, 2018.) Tendo em vista que uma das principais funções das proteínas hidrofóbicas em relação a virulência é o efeito imunoprotetor, avaliou-se *in vivo* os efeitos da ausência da hidrofobina *HydA* nos conídios de *F. pedrosoi*.

Para isso, foram utilizados camundongos BALB/c do tipo Nude. Após a infecção, a cada 3 dias, o diâmetro da lesão no coxim plantar era medido. Notou-se que ao longo de 78 dias, os dados do 3°, 72° e 75 °dias apresentaram um $p \leq 0,05$ indicando que, nesse período de tempo, a lesão do mutante foi estatisticamente menor que a observada nos camundongos inoculados com a linhagem selvagem (Figura 12A, 12B). Apesar disso, os dados não são muito precisos, pois observa-se que a lesão ocasionada por *F.pedrosoi* não se limita ao local da infecção, ela se espalha por toda a pata, incluindo a parte superior.

Para avaliar a carga fúngica presente no coxim plantar, os camundongos foram eutanasiados e o sobrenadante do tecido da lesão macerado foi plaqueado em meio de cultura para contagem das UFCs. Os dados indicam que apesar da infecção com mutante, visualmente, proporcionar uma lesão menos intensa (Figura 12A) e a carga fúngica na lesão ser menor, quando o mutante é comparado ao selvagem não há diferença estatística significativa (Figura 12C). Diante disso, um fator que possa contribuir para esse resultado seja o inóculo utilizado, visto que foi preparado com hifas e conídios. Como já apresentado nesse trabalho, em *F. pedrosoi* a expressão da hidrofobina parece se restringir apenas aos conídios (Figura 10C), sendo assim, a ausência de hidrofobina na hifa torna-a igualmente imunogênica tanto para linhagem selvagem quanto para o mutante.

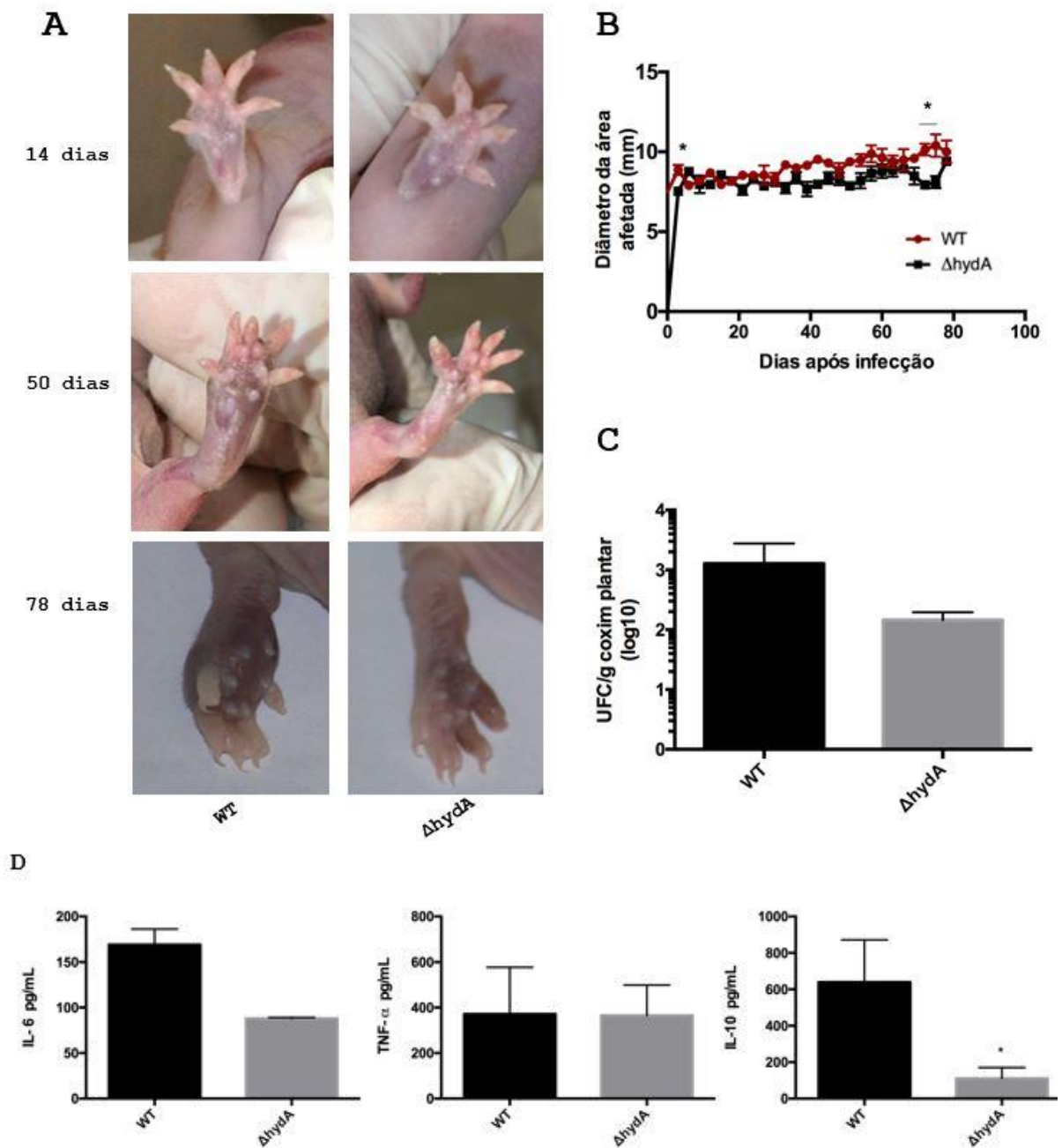


Figura 12: Infecção subcutânea em coxim plantar de camundongos Nude de BALB/c com propágulos fúngicos de *F.pedrosoi*. A) Progressão da lesão ao longo de 78 dias após infecção. B) Morfometria do coxim plantar. (C) Unidades Formadoras de colônias por grama de tecido infectado. D) Dosagem de citocinas IL-6, IL-10 e TNF- α após 78 dias de infecção. Análises estatísticas realizadas por Two-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Sidak em B, One-Way ANOVA em B, Unpaired T-test em D em que * representa $p \leq 0,05$.

Os estudos de Heddergott *et al.* (2012) e Valsecchi *et al.* (2017) mostraram que a perda da camada hidrofóbica em *A. benhamiae* e *A. fumigatus*, respectivamente, induz uma forte resposta imunológica, pois facilita o reconhecimento do conídio pelo sistema imune e aumenta liberação de citocinas

pró-inflamatórias como IL-8, IL-6 e TNF- α e anti-inflamatórias como IL-10. Em *A. benhamiae* a ausência da hidrofobina HypA favorece o reconhecimento dos conídios por neutrófilos o que facilita fagocitose e morte. Em *A. fumigatus* a ausência da hidrofobina RodA induziu a maturação de células dendríticas e a expressão de CD83 e CD86.

Mediante os resultados obtidos com a dosagem de citocinas a ausência da camada hidrofóbica em *F. pedrosoi* parece não interferir significativamente no reconhecimento do conídio pelo sistema imune uma vez que a produção de citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α entre linhagem selvagem e mutante não apresentaram diferença estatística (Figura 12D). Como o TNF- α está relacionado a resposta inflamatória aguda mediando o recrutamento de monócitos e neutrófilos para o sítio da infecção e a IL-6 estimulando a produção de neutrófilos, a ausência de diferença estatística para estes imunomoduladores indica que tanto o selvagem quando o mutante desenvolvem uma resposta inflamatória semelhante durante a infecção.

No entanto, a produção de IL-10 entre a linhagem selvagem e mutante foi significativamente diferente. Tendo em vista que IL-10 é uma citocina anti-inflamatória que impede a ativação de macrófagos e células dendríticas, esse resultado pode explicar o porquê da lesão com a linhagem selvagem ser maior visivelmente. Apesar da inflamação ser semelhante em ambas as infecções (Figura 12D), os valores de IL-10 foram maiores na infecção com a linhagem selvagem sugerindo que o patógeno seria menos fagocitado devido menor ativação de células fagocíticas, fator que poderia favorecer a maior carga fúngica na pata do animal como visto na Figura 11A. Porém é necessário realizar ensaio com macrófagos para avaliar a fagocitose e confirmar essa hipótese.

Diante disso, sugere-se que apenas a ausência de HydA não é suficiente para expor os componentes imunogênicos da parede celular de *F. pedrosoi*, no entanto a expressão de HydA parece modular a resposta imune para contenção do patógeno. A presença da melanina na superfície externa de *F. pedrosoi* é um fator de virulência que deve ser considerado. Segundo Hayakawa *et al.* (2006) a melanina exerce um efeito inibitório nos receptores que medeiam a fagocitose contribuindo com mecanismos de evasão da resposta imune.

Outra hipótese levantada é que a alteração da superfície externa do conídio após a deleção de *hydA* em *F. pedrosoi* pode ter dificultado ainda mais o

reconhecimento dos fatores imunogênicos da parede celular pelo sistema imune, uma vez que o conídio se apresenta com a superfície lisa e compactada, como evidenciada no experimento de microscopia de varredura (Figura 7A). Por fim, sugere-se ainda que apesar de HydA exercer um papel biológico relacionado a hidrofobicidade e morfologia dos conídios, pode não desempenhar um papel relevante na fisiopatologia de *F. pedrosoi* e pode não contribuir significativamente para a evasão do fungo pelo sistema imune. Nessa perspectiva, para melhor elucidar as questões aqui levantadas é necessário repetir experimentos *in vivo* com aumento do n experimental.

7. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos nesse trabalho, conclui-se o gene *hydA* de *F.pedrosoi* expressa uma proteína hidrofóbica que parece estar localizada apenas nos conídios. Sendo assim, observa-se que esta proteína exerce um papel importante na estrutura e hidrofobicidade do conídio, uma vez que na sua ausência o conídio apresentou alteração na superfície e na morfologia. Identificou-se que o conídio de *F.pedrosoi* não apresenta a camada de *rodlet* comumente encontrada em fungos filamentosos que expressam hidrofobinas de classe 1. Ele apresenta espículas semelhante a superfície de uma esponja do mar. Apesar disso, os dados moleculares relativos a análise filogenética e da disposição dos resíduos de cisteínas sugerem que *hydA* seja uma hidrofobina de classe 1. Diante da deleção de *hydA*, o conídio do mutante apresentou uma superfície lisa, compacta e amorfa. Além disso, foi possível identificar uma nova morfologia de conídio com característica oval. Sugere-se que essas modificações contribuíram para alterar o caráter hidrofóbico dos conídios, visto que apresentaram maior afinidade pela água. No entanto, essas alterações não interferiram na germinação, esporulação, crescimento em diferentes temperaturas e susceptibilidade a agentes osmóticos e estressores da parede, exceto ao SDS 0,0125% que o mutante apresentou maior resistência.

Em se tratando de fisiopatologia, os dados obtidos não elucidaram muitas questões o que favoreceu o desenvolvimento de novas hipoteses. Sugere-se que HydA não exerça um papel imunoprotetor uma vez que na sua presença os conídios foram capazes de estimular a produção de citocinas. Contudo, as alterações sofridas

na superfície do conídio, em decorrência da perda da camada de hidrofobina, associada a presença de melanina não alteraram significativamente a lesão e a carga fúngica em camundongos infectados, no entanto observou-se alteração na modulação da citocina IL-10. Os dados aqui apresentados são inéditos acerca do estudo funcional de genes em *F. pedrosoi* e poderão contribuir para o melhor entendimento da biologia e patogenicidade deste fungo.

8. REFERÊNCIAS

AIMANIANDA V.; BAYRY J.; BOZZA S.; KNIEMEYER O.; PERRUCCIO K; ELLURU S. CLAVAUD C.; PARIS S.; BRAKHAGE A.; KAVERI S.; ROMANI L.; LATGÉ J. **Nature**. v. 460, p. 1117 – 1121, 2009.

ALBUQUERQUE, P; KYAW C.; SALDANHA R.; BRIGIDO M.; FELIPE M.; SILVA-PEREIRA I. Pbh1 and Pbh2: two mycelium-specific hydrophobin genes from the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Fungal Genetics and Biology**. v. 41, p. 510 – 520, 2004.

ALMEIDA A.P.; GOMES N.M.; ALMEIDA J.L. Cromomicose: relato de caso e revisão da literatura. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**. v. 12, n.1, p. 69-71, 2014.

ANDRÉ L.S.; SANTOS, V.F.; PALMEIRA, S.R.; LUCIMAR F.; KNEIPP, L.; Nimrichter, D.S.; ALVIANO, M.L.; RODRIGUES, C.S. Biology and pathogenesis of *Fonsecaea pedrosoi*, the major etiologic agent of chromoblastomycosis. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 31, n. 5, p. 570- 591, 2007.

CARRION S.; LEAL S.; GHANNOUM M.; AIMANIANDA V.; LATGÉ J.; PEARLMAN E. The RodA hydrophobin on *Aspergillus fumigatus* spores masks dectin-1 and dectin-2-dependent responses and enhances fungal survival in vivo. **Journal of immunology**. v.191. n 5, 2013.

DUBEY M.K.; JENSEN D.F.; KARLSSON M. Hydrophobins are required for conidial hydrophobicity and plant root colonization in the fungal biocontrol agent *Clonostachys rosea*. **BMC Microbiology**. v. 14, n. 18, p. 1-14, 2014.

FERRAZ, M. Caracterização do transcrito parcial do fungo patogênico *Fonsecaea pedrosoi*. 2011. xiv, 118 f., il. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular)—Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

FLORENCIO C.S; BRANDÃO F.A.S.; TEIXEIRA M.M.; BOCCA A.L.; FELIPE

M.S.S.; VICENTE V.A; FERNANDES L. Genetic manipulation of *Fonsecaea pedrosoi* using particles bombardment and Agrobacterium mediated transformation. **Microbiological Research**. v. 207, p. 269–279, 2018.

GRÜNBACHER, A.; THROM T.; SEIDEL C.; GUTT B.; RÖHRING J.; STRUNK T.; VINCZE P.; WALHEIM S.; SCHIMMEL T.; WENZEL W.; FISCHER R. Six hydrophobins are involved in hydrophobin rodlet formation in *Aspergillus nidulans* and contribute to hydrophobicity of the spore surface. **PLoS ONE**. v. 9, n. 4, 2014.

HAYAKAWA M.; GHOSN E.; SOUZA M.; FERREIRA K.; ALMEIDA S. Phagocytosis, production of nitric oxide and pro-inflammatory cytokines by macrophages in the presence of dematiaceous fungi that causes chromoblastomycosis. **Scandinavian Journal of Immunology**. v. 64, n. 4, p. 382-387, 2006.

HEDDERGOTT C.; BRUNS S.; NIETZSCHE S.; LEONHARDT I.; KURZAI O.; KNIEMEYER O.; BRAKHAGE A.A. The *Arthroderma benhamiae* hydrophobin HypA mediates hydrophobicity and influences recognition by human immune effector cells. **Eukaryotic Cell**. v. 11, p. 673-682, 2012.

KIM M.; KIM S.; YOON J.; LEE Y.; BAHN Y. An efficient gene-disruption method in *Cryptococcus neoformans* by double-joint PCR with NAT-split markers. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 390, n. 3, p.983-988, 2009.

LAUTER F.; RUSSO V.; YANOFSKY C. Developmental and light regulation of eas, the structural gene for the rodlet protein of Neurospora. **Genes Development**. v.6, p. 2373-2381, 1992.

LINDER M.; SZILVAY G.; NARKARI-STELALA T.; PENTTILA M. Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 29, p. 877-896, 2005.

MOSBACH A.; LEROCH M.; MENDGEN K.; HAHN M. Lack of evidence for a role of hydrophobins in conferring surface hydrophobicity to conidia and hyphae of *Botrytis cinerea*. **BMC Microbiology**. v. 11, 2011.

MOUCHALOUAT, Marcelle de Figueiredo. Cromoblastomicose: estudo de uma série de 14 casos atendidos no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, de 1994-2005. 2008. 88 f. Dissertação (Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas)-Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro,

2008.

QUARANTIN A.; HADELER B.; KRÖGER C.; SCHÄFER W.; FAVARON F.; SELLA L.; MARTÍNEZ-ROCHA A. Different hydrophobins of *Fusarium graminearum* are involved in hyphal growth, attachment, water-air interface penetration and plant infection. **Frontiers in Microbiology**. v. 10, 2019.

QUEIROZ-TELLES, F. Chromoblastomycosis: A neglected Tropical Disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 57, n. 19, p. 46-50, 2015.

QUEIROZ-TALLES F.; HOOG S.; SANTOS W.C.L.; SALGADO C.G.; VICENTE V.A.; BONIFAZ A.; ROILIDES E.; XI L.; AZEVEDO C.D.M.P.E.S.; SILVA M.B; PANA Z.D, COLOMBO A.L, WALSH T.J. Chromoblastomycosis. **Clinical Microbiology Review**. v. 30, p. 233–276, 2017

SALGADO, C. G. Fungal x host interactions in Chromoblastomycosis: what we have learned from animal models and what is yet to be solved. **Virulence**. v. 1, n. 1, p. 3–5, 2010.

SANTOS A.L.; PALMEIRA V.F.; ROZENTAL S.; KNEIPP L.F.; NIMRICHTER L.; ALVIANO D.S.; RODRIGUES M.L.; ALVIANO C.S. Biology and pathogenesis of *Fonsecaea pedrosoi*, the major etiologic agent of chromoblastomycosis. **FEMS Microbiology Review**. v. 31, p. 570-591, 2007.

SEVIM A.; DONZELLI B.; WU D.; DEMIRBAG Z.; GIBSON D.; TURGEON B. Hydrophobin genes of entamopathogenic fungus, *Metarhizium brunneum*, are differentially expressed and corresponding mutants are decreased in virulence. **Current Genetics**. v. 58, p. 79-92, 2012.

THAU N.; MONOD M.; CRESTANI B.; ROLLAND C.; TRONCHIN G.; LATGÉ J.P.; PARIS S. Rodletless mutants of *Aspergillus fumigatus*. **Infection and Immunology**. v. 62, p. 4380-4388, 1994.

VALSECCHI I.; DUPRES V.; STEPHEN-VICTOR E., GUIJARRO J.I, GIBBONS J.; BEAU R.; BAYRY J.; COPPEE J.Y.; LAFONT F.; LATGÉ J.P.; BEAUVAIS A. Role of Hydrophobins in *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Fungi**. v. 24, n. 1, 2017.

WESSELS J.; DE VRIES O.; ÁSGEIRSDÓTTIR S.; SPRINGER J. The thn mutation of *Schizophyllum commune*, which suppresses formation of aerial hyphae, affects expression of the SC3 hydrophobin gene. **Jornal of General Microbiology**. v. 137, p. 2439 – 2445, 1991.

ZHANG S.; XIA Y.; KIM B.; KEYHANI N. Two hydrophobins are involved in fungal spore coat rodlet layer assembly and each play distinct roles in surface interactions, development and pathogenesis in the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. **Molecular Microbiology**. v. 80, n. 3, p. 811-826, 2011.



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 22 de junho de 2017.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "IMUNOPATOLOGIA DA CROMOBLASTOMICOSE - AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO PARASITO - HOSPEDEIRO E IDENTIFICAÇÃO DOS FATORES DETERMINANTES PARA O ESTABELECIMENTO DA CROMOBLASTOMICOSE MURINA", Protocolo n.º 46/2017, sob responsabilidade da Professora Anamélia Lorenzetti Bocca foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: *mus musculus* (270 machos). A presente aprovação é válida pelo período de: 1º/06/2017 a 30/05/2020.



uspaula

Prof.ª. Dra. Paula Diniz Galera
Coordenadora da CEUA - UnB

