

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

AMANDA BOMBASSARO

**ANÁLISE PARCIAL DO GENOMA DE *Fonsecaea monophora*
E ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO PARA CARIOTIPAGEM DO
GÊNERO**

CURITIBA

2016

AMANDA BOMBASSARO

**ANÁLISE PARCIAL DO GENOMA DE *Fonsecaea monophora*
E ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO PARA CARIOTIPAGEM DO
GÊNERO**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Área de concentração em Microbiologia, Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vânia Aparecida Vicente.

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Renata Rodrigues Gomes.

CURITIBA

2016

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Bombassaro, Amanda

Análise parcial do genoma de *Fonsecaea monophora* e estabelecimento de protocolo para cariotipagem do gênero . / Amanda Bombassaro. – Curitiba, 2016.

101 f.: il. ; 30cm.

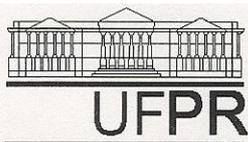
Orientador: Vânia Aparecida Vicente

Co-orientador: Renata Rodrigues Gomes

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. Levedos 2. Genômica 4. Cariótipo I. Título II. Vicente, Vânia Aparecida III. Gomes, Renata Rodrigues V. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 589.233



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

TERMO DE APROVAÇÃO

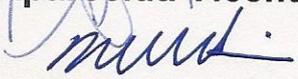
**"ANÁLISE PARCIAL DO GENOMA DE *FONSECAEA MONOPHORA*
E ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO PARA CARIOTIPAGEM
DO GÊNERO "**

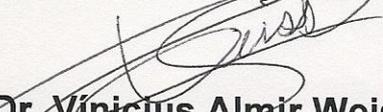
por

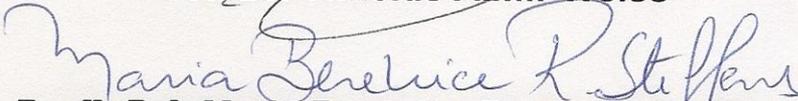
AMANDA BOMBASSARO

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos professores:


Prof^a. Dr^a. Vânia Aparecida Vicente– Presidente


Prof. Dr. Roberto Raitz


Prof. Dr. Vinicius Almir Weiss


Prof^a. Dr^a. Maria Berenice Reynaud Steffens

Curitiba, 04 de fevereiro de 2016.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por permitir esta caminhada e sempre indicar a direção a seguir!

Agradeço aos meus pais, Valdir e Salete, pelo amor e apoio constante.

Agradeço as minhas orientadoras, Vânia Aparecida Vicente e Renata Rodrigues Gomes, por todos os ensinamentos, orientação, oportunidade e incentivo.

Aos meus colegas de laboratório que sempre contribuíram gentilmente neste período.

Aos funcionários do Departamento de Patologia Básica do Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

Ao programa de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, a Coordenação do Curso, e a todos os professores pelos conhecimentos passados.

Ao Departamento de Bioquímica, Coordenação e técnicos, pelas análises realizadas, apoio de estrutura e ensinamentos compartilhados.

Ao programa de Pós-graduação em Bioinformática, a Coordenação do Curso, professores e colegas pela formação proporcionada e ensinamentos compartilhados.

Ao Centro de Biodiversidade Fúngica, CBS-Utrecht-Holanda pela linhagem cedida.

A Universidade Federal do Paraná pela oportunidade e a CAPES pelo apoio financeiro e concessão de bolsa.

E a todos que de alguma forma fizeram parte desta etapa, obrigada a todos!

RESUMO

As leveduras negras pertencentes à família Herpotrichiellaceae são microrganismos extremamente relevantes do ponto de vista ecológico e clínico. Esses organismos comuns sapróbios apresentam alta capacidade de adaptação e parecem apresentar um ciclo de vida composto e potencial de patogenicidade. No gênero *Fonsecaea* foram relatadas diferentes espécies associadas a hospedeiros humanos, animais e de fontes ambientais. *Fonsecaea monophora* é relatada como agente de cromoblastomicose com formação de corpos muriformes e agente de infecção cerebral. Buscando compreender a biologia e potencial de patogenicidade desta espécie, foi realizada sua análise genômica parcial e o desenvolvimento inicial de um protocolo para caracterização carotípica do gênero. Para isto, o genoma parcial foi obtido utilizando a combinação de leituras de sequências provenientes das plataformas Illumina e Ion Proton. O *draft* de maior qualidade obtido apresenta tamanho de 34,21Mb, com 301 *supercontigs* e N50 de 268.916 pb. A partir do genoma parcial gerado, foi realizada a anotação automática e uma análise genômica preliminar. Para a caracterização cariotípica, podemos determinar o tiabendazol como agente bloqueador do desenvolvimento celular e estabelecer o protocolo para obtenção de protoplastos.

Palavras-chave: Leveduras negras. *Fonsecaea monophora*. Anotação. Análise genômica. Cariótipo.

ABSTRACT

Black yeast belonging to Herpotrichiellaceae family are extremely relevant microorganisms ecological and clinical point of view. These common saprobes organisms have a high capacity to adapt and appear to have a life cycle compound and potential pathogenicity. In the genus *Fonsecaea* different species were reported related to human, animal and environmental sources hosts whose ecology seems to direct the evolution of clinical conditions. *Fonsecaea monophora* is reported as chromoblastomycosis agent with training muriformes bodies and brain infection agent. Trying to understand the biology and potential pathogenicity of this species, it was carried out partial genomic analysis and the initial development of a protocol for carotípica characterization of the genre. For this, the partial genome was obtained using the combination of readings from sequences of Proton Ion and Illumina platform. The higher quality obtained draft has size 34,21Mb with 301 supercontigs and N50 of 268,916 bp. From the generated partial genome automatic annotation and preliminary genomic analysis was performed. For karyotype characterization, we can determine thiabendazole as blocking agent of cell growth and establish the protocol for protoplasts.

Key words: Black yeasts. *Fonsecaea monophora*. Annotation. Genomic analysis. Karyotype.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: CROMOBLASTOMICOSE CUTÂNEA COM FORMAÇÃO DE CORPOS MURIFORMES.	21
FIGURA 2: ÁREA ENDÊMICA DE CROMOBLASTOMICOSE CONFORME RELATÓRIO DE CASOS PUBLICADOS	23
FIGURA 3: SEQUÊNCIA DOS PROCESSOS EXECUTADOS PELO SEQUENCIADOR ILLUMINA MiSEQ	31
FIGURA 4: REPRESENTAÇÃO RESUMIDA DAS ETAPAS DO SEQUENCIAMENTO EM PLATAFORMA ION PROTON.	32
FIGURA 5: REPRESENTAÇÃO DAS ETAPAS DE MONTAGEM DE UMA SEQUÊNCIA DE DNA.....	34
FIGURA 6: CONSTRUÇÃO DAS BIBLIOTECAS DE FRAGMENTO, <i>PAIRED-END</i> E <i>MATE-PAIR</i> PARA A PLATAFORMA ILLUMINA	35
FIGURA 7: ALINHAMENTO DE MONTAGEM REFERÊNCIA COM PRESENÇA DE <i>GAPS</i> E <i>MISMATCHS</i>	36
FIGURA 8: TIPOS DE ANOTAÇÃO.	38
FIGURA 9: FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE OBTENÇÃO DA MONTAGEM PARCIAL DE GENOMA E ANOTAÇÃO AUTOMÁTICA DO GENOMA DE <i>F. monophora</i>	42
FIGURA 10: CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DAS PROTEÍNAS	54
FIGURA 11: ESQUEMA DA CADEIA TRANSPORTADORA DE ELÉTRONS NA MATRIZ MITOCONDRIAL.....	55
FIGURA 12: AS REAÇÕES ENZIMÁTICAS DO CICLO DO GLIOXILATO E DO CICLO DO ÁCIDO CÍTRICO (TCA)	58
FIGURA 13: ALGUMAS VIAS DE SINALIZAÇÃO QUE ENVOLVEM A CDC42.	59
FIGURA 14: VIA DHN DE SÍNTESE DE MELANINA EM FUNGOS	62
FIGURA 15: ANOTAÇÃO AUTOMÁTICA DO DNA MITOCONDRIAL GERADO NO SOFTWARE SILA.....	63

FIGURA 16: GRÁFICO COM MÉDIA DE ESPOROS GERMINADOS EM TRÊS REPETIÇÕES REALIZADAS.....	64
FIGURA 17: PLACAS DE ÁGAR SABOURAUD ESTRIADAS COM SOLUÇÃO DE ESPOROS DE <i>F. monophora</i>	65
FIGURA 18: OBTENÇÃO DE PROTOPLASTO DE <i>Fonsecaea monophora</i> . CHEF-DRII E PLUGS DE AGAROSE CONTENDO PROTOPLASTOS	67

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: CASOS NOTIFICADOS DE INFECÇÃO CEREBRAL CAUSADA POR <i>F. monophora</i>	28
TABELA 2: QUATRO CONJUNTOS DE DADOS GERADOS NOS SEQUENCIAMENTOS GENÔMICOS REALIZADOS DE <i>F. monophora</i>	51
TABELA 3: MONTAGENS REALIZADAS COM OS QUATRO CONJUNTOS DE DADOS OBTIDOS DOS SEQUENCIAMENTOS GENÔMICOS DE <i>F. monophora</i>	52
TABELA 4: DADOS DA MONTAGEM DE MAIOR QUALIDADE OBTIDA DO GENOMA DE <i>F. monophora</i>	53
TABELA 5: SEQUÊNCIAS DE DNA ANOTADAS COMO PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA RESPIRAÇÃO CELULAR PELA ANÁLISE DE SIMILARIDADE DE SEQUÊNCIA GENÔMICA.....	55
TABELA 6: SEQUÊNCIAS DE DNA ANOTADAS COMO PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS PELA ANÁLISE DE SIMILARIDADE DE SEQUÊNCIA GENÔMICA.....	56
TABELA 7: SEQUÊNCIAS DE DNA ANOTADAS COMO PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NO CICLO DO GLIOXILATO PELA ANÁLISE DE SIMILARIDADE DE SEQUÊNCIA GENÔMICA.....	57
TABELA 8: SEQUÊNCIAS DE DNA ANOTADAS COMO PROTEÍNAS RELACIONADAS AO ESTRESSE OXIDATIVO PELA ANÁLISE DE SIMILARIDADE DE SEQUÊNCIA GENÔMICA.....	59
TABELA 9: SEQUÊNCIAS DE DNA ANOTADAS COMO PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO PELA ANÁLISE DE SIMILARIDADE DE SEQUÊNCIA GENÔMICA.....	60

TABELA 10: SEQUÊNCIAS DE DNA ANOTADAS COMO PROTEÍNAS RELACIONADAS A PRODUÇÃO DE MELANINA PELA ANÁLISE DE SIMILARIDADE DE SEQUÊNCIA GENÔMICA..... 61

TABELA 11: AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA FORMAÇÃO DE PROTOPLASTOS EXPOSTOS AOS DIFERENTES ESTABILIZADORES OSMÓTICOS ASSOCIADO AO TEMPO DE EXPOSIÇÃO DOS ESPOROS À SOLUÇÃO ENZIMÁTICA. 66

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

α	Alfa
μL	Microlitros
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
ATP	Trifosfato de adenosina
BACs	Cromossomos bacterianos artificiais
CBS	Centro de Biodiversidade Fúngica
CDC 42	Proteínas de controle de divisão celular 42
cm^2	Centímetro quadrado
COG	Cluster of orthologous groups (Conjunto de grupos ortólogos)
CTAB -	Cetyltrimethylammonium bromide (Brometo de cetiltrimetilamônio)
DDBJ	DNA Data Bank of Japan (Banco de DNA do Japão)
DHN	1,8-dihidroxi-naftaleno
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucléico)
DOPA	3,4-dihidroxifenilalanina
EMBL	European Molecular Biology Laboratory (Laboratório Europeu de Biologia Molecular)
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GO	Gene Ontology (Ontologia Gene)
GTBM	Germ Tube Burst Method (Método da Ruptura do Tubo Germinativo)
Hsp	Heat shock protein (Proteína de choque térmico)
kb	Quilobyte
KCl	Cloreto de potássio
kDa	Kilo Dalton – Unidade de massa atômica
KEGG	Enciclopédia de genes e genomas de Kyotto
LCD	Lethargic crab disease (Doença do caranguejo letárgico)
Mb	Megabyte
MFS	Major facilitator superfamily (Maior Superfamília Facilitadora)
mg	Miligramas

MgSO ₄	Sulfato de magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NaH ₂ PO ₄	Fosfato monossódico
NCBI	National Center for Biological Information (Centro Nacional de Informação Biológica)
ng	Nanogramas
nm	Nanômetros
NPM	Nextera PCR Master Mix (Mistura para PCR Nextera)
OLC	Overlap layout consensus (Consenso de sobreposição)
ORF	Open Reading Frame (Fases abertas de leitura)
pb	Pares de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis (Eletroforese em Gel de Campo Pulsado)
pH	Potencial hidrogeniônico
RNA	Ribonucleic acid (Ácido ribonucléico)
RSB	Resuspension Buffer (Tampão de ressuspensão)
TD	Tagment DNA Buffer (Tampão de Fragmentação do DNA)
TDE1	Tagment DNA Enzyme (Enzima de Fragmentação do DNA)
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1	IMPORTÂNCIA CLÍNICA DAS LEVEDURAS NEGRAS	17
3.2	CROMOBLASTOMICOSE E SEUS AGENTES ETIOLÓGICOS	20
3.3	GÊNERO <i>Fonsecaea</i>	24
3.4	<i>Fonsecaea monophora</i>	26
3.5	SEQUENCIAMENTO GENÔMICO	29
3.6	MONTAGEM DE GENOMA	33
3.7	ANOTAÇÃO GENÔMICA	37
3.8	CARACTERIZAÇÃO CARIOTÍPICA EM FUNGOS	39
4	MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1	LINHAGEM UTILIZADA	42
4.2	SEQUENCIAMENTO GENÔMICO E MONTAGEM	42
4.2.1	Extração e Purificação de DNA	42
4.2.2	Construção das Bibliotecas Genômicas nas plataformas Illumina MiSeq e Ion Proton	43
4.2.3	Sequenciamento Genômico e Análise Qualitativa das Sequências	45
4.2.4	Montagens e Análise Qualitativa Das Montagens	46
4.2.5	Ordenação de Contigs e Fechamento de Gaps	46
4.2.6	Anotação Automática e Análise Genômica Parcial	47
4.3	CARACTERIZAÇÃO CARIOTÍPICA	47
4.3.1	Cariotipagem Citológica	47
4.3.2	Cariotipagem Eletroforética	48
5	RESULTADOS	51
5.1	SEQUENCIAMENTO GENÔMICO E MONTAGEM	51
5.1.1	Anotação Automática e Análise Genômica Parcial	53
5.1.2	Montagem do DNA Mitocondrial	63
5.2	CARACTERIZAÇÃO CARIOTÍPICA	63
5.2.1	Cariotipagem Citológica	63

5.2.2	Cariotipagem Eletroforética	65
6	DISCUSSÃO	68
7	CONCLUSÃO	74
8	PERSPECTIVAS	75
	REFERÊNCIAS	76
	ANEXOS	93

1 INTRODUÇÃO

As leveduras negras pertencentes à família Herpotrichiellaceae são microrganismos extremamente relevantes do ponto de vista ecológico e clínico. Esses organismos comuns sapróbios apresentam alta capacidade de adaptação e um ciclo de vida composto e potencial de patogenicidade, justificando assim, a baixa ocorrência ambiental e a frequência de infecção em hospedeiros animais. Este potencial de infecção parece ser polifilético e conseqüentemente difere entre as espécies. As infecções recorrentes e consistentes indicam uma possibilidade de adaptação ao hospedeiro e são reconhecidamente causadas por poucas espécies que frequentemente são morfológicamente muito similares. Sendo assim, um critério eficiente é fundamental para entender a ligação entre doença e a ecologia ambiental do agente (NAJAFZADEH *et al.*, 2011a; NAJAFZADEH *et al.*, 2011b; BADALI *et al.*, 2008).

Dentre as infecções causadas por estes organismos, a cromoblastomicose é caracterizada pelo aparecimento de lesões cutâneas e subcutâneas de aspecto verrugoso podendo emergir como erupções ulcerativas de aspecto tumoral (HOOG *et al.*, 2004, NAJAFZADEH *et al.*, 2009, NAJAFZADEH *et al.*, 2010; NAJAFZADEH *et al.*, 2011b, VICENTE *et al.*, 2012). Embora a inoculação traumática de espinhos ou lascas de madeira seja a provável fonte de infecção, o processo e a via de dispersão estão insuficientemente esclarecidos (SALGADO *et al.*, 2004; VICENTE *et al.*, 2014). Vários gêneros abrigam espécies causais de cromoblastomicose, como *Rhinocladiella*, *Phialophora*, *Cladophialophora*, *Exophiala* e *Fonsecaea* (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2015). Estudos da epidemiologia molecular da doença revelaram que o gênero *Fonsecaea* apresenta quatro espécies causais, distribuídas ao longo das áreas endêmicas no mundo: *Fonsecaea pedrosoi*, *F. nubica*, *F. monophora* e *F. pugnacius* (NAJAFZADEH *et al.*, 2011a; AZEVEDO *et al.*, 2015). Enquanto *F. pedrosoi* e *F. nubica* são estritamente associadas à cromoblastomicose e formação de corpos muriformes, *F. monophora* e *F. pugnacius* também têm sido relatadas em infecções cerebrais e outros órgãos (LI; HOOG, 2009).

Fonsecaea monophora está associada à cromoblastomicose com formação de corpos muriformes, sendo o agente causal predominante no sul da China (ZHANG *et al.*, 2008). Esta espécie também pode apresentar neurotropismo no hospedeiro humano sendo agente de infecção cerebral primária, em que os sintomas neurológicos são as primeiras indicações de infecção, uma vez que a disseminação ocorre despercebida (SURASH *et al.* 2005; TAKEI *et al.* 2007; KOO *et al.*, 2010).

Questões referentes à rota de infecção, agentes causais e à relação dos agentes com a variabilidade dos casos clínicos e conseqüentemente variações, ao que se refere à resposta ao tratamento e cura da doença, assim como o potencial de virulência dos isolados procedentes de origem humana e ambiental devem ser esclarecidas. A doença representa um problema de saúde pública para a população de determinadas regiões brasileiras e áreas tropicais, e em função deste cenário, ampliar o entendimento dos genes envolvidos nos mecanismos de virulência, patogenicidade e maior compreensão da biologia destes agentes, possibilitando o desenvolvimento de biomarcadores para diagnóstico, estudos epidemiológicos e alvos para o desenvolvimento de drogas e protocolos de tratamento são uma demanda emergencial.

Dentro deste contexto, o presente trabalho teve por objetivo gerar e analisar dados genômicos e caracterizar o cariótipo da espécie *F. monophora*, visando à obtenção de dados para entendimento dos genes envolvidos nos mecanismos de virulência, patogenicidade e maior compreensão da biologia desse agente.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar análise genômica e cariotipagem da espécie *Fonsecaea monophora*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar o sequenciamento genômico da levedura *F. monophora*.
- Obter *draft* do genoma de alta qualidade.
- Realizar a anotação parcial do genoma e análise genômica preliminar.
- Caracterizar o cariótipo da espécie *F. monophora*.
- Desenvolver protocolo para a realização de cariotipagem do gênero *Fonsecaea*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 IMPORTÂNCIA CLÍNICA DAS LEVEDURAS NEGRAS

As leveduras negras são fungos cuja principal característica é a pigmentação escura na parede celular das células vegetativas e reprodutivas. Este grupo mostra grande capacidade de adaptação, isto permite que tolerem uma grande variedade de condições hostis como altas temperaturas, radiação UV, elevadas concentrações de sal, dessecação, variações no pH e deficiência de nutrientes (HOOG *et al.*, 2000; ESTERRE; QUEIROZ-TELLES, 2006).

Formam um grupo heterogêneo quanto à taxonomia e filogenia que abrange membros Ascomicetos pertencentes quase que exclusivamente às ordens Dothideales e Chaetothyriales (HOOG *et al.*, 2000; SATOW, 2008). A ordem Chaetothyriales abriga a família Herpotrichiellaceae, a qual reúne microrganismos relevantes do ponto de vista ecológico e clínico, os quais apresentam potencial de patogenicidade em hospedeiros animais. As leveduras desta família apresentam crescimento lento, inicialmente leveduriforme, e com o tempo, a textura da colônia torna-se aveludada com hifas pigmentadas. As principais espécies pertencem aos gêneros *Exophiala*, *Cladophialophora*, *Capronia*, *Fonsecaea*, *Phialophora*, *Rinocladiella*, *Veronea* e *Cyphellophora* (HOOG *et al.*, 2000).

De acordo com Alviano e colaboradores (2004) a maioria das leveduras negras são sapróbios habituais do solo e de vegetais em decomposição. Porém, diversos desses agentes são considerados oportunistas colonizando hospedeiros humanos e animais (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2011; ESTERRE; QUEIROZ-TELLES, 2006). E para isso, a infecção depende basicamente de três fatores para se estabelecer: a resistência do hospedeiro, a quantidade do inóculo e a virulência do fungo (ALVIANO *et al.*, 2004).

Um importante fator de virulência nas leveduras negras é a termotolerância (HOOG *et al.*, 2011). O aumento de relatos de doenças fúngicas causadas por estes agentes em animais domésticos e selvagens, invertebrados e vertebrados de sangue quente ou frio (SEYEDMOUSAVI *et al.*,

2014) demonstram que a temperatura pode ser um fator determinante na escolha pelo hospedeiro (HOOG *et al.*, 2011).

A melanina também parece contribuir com a virulência desses organismos, por reforçar a resistência das células fúngicas em resposta ao sistema imune do hospedeiro. Este pigmento provavelmente possibilita três mecanismos: a redução da fagocitose, a proteção dos fungos contra as enzimas hidrolíticas produzidas por macrófagos e contra os derivados de oxigênio e nitrogênio. Apesar dos mecanismos de invasão do sistema imune e permanência nos tecidos humanos serem desconhecidos, sabe-se que a produção da melanina protege o fungo contra a ativação de macrófagos e neutrófilos (ALVIANO *et al.*, 2004; BOCCA *et al.*, 2006).

Acredita-se também que a síntese de polissacarídeos representa um fator de virulência nas leveduras negras, uma estratégia alternativa em condições desfavoráveis (CORRADI *et al.*, 2006). Alviano e colaboradores (1991) demonstraram que os polissacarídeos da parede celular de *F. pedrosoi* foram capazes de induzir uma reação granulomatosa em animais e estão relacionados com a patogenicidade da espécie. Um polissacarídeo encontrado na parede celular de algumas espécies do gênero *Fonsecaea* é a α -1-3-glucana, presente em todos os fungos patogênicos dimórficos estudados e relacionado à virulência de alguns, como o *Histoplasma capsulatum* e o *Paracoccidioides brasiliensis* (GIMENES *et al.*, 2005).

Estima-se que mais de uma centena de espécies de fungos negros possam causar doenças, os quais podem se apresentar nos tecidos lesionados como hifas, pseudohifas, células leveduriformes ou qualquer combinação destas formas. As leveduras negras patógenas e oportunistas de humanos e animais destacam-se como agentes de eumicetomas, cromoblastomicose e feohifomicoses; que podem permanecer nos locais de inoculação traumática, interiorizar-se ou disseminar-se (ESTERRE; QUEIROZ-TELLES, 2006; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2015).

O micetoma consiste na formação de nódulos contendo grãos nos tecidos. É caracterizado como uma infecção crônica e de longa evolução. Quando causado por fungos é denominado de eumicetoma e relacionado com vários agentes etiológicos. A infecção ocorre a partir da inoculação traumática e há um aumento significativo do volume do membro, com deformidade e

limitação funcional. A doença é classificada como subcutânea, localizada com disseminação rara (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2015). Os eumicetomas apresentam textura fibrosante, fazendo com que a resposta aos tratamentos convencionais seja prejudicada, já que os antifúngicos não alcançam as concentrações necessárias no sítio de infecção. Por isto, o tratamento atual consiste no uso de terbinafina, voriconazol e posaconazol; aliados ao tratamento cirúrgico (SAMPAIO & RIVITTI, 2014).

A cromoblastomicose caracteriza-se como uma infecção subcutânea, causada por diversos fungos negros, os quais formam corpos septados nos tecidos, denominados de muriformes. A doença apresenta a evolução lenta de lesões verrucosas nos tecidos (ESTERRE; QUEIROZ-TELLES, 2006).

A feohifomicose abrange as micoses oportunistas causadas por fungos negros, que ocorrem desde as formas superficial, cutânea, subcutânea e até disseminada, sem formação de corpos muriformes. Nesta infecção os agentes apresentam-se nos tecidos como células leveduriformes ou elementos vesiculares, pseudo-hifas, hifas septadas, catenulares ou torulóides. Sua ocorrência se dá principalmente em regiões de clima tropical como Madagascar, norte da Venezuela, e região amazônica do Brasil, mas também há relatos da ocorrência de casos em regiões de clima temperado (ESTERRE; QUEIROZ-TELLES, 2006). Trata-se de uma infecção esporádica, cosmopolita, que acomete indivíduos imunocompetentes e imunossuprimidos; podendo acometer animais de várias espécies (REVANKAR *et al.*, 2002). Em imunodeprimidos, a distinção entre cromoblastomicose e feohifomicose pode se tornar difícil devido à deficiência da resposta imune destes hospedeiros, a qual provavelmente não acarreta condições adequadas para a formação dos corpos muriformes (HOOG, 1998).

A feohifomicose cutânea e subcutânea ocorre principalmente em indivíduos adultos, imunodeficientes, frequentemente em pacientes entre 50 e 80 anos. Os agentes etiológicos mais freqüentes são dos gêneros *Exophiala*, *Alternaria* e *Wangiella*, sendo a espécie mais relatada *E. jeanselmei* (ROSSETTO *et al.*, 2010). A feohifomicose cerebral tem apresentado ampla distribuição geográfica, relatada desde a Europa, Ásia, África, América do Norte e Sul. Os principais agentes tem sido *Cladophialophora bantiana*, *Exophiala dermatitidis* e *Ramichloridium mackenziei* (NÓBREGA *et al.*, 2003).

Em animais, a doença tem ocorrido em gatos e caranguejo (NAJAFZADEH *et al.*, 2011b; VICENTE *et al.*, 2012). Feohifomicose disseminada é uma infecção rara; porém, sua incidência tem sido crescente e frequentemente fatal. Entre as décadas de 60 a 80, foram relatados 11 casos, dos quais 8 acometeram pacientes imunocompetentes; já na década de 90 foram notificados 45 casos, destes, 41 pacientes com algum tipo de imunodeficiência, normalmente induzida pela quimioterapia. Isto sugere que o principal motivo para o aumento no número de casos da forma disseminada da doença pode ser imunodeficiência causada por intensos tratamentos medicamentosos (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2015). *Scedosporium prolificans* tem emergido como principal agente etiológico da feohifomicose disseminada, mas novos agentes são relatados anualmente (REVANKAR *et al.*, 2002). O tratamento da feohifomicose tem sido realizado com o uso de itraconazol, anfotericina B, fluconazol e cetoconazol, associado à remoção cirúrgica. O desenvolvimento de novos agentes antifúngicos e a combinação de terapias podem ser opção para um melhor tratamento desta infecção no futuro (SCHIEFFELIN, 2014).

3.2 CROMOBLASTOMICOSE E SEUS AGENTES ETIOLÓGICOS

A cromoblastomicose foi descrita em 1914 por Max Rudolph, um médico alemão que estava radicado no Brasil, onde comunicou os primeiros seis casos da doença (RUDOLPH, 1914). Trata-se de uma infecção crônica causada por leveduras negras (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2009). Acredita-se que a infecção inicia a partir de lesão primária, começando no local de inoculação do agente etiológico, depois ocorre o envolvimento cutâneo crônico, podendo ou não avançar para os tecidos subcutâneos com uma reação tecidual granulomatosa, purulenta e fibrótica (ESTERRE; QUEIROZ-TELLES, 2006). Quando a resposta imune do hospedeiro é iniciada, ocorre a formação de corpos acastanhados redondos com paredes grossas, aparecendo de forma isolada ou agrupada. Estes corpos apresentam divisão binária e são denominados de corpos muriformes, escleróticos ou corpúsculos fumagóides (FIGURA 1) (VICENTE, 2000).

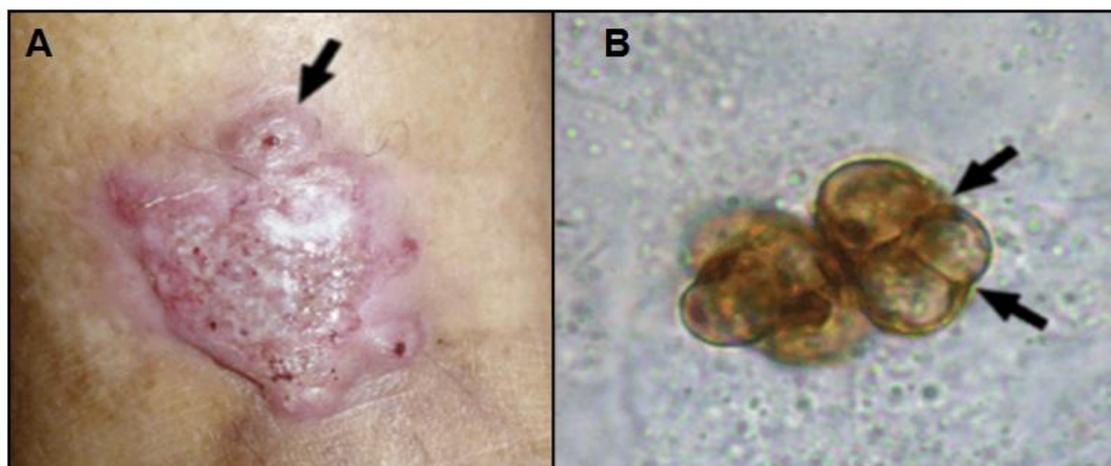


FIGURA 1: CROMOBLASTOMICOSE CUTÂNEA COM FORMAÇÃO DE CORPOS MURIFORMES. A) Lesão de cromoblastomicose cutânea. B) Corpos muriformes em microscopia ótica.

FONTE: SALGADO *et al.*, 2004.

As lesões são clinicamente polimórficas e podem tornar-se recalcitrantes à terapia, extremamente difíceis de erradicar, se não forem reconhecidas nos estágios iniciais (GARNICA *et al.*, 2009). Em sua forma cutânea e subcutânea apresenta uma evolução lenta de lesões com superfície verrucosa nos tecidos; atingindo frequentemente membros inferiores, sendo que lesões nos membros superiores, nádegas e em outras regiões do corpo ocorrem com menor frequência (VICENTE, 2000). As lesões são secas e não provocam dor, devido a isso é muito comum casos de pacientes que apresentam lesões por muitos anos (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2009). Na forma sistêmica ou disseminada, os órgãos internos podem ser invadidos por alguns agentes etiológicos desta doença. Algumas vezes a infecção acomete o cérebro, sendo que as lesões podem ser isoladas ou múltiplas; e aparecem como abscessos encapsulados ou infiltrações inflamatórias generalizadas (FERREIRO *et al.*, 2007).

Devido à morfologia diversificada das lesões, o diagnóstico é feito pela observação de corpos muriformes no exame micológico direto e/ou histopatológico; bem como pelo isolamento e a identificação na cultura (RIBEIRO, 2006; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2009). Células muriformes podem ser facilmente observadas nos exames micológicos diretos de raspados de lesões preparadas com hidróxido de potássio (KOH) (10-40%), já que a

sensibilidade deste exame chega a 90 e 100%. Já em análises histológicas, as lesões são caracterizadas por hiperplasia epidérmica alternando com áreas de atrofia e agrupamentos de células inflamatórias formando abscesso epidérmico. Reação granulomatosa com diferentes graus de fibrose pode ser encontrada no nível dérmico (JAMIL *et al.*, 2012).

Em meio de cultura, a semelhança morfológica entre as leveduras negras dificulta a determinação da classificação taxonômica (VICENTE, 2000). Assim, a identificação das espécies baseia-se em métodos moleculares e genes específicos (HOOG *et al.*, 2004; QUEIROZ-TELLES; SANTOS, 2013; VICENTE *et al.*, 2014). Para leveduras negras, as análises moleculares indicadas são o sequenciamento das regiões *small subunit*, *internal transcribed spacer*, *elongation factor-1*, tubulina e actina (BADALI *et al.*, 2008; ZENG; HOOG, 2008). Entretanto, Zeng e Hoog (2008), ao analisarem as sequências *internal transcribed spacer*, tubulina e actina de 156 cepas de *E. spinifera* concluíram que os dados das sequências *internal transcribed spacer* são confiáveis para a reconstrução filogenética e identificação das espécies desta clade.

No tratamento da cromoblastomicose têm sido utilizadas diversas drogas como anfotericina B, tiabendazol e itraconazol. Atualmente, procedimentos clínicos também têm sido usados com melhores perspectivas, como tratamento cirúrgico e crioterapia (MARTÍNEZ; TOVAR, 2007). Embora as espécies não apresentem diferenças em aspectos clínicos, podem apresentar diferenças em sua sensibilidade *in vitro* a drogas antifúngicas. *Cladophialophora carrionii*, *Phialophora verrucosa* são consideradas mais suscetíveis aos antifúngicos que *Fonsecaea pedrosoi*, por exemplo. E mesmo dentro de um gênero, diferenças na susceptibilidade têm sido relatadas entre as espécies, como ocorre com *F. pedrosoi*, *F. monophora* e *F. nubica* (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2015).

A maioria dos casos de cromoblastomicose ocorrem em regiões de clima tropical, como Madagascar, Brasil, México, República Dominicana, Caribe, Venezuela, Índia, norte da Austrália e sul da China (FIGURA 2) (NAJAFZADEH *et al.*, 2011a; REISS *et al.*, 2012). A doença é menos frequente no Hemisfério Norte, mas foram descritos casos na Europa (PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA *et al.*, 2014), nos EUA, em Louisiana e Texas (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2011; LA HOZ; BADDLEY, 2012; LUPI *et al.*, 2005; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2003). Os principais fatores de risco associados com a cromoblastomicose são a idade

adulta, sexo masculino, trabalho rural ou atividades ao ar livre, a falta de calçados de proteção, luvas ou roupas, e má nutrição e hábitos de higiene (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2011).

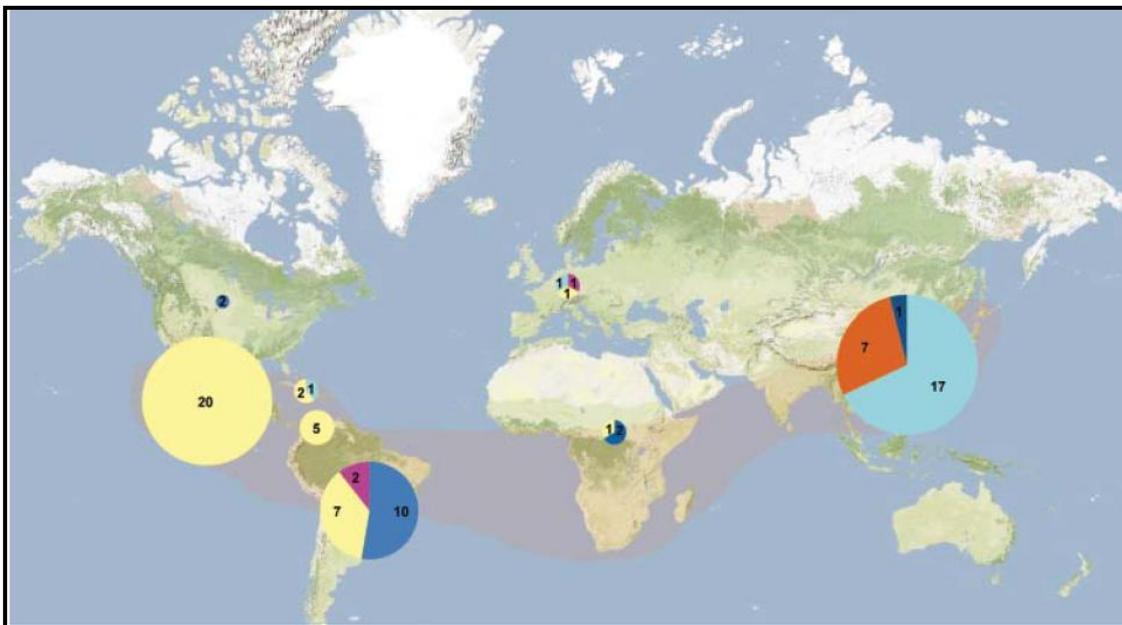


FIGURA 2: ÁREA ENDÊMICA DE CROMOBLASTOMICOSE CONFORME RELATÓRIO DE CASOS PUBLICADOS. A faixa sombreada em rosa corresponde a área endêmica conforme relatório de casos publicados. Os valores correspondem ao número de amostras analisadas pelos autores e as cores correspondem a *F. nubica* para laranja e lilás, *F. monophora* para azul claro e azul escuro e *F. pedrosoi* para amarelo.

FONTE: NAJAFZADEH, M.J. *et al.*, 2011a.

Os agentes etiológicos são principalmente os fungos pertencentes aos gêneros *Rhinocladiella*, *Phialophora*, *Cladophialophora*, *Exophiala* e *Fonsecaea* (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2015).

O gênero *Rhinocladiella*, descrito em 1934 é associado à casos relatados no continente americano. Tendo *R. aquaspersa* relacionada a infecções de pele e formação de corpos muriformes, enquanto *R. mackenziei* como agente de infecções cerebrais em indivíduos saudáveis, associadas à alta mortalidade (BADALI *et al.*, 2010).

O gênero *Phialophora* foi introduzido em 1915 por Medlar, também caracterizado pela presença hifas pigmentas (VICENTE, 2000). A primeira espécie descrita foi *P. verrucosa* isolada de uma lesão de pele humana (HOOG

et al., 1999), sendo a espécie do gênero mais associada a casos de cromoblastomicose cutânea (RADOUANE *et al.*, 2013).

A primeira espécie do gênero *Cladophialophora* foi descrita em 1980 por Borelli, *C. ajelloi* Borelli, agente de cromoblastomicose cutânea e subcutânea (VICENTE, 2000). *Cladophialophora carrionii* é um dos agentes etiológicos mais frequentes de cromoblastomicose humana em climas secos e semi-áridos; esta espécie é caracterizada por apresentar colônia de crescimento moderado, com temperatura máxima de crescimento em torno de 37°C (HOOG *et al.*, 2007). E *Cladophialofora bantiana* está entre os principais agentes que acometem o sistema nervoso central (REVANKAR *et al.*, 2002).

O gênero *Exophiala* foi formalmente descrito por J.W. Carmichael em 1966 e é composto por fungos melanizados dimórficos, responsáveis por um espectro de doenças, incluindo feohifomicoses, micetomas, cromoblastomicoses e fungemia. A espécie *E. jeanselmei* é a predominante nestas infecções, seguida de *E. dermatitidis* e *E. spinifera* (BADALI *et al.*, 2010).

3.3 GÊNERO *Fonsecaea*

O gênero *Fonsecaea* foi estabelecido em 1930, a partir do agente de cromoblastomicose *Hormodendrum pedrosoi*. Negroni propôs o novo gênero a partir da correlação destes agentes com os quadros clínicos de cromoblastomicose e a formação de corpos muriformes nos tecidos, associado às características morfológicas (VICENTE, 2000). O gênero abriga alguns dos principais agentes de cromoblastomicose do mundo, sendo prevalentes em regiões de clima tropical e subtropical úmido. Esterre e colaboradores (1996) relataram 61,8% casos de cromoblastomicose de Madagascar tendo como agente etiológico, uma espécie do gênero *Fonsecaea*. Já no Sri Lanka, 94% dos 71 casos de cromoblastomicose foram causadas por estes agentes (ATTAPATTU, 1997). No Gabão (África equatorial) todos os 64 casos de cromoblastomicose relatados foram causados por este gênero (KOMBILA *et al.*, 1995). No Brasil, dois trabalhos relataram altos índices de casos de cromoblastomicose causados pelo gênero *Fonsecaea*; 98% de 325 casos na

região amazônica relatados por Silva e colaboradores (1999) e 99% dos casos relatados em 2014 (DONG *et al.*, 2014).

Dentro do gênero *Fonsecaea*, o agente mais frequente de cromoblastomicose é *F. pedrosoi* (DONG *et al.*, 2014) implicado em 99% dos casos reportados (VICENTE *et al.*, 2008; AZEVEDO *et al.*, 2015). E apesar de estar estritamente relacionado à formação de corpos muriformes, também já foi relatado causando abscesso cerebral (MADHUGIRI *et al.*, 2013) e inflamação de córnea pós trauma (CHAIDAROON *et al.*, 2015). A segunda espécie com maior frequência de isolamento em casos clínicos causados por este gênero é *F. monophora* (HOOG *et al.*, 2000). Relatada, também, como agente de infecções cerebrais invadindo o sistema nervoso central de pacientes (SURASH, *et al.*, 2005). Outra espécie relacionada à cromoblastomicose é *F. nubica* (NAJAFZADEH *et al.*, 2010). Morfologicamente é muito semelhante a *F. pedrosoi* e *F. monophora* e foi relatada como agente etológico da infecção em diversos países como na China (SLESACK *et al.*, 2011), França (CATEAU *et al.*, 2014) e países do sul da África (NAJAFZADEH *et al.*, 2011a; SUN *et al.*, 2012). Já a espécie *F. pugnacius*, recentemente descrita (AZEVEDO *et al.*, 2015), apresenta características particulares diante do gênero, sendo a única espécie a causar lesões com corpos muriformes e abscessos no cérebro em um mesmo paciente humano imunocompetente. A análise histopatológica, deste caso, relatava a presença de células muriformes em amostra de pele e hifas em amostra de cérebro, indicando uma mudança na conformação celular para uma morfologia invasiva (AZEVEDO *et al.*, 2015).

Sendo assim, o potencial invasivo difere significativamente entre as espécies do gênero *Fonsecaea* (VICENTE *et al.*, 2012). *Fonsecaea pedrosoi* e *F. nubica* são estritamente associadas à cromoblastomicose e à formação de corpos muriformes, enquanto *F. monophora* e *F. pugnacius* podem também serem associadas à feohifomicose, tendo sido relatadas em infecções disseminadas no cérebro e outros órgãos com hifas no tecido (LI; HOOG, 2009; AZEVEDO *et al.*, 2015).

Embora as espécies do gênero *Fonsecaea* estejam principalmente relacionadas a infecções em hospedeiros humanos (HOOG *et al.*, 2004, NAJAFZADEH *et al.*, 2009, VICENTE *et al.*, 2012), outras espécies do gênero têm sido relacionadas à infecção sistêmica com invasão de sistema nervoso

central em hospedeiros animais. A espécie *F. multimorphosa* foi isolada do cérebro de um gato que apresentou distúrbios neurológicos como perda da coordenação dos movimentos. Também considerada uma espécie oportunista, já que o hospedeiro animal estava em terapia medicamentosa pós-operatória (NAJAFZADEH *et al.*, 2011b). A doença do caranguejo letárgico (LCD) recebeu esta denominação pelos sintomas que provoca, deixando os animais lentos e provocando perda da coordenação muscular. Desde 1997, tem provocado alta mortalidade do *Ucides cordatus*, espécie de caranguejo importante na ecologia e economia da costa brasileira (SCHMIDT, 2006). Após estudo, duas espécies foram associadas à LCD, *Exophiala cancerae*, como agente primário de infecção e *F. brasiliensis* como oportunista (VICENTE *et al.*, 2012).

Vicente e colaboradores (2014) descreveram espécies ambientais para este gênero, *F. erecta* e *F. minima*, isoladas de fontes ambientais no Brasil. Neste mesmo estudo, também foram isoladas de matéria orgânica em decomposição as espécies *F. monophora*, *F. multimorphosa*, *F. brasiliensis* e *F. pedrosoi*, indicando um possível mecanismo de adaptação ao hospedeiro.

O gênero *Fonsecaea* está associado à diversas doenças, as quais são reconhecidamente causadas por espécies que são morfologicamente muito similares (VICENTE *et al.*, 2012), mas o potencial de infecção parece ser polifilético e conseqüentemente difere entre elas. As espécies patogênicas apresentam o ciclo de vida composto e potencial de patogenicidade que justificam a baixa ocorrência ambiental e a alta frequência de infecção em hospedeiros animais (NAJAFZADEH *et al.*, 2010; 2011a; BADALI *et al.*, 2008).

3.4 *Fonsecaea monophora*

A espécie *F. monophora* foi isolada pela primeira vez em 1936, em um caso de cromoblastomicose em humano na América do Sul, por Moore e Almeida; mas foi descrita somente em 2004 por Hoog, G.S; Vicente, V.A. & D. Attili. Esta espécie apresenta um perfil de virulência diferenciado dentro de sua clade, sendo relatada como agente de cromoblastomicose e agente causal de infecção cerebral primária em humanos (ZHI XIE *et al.*, 2012). A via de infecção neuroinvasiva por *F. monophora* não é clara e nenhum portal de entrada pode

ser determinado (HORRÉ; HOOG, 1999), embora a via de inalação seja a mais provável (JAMIL *et al.*, 2012).

Para causar infecção e doença em humanos, *F. monophora*, como outros fungos patogênicos, deve interagir de forma física e bioquímica com estruturas do hospedeiro, utilizando um conjunto de características metabólicas e estruturais próprias definidas como fatores de virulência (*virus*, em latim, veneno) (CASADEVALL; PIROFSKI, 2003). As definições de virulência têm sido ampliadas, antes baseadas no postulado de Koch, atualmente é discutida como um evento relacionado a uma ou mais características do patógeno, desde sua quantidade no momento da infecção até aos genes transcritos e expressos. Entretanto consideram-se também as características do hospedeiro, como imunidade, doença prévia e sexo. E ainda, as interações decorrentes do curso da infecção, que podem resultar na eliminação do patógeno, em doença crônica, ou ainda, em comensalismo, simbiose, cura ou morte (CASADEVALL; PIROFSKI, 2003; CASADEVALL, 2006).

Infecção cerebral por *F. monophora* é uma doença rara, uma vez que apenas oito casos foram relatados na literatura mundial (LUCCASE; CHARDOME; MAGIS; 1954; NOBREGA *et al.*, 2003; SURASH *et al.* 2005; TAKEI *et al.* 2007; RAPARIA *et al.* 2010; KOO *et al.*, 2010; DOYMAZ *et al.*, 2015; VARGHESE *et al.*, 2015). O primeiro caso relatado foi inicialmente atribuído à espécie *Cladosporium bantiana* (LUCCASE; CHARDOME; MAGIS, 1954) e o segundo caso relatado, atribuído à espécie *F. pedrosoi* (NOBREGA *et al.*, 2003), somente em 2004, uma nova análise permitiu a identificação de *F. monophora*. A doença afeta ambos os sexos, ocorrendo principalmente na faixa etária maior com condições predisponentes e carrega uma alta taxa de mortalidade. Os pacientes que sobreviveram passaram por longos períodos de tratamento com diversas drogas como, voriconazol, anfotericina B, flucitosina e itraconazol (TABELA 1).

TABELA 1: CASOS NOTIFICADOS DE INFECÇÃO CEREBRAL CAUSADA POR *F. monophora*.

ESTUDO	PAÍS	IDADE E SEXO	RESULTADO
LUCCASE <i>et al.</i> , 1954	África	10, M	Óbito depois de 5 meses
NOBREGA <i>et al.</i> , 2003	Brasil	28, M	Óbito depois de 8 meses
SURASH <i>et al.</i> 2005	Colômbia	53, M	Êxito no tratamento
TAKEI <i>et al.</i> 2007	EUA	62, F	Êxito no tratamento
RAPARIA <i>et al.</i> 2010	EUA	42, F	Êxito no tratamento
KOO <i>et al.</i> , 2010	EUA	63, F	Êxito no tratamento
DOYMAZ <i>et al.</i> , 2015	Turquia	71, F	Êxito no tratamento
VARGHESE <i>et al.</i> , 2015	Índia	63, M	Óbito

FONTE: Adaptado de VARGHESE *et al.*, 2015.

Mas após a descrição de *F. monophora* (HOOG *et al.*, 2004), esta espécie também emergiu como agente de cromoblastomicose, sendo o agente predominante no sul da China (ZHANG *et al.*, 2008). E recentemente, foi relatado o primeiro caso de cromoblastomicose por *F. monophora* fora de área endêmica, na Europa temperada, onde a espécie foi isolada de paciente com lesão cutânea há mais de 20 anos (PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA *et al.*, 2014). O aumento de casos clínicos relatados associados a esta espécie sinaliza um possível equívoco na identificação dos agentes etiológicos da cromoblastomicose até agora, isso porque *F. pedrosoi* relatado na maioria dos relatórios publicados anteriormente, tem semelhança morfológica significativa com *F. monophora*. Estas duas espécies só podem ser diferenciadas por métodos moleculares (HOOG *et al.*, 2004; PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA *et al.*, 2014).

Fonsecaea monophora é uma espécie com espectro clínico mais variável. Demonstra grande versatilidade e ampla capacidade de adaptação, sendo agente de cromoblastomicose com formação de corpos muriformes e agente

de infecção cerebral primária. E apesar de ser mais frequente em pacientes imunossuprimidos, pode acometer pacientes com imunidade intacta (NAJAFZADEH *et al.* 2009).

3.5 SEQUENCIAMENTO GENÔMICO

A genômica é a área de conhecimento responsável pela identificação e caracterização do material genético de um organismo através do sequenciamento em larga escala (MORAN *et al.*, 2011; MÜLLER *et al.*, 2012). O sequenciamento genômico possibilita identificar e caracterizar genes e proteínas por eles codificadas, permitindo um melhor entendimento dos processos biológicos e relações filogenéticas (NIERMAN *et al.*, 2000).

O primeiro organismo a ter seu genoma completamente elucidado foi a bactéria *Haemophilus influenzae* em 1995 (FLEISCHMANN *et al.*, 1995). Seguido pelo sequenciamento de outras bactérias como *Mycobacterium tuberculosis* (COLE *et al.*, 1998) e *Escherichia coli*, um dos patógenos humanos mais importantes e organismo modelo de estudo (BLATTNER *et al.*, 1997). Dentre os eucariotos, foram sequenciados os genomas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (WODICKA *et al.*, 1997) do *Plasmodium falciparum*, agente etiológico da malária (GARDNER *et al.*, 2002), do fungo *Neurospora crassa* (GALAGAN *et al.*, 2003), o genoma humano (LANDER *et al.*, 2001) entre outros.

Estudos genômicos só foram possíveis com o desenvolvimento de métodos de sequenciamento de DNA. O método de degradação química desenvolvido por Allan Maxam e Walter Gilbert e o método 'dideoxi' apresentado por Sanger e colaboradores, em meados de 1977, representam a primeira geração dos métodos de sequenciamento genômico (MAXAM & GILBERT, 1977; SANGER *et al.*, 1977). Em 1987, foi lançado o ABI 370, o primeiro sequenciador automático baseado no método 'dideoxi' (LLOYD *et al.*, 1986).

Com a introdução de novas técnicas de sequenciamento de DNA, chamadas de sequenciamento de próxima geração, a área sofreu um grande avanço devido a plataformas de processamento mais rápido (SHENDURE; JI,

2008). O sequenciador 454 (Roche) lançado em 2005 inovou com o método de pirosequenciamento (MARGULIES *et al.*, 2005). Outros métodos foram desenvolvidos a partir deste período e os mais expressivos são o método Polony utilizado no sequenciador SOLID (*Applied Biosystems*) (SHENDURE; JI, 2008) e o método de amplificação em ponte utilizado no sequenciador Genome Analyser (Illumina) (LIU *et al.*, 2012).

A tecnologia do sequenciador 454 (Roche) dispensa a necessidade de clonagem, tirando vantagem do método de amplificação de DNA *in vitro*, conhecido como PCR em emulsão. O pirosequenciamento foi inovador, no qual a incorporação de um nucleotídeo pela DNA polimerase libera um pirofosfato, iniciando uma série de reações em cadeia que resultam na produção de luz pela enzima luciferase (MARGULIES *et al.*, 2005). Esta metodologia tem como principais desvantagens o alto custo dos reagentes e a taxa relativamente elevada de erro (WEISS, 2010).

Em 2006, o sistema SOLiD foi disponibilizado e introduziu a tecnologia de sequenciamento de duas bases, baseada na hibridização-ligação, na qual a reação de sequenciamento é catalisada por uma DNA ligase, e não por uma DNA polimerase (MARDIS, 2008; MCKERNAN *et al.*, 2006).

No mesmo ano, a empresa Solexa lançou o *Genome Analyzer* (GA) e em 2007, a companhia foi comprada pela Illumina. Este sequenciador introduziu a tecnologia de sequenciamento por síntese (LIU *et al.*, 2012). Na preparação das bibliotecas, o DNA ligado a adaptadores é desnaturado em fita simples e depositado na placa de sequenciamento. A clonagem dos fragmentos é realizada pela amplificação em ponte gerando grupos de fragmentos clonados que posteriormente são clivados em fita simples, novamente com a ajuda da enzima de linearização. São usados 4 tipos de nucleotídeos (ddATP, ddCTP, ddTTP, ddGTP), que contém diferentes terminadores fluorescentes cliváveis e grupos bloqueadores removíveis que complementam o fragmento, uma base por vez. O sinal é então capturado por uma câmera de alta resolução (FIGURA 3) (WEISS, 2010; LIU *et al.*, 2012).

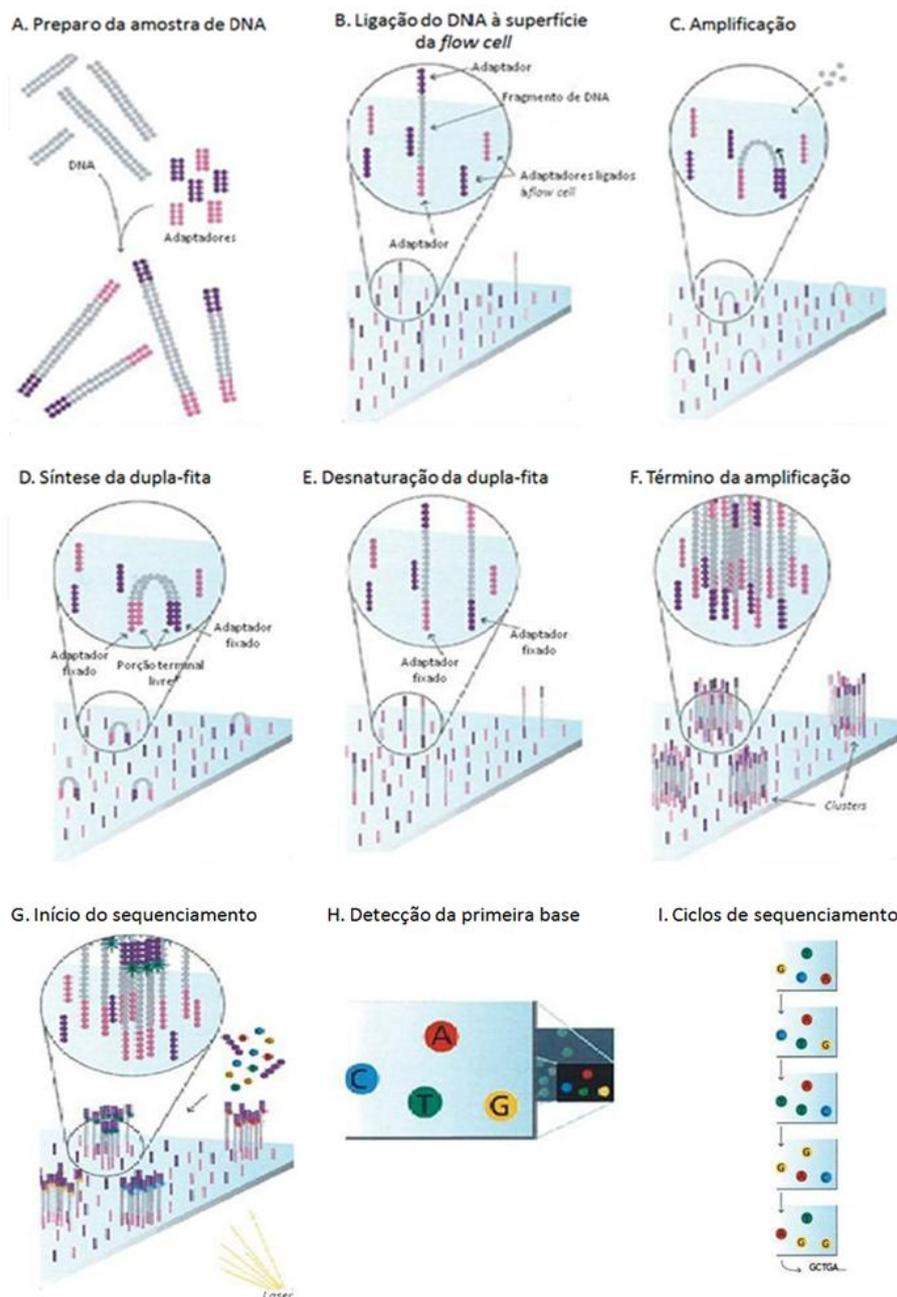


FIGURA 3: SEQUÊNCIA DOS PROCESSOS EXECUTADOS PELO SEQUENCIADOR ILLUMINA MiSEQ. A) Para preparo da amostra, adaptadores são ligados às extremidades do fragmento. B) A ligação do DNA à superfície da *flow cell* ocorre por complementaridade da sequência dos adaptadores. C) Para a amplificação em ponte, nucleotídeos e enzima são adicionados. D) Ocorre a amplificação por síntese da dupla fita. E) A dupla fita de DNA é desnaturada. F) Ao término da amplificação, grupamentos de fragmentos são formados. G) Para iniciar o sequenciamento, são adicionados nucleotídeos modificados, iniciadores e a enzima DNA polimerase. H) O laser é aplicado para detecção da fluorescência emitida pela primeira base. I) A cada ciclo de sequenciamento uma base nitrogenada é detectada, realizando a leitura da sequência completa.

FONTE: Adaptado de https://www.illumina.com/documents/products/techspotlights/techspotlight_sequencing.pdf

Outras metodologias surgiram, aprimorando os princípios anteriores, como a plataforma Ion Proton, que permite leituras de fragmentos maiores, com menor índice de erros e tempo significativamente reduzido. Sua metodologia, semelhante ao pirosequenciamento, é baseada em semicondutores que transformam as informações químicas contidas no DNA diretamente em informações digitais (uma sequência de letras A, T, C e G no computador), diferente das metodologias anteriores que transformavam as informações químicas em sinais luminosos (FIGURA 4) (ROTHBERG *et al.*, 2011).

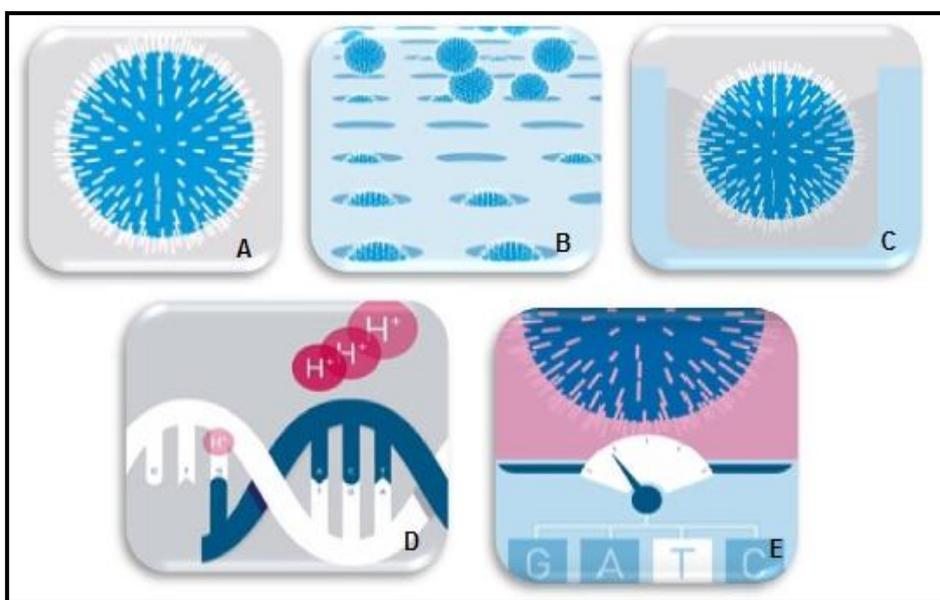


FIGURA 4: REPRESENTAÇÃO RESUMIDA DAS ETAPAS DO SEQUENCIAMENTO EM PLATAFORMA ION PROTON.

A) Os fragmentos de DNA da biblioteca se ligam as sequências complementares dos *beads* (pequenas esferas). B) Os *beads* são distribuídos na placa de sequenciamento. C) A placa de sequenciamento é imersa em líquidos contendo bases nitrogenadas. D) A reação de polimerização libera naturalmente um H⁺, ou seja, um próton, que altera o pH do meio. E) Essa alteração do pH é detectada por um chip condutor e convertida em um sinal elétrico.

FONTE: Adaptado de <https://www.youtube.com/watch?v=WYBzbxlfuKs>

Novos métodos têm sido elaborados trazendo avanços significativos aos estudos na área da genômica. Como o desenvolvimento do *SMRT sequencing* (*Single Molecule Real Time*), processo que aproveita o processo natural de replicação e permite a observação em tempo real da síntese de DNA. Essa

nova abordagem oferecida pela empresa PacBio, apresenta como principais vantagens a geração de fragmentos longos de leitura com alta acurácia e cobertura uniforme (<<http://www.pacb.com/smrt-science/smrt-sequencing/>> Acesso em dez/2015).

Todos estes métodos promoveram um aumento exponencial na quantidade de dados gerados. De 1982 até ao presente, o número de bases no GenBank dobrou aproximadamente a cada 18 meses, resultando em um total de mais de 189 milhões de sequências depositadas (<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/statistics>> Acesso em dez/2015).

3.6 MONTAGEM DE GENOMA

O processo de montagem do genoma consiste em um conjunto de procedimentos que buscam organizar um grande número de sequências de DNA, com o objetivo de representar a molécula que compõe cada cromossomo da espécie estudada (SCHUSTER, 2008). Para isto, o DNA do organismo de estudo é fragmentado em diversos pedaços pequenos e organizado em bibliotecas genômicas. Estes fragmentos são decifrados em segmentos de leitura (*reads*) pelos equipamentos de sequenciamento. Os algoritmos de montagem de genoma alinham os *reads*, buscando regiões onde dois ou mais segmentos de leitura se sobreponham, formando *contigs*. A montagem consiste em organizar os *contigs*, através de sobreposição por semelhança entre os pares de base, com o propósito de formar segmentos maiores de DNA denominados de *scaffolds* ou *supercontigs*, composto por *contigs* ordenados. Eventualmente, pode ocorrer lacunas que serão fechadas com suporte de genoma referência ou reutilização de *reads* ou *contigs* (FIGURA 5) (MILLER *et al.*, 2010).

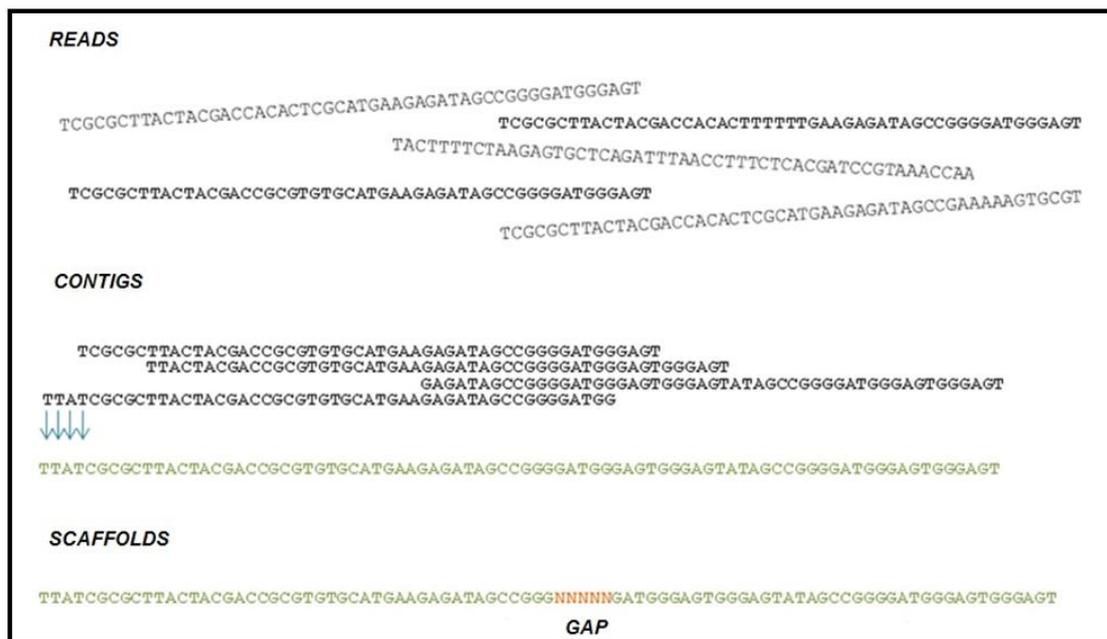


FIGURA 5: REPRESENTAÇÃO DAS ETAPAS DE MONTAGEM DE UMA SEQUÊNCIA DE DNA. As leituras das bases geram sequências denominadas *reads* que se sobrepõem permitindo a definição de regiões maiores conhecidas como *contigs*. Na formação de *scaffolds*, os *contigs* estão montados na ordem correta, mas com lacunas (*gaps*) entre eles, indicados em vermelho na figura. FONTE: Adaptado de CARDOSO, 2011.

A maioria dos equipamentos de sequenciamento é incapaz de sequenciar grandes moléculas de DNA. Devido a isso, a fragmentação química ou física é aplicada para diminuir o tamanho da sequência a ser lida pelo sequenciador (SHENDURE; JI, 2008). Para assegurar que todas as partes do genoma estejam presentes, estes fragmentos de DNA são clonados diversas vezes e constituem as bibliotecas genômicas, que são uma coleção de clones de DNA representando o genoma de um organismo. As bibliotecas de fragmentos podem ser contituídas por fragmentos *single-end*, permitindo ao sequenciador produzir apenas uma leitura parcial do fragmento de DNA molde.

Ou também, podem ser *mate-pair* ou *paired-end*, quando possuem a vantagem de produzir duas leituras para cada fragmento de DNA, uma em cada extremidade com distância conhecida, gerando mais informação e auxiliando o processo de montagem do genoma (FIGURA 6) (BERGLUND *et al.*, 2011). Enquanto a metodologia de sequenciamento *paired-end* permite leituras de fragmentos com tamanho entre 200-500bp, a metodologia *mate-pair*

produz leituras de fragmentos maiores com 200-500bp nas extremidades, um diferencial importante para montagem de genomas (<<http://www.illumina.com/technology/>> Acesso em janeiro/2016).

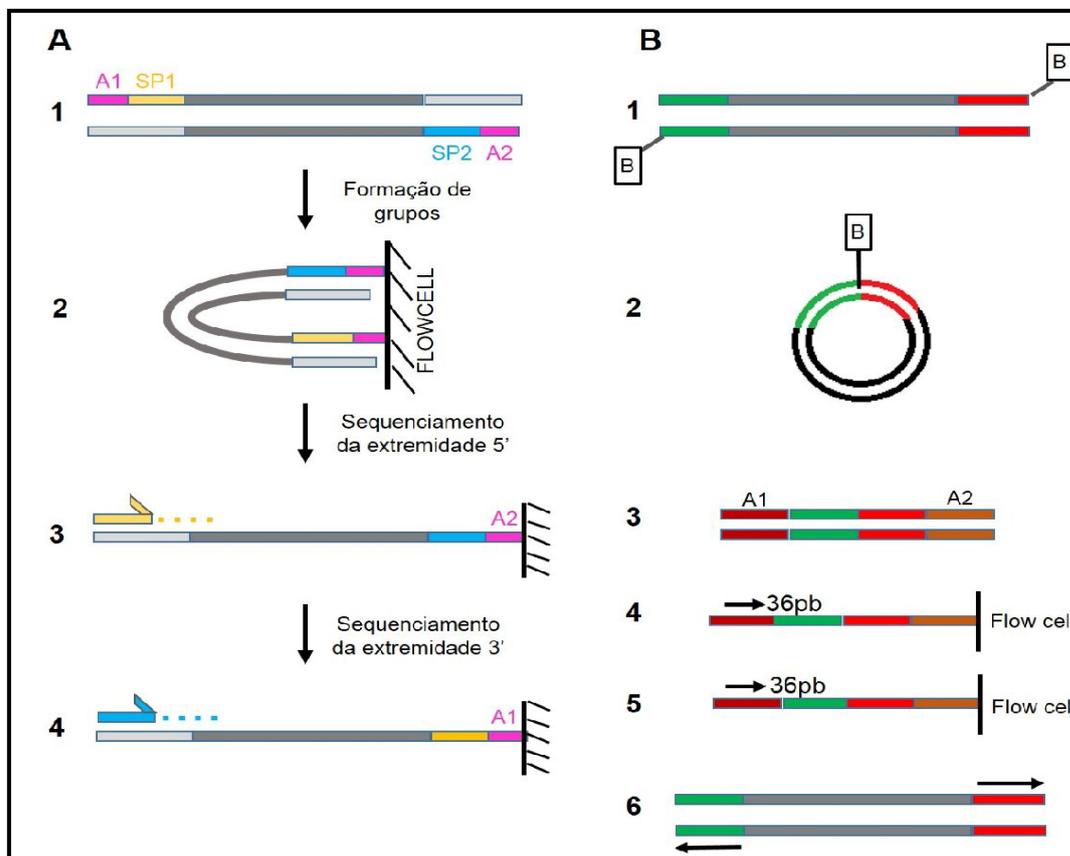


FIGURA 6: CONSTRUÇÃO DAS BIBLIOTECAS DE FRAGMENTO, *PAIRED-END* E *MATE-PAIR* PARA A PLATAFORMA ILLUMINA. A) Preparação para a construção da biblioteca *pair-end* na plataforma Illumina. 1) Os adaptadores se ligam as extremidades do fragmento. 2) Ocorre a formação dos *clusters*. 3) Sequenciamento da extremidade 5' pelo oligonucleotídeo iniciador. 4) Sequenciamento da extremidade 3' pelo oligonucleotídeo iniciador. B) Preparação para a construção da biblioteca *mate-pair* na plataforma Illumina. 1) Os fragmentos são pareados. 2) Os fragmentos são circularizados. 3) O DNA circularizado é fragmentado e adaptadores se ligam as extremidades dos fragmentos, que são hibridizados na *flow cell* e amplificados em ponte. 4 e 5) A cadeia complementar é sintetizada. 6) As seqüências de leitura são dirigidas para o exterior (setas) a partir do fragmento original. FONTE: Adaptado de BERGLUND, 2011.

Para garantir que a representação final do genoma seja confiável torna-se necessário produzir um volume de dados muito maior do que o tamanho do

genoma, fazendo com que o número de bases obtidas atinja no mínimo dez vezes ou mais o tamanho do genoma original, este valor é conhecido como cobertura. Existem projetos de sequenciamento genômico em que a sequência do genoma foi obtida com 10 vezes de cobertura, mas o valor recomendável é 30 ou mais vezes de cobertura (SCHATZ *et al.*, 2010).

O processo de montagem consiste na união dos *reads* gerados pelo sequenciador. Esta união é estabelecida através do alinhamento das sequências e sobreposição das bases de DNA (WEISS, 2014). Para isso, duas abordagens podem ser executadas: *de novo* (*ab initio*) e montagem por referência (MILLER *et al.*, 2010).

A montagem *de novo* é fundamentada na identidade entre os *reads* obtidos no sequenciamento. Esse processo é baseado em um alinhamento, onde o tamanho das sobreposições e a distância entre os *reads* são definidos, gerando *contigs*. Na montagem de referência, as leituras são alinhadas contra um genoma de referência, escolhido por proximidade filogenética em relação ao organismo sequenciado. O alinhamento leva em consideração a identidade entre leituras, permitindo lacunas (*gaps*) e bases não idênticas entre leitura e referência (*mismatches*) (FIGURA 7). Esta metodologia é pouco recomendada por ter grandes probabilidades de inferência errônea (MILLER *et al.*, 2010).

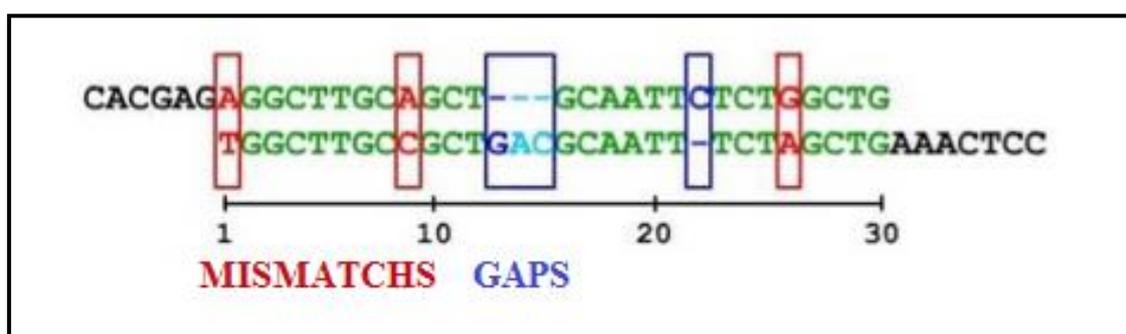


FIGURA 7: ALINHAMENTO DE MONTAGEM REFERÊNCIA COM PRESENÇA DE GAPS E MISMATCHS. *Mismatches* são locais onde a base nitrogenada do alinhamento não é correspondente ao genoma de referência. Enquanto os *gaps* são lacunas onde nenhuma leitura ocorreu.

FONTE: Adaptado de <http://www.atdbio.com/content/15/Mutagenesis-and-DNA-repair>.

Outro ponto importante no processo de montagem é a separação do DNA mitocondrial, que normalmente é sequenciado junto com o DNA cromossomal. As mitocôndrias possuem um DNA circular próprio e apresentam um sistema autônomo de replicação e transcrição. Tem relevância em estudos genéticos por ser constituído por regiões conservadas que carregam informações significativas sobre estrutura populacional, relações filogenéticas e o entendimento de vários aspectos biológicos e evolutivos de uma grande variedade de organismos (AVISE *apud* ARIAS, 2003).

Muitos dos projetos de genomas produzem apenas a representação do genoma, um mapa global contendo a maior parte da sequência do genoma chamado de *draft*. Estes mapas globais são formados por vários *contigs* ordenados chamados *supercontigs* ou *scaffolds* (WEISS, 2014).

3.7 ANOTAÇÃO GENÔMICA

Para agregar informação biológica à montagem de um genoma, realiza-se um processo conhecido como anotação, onde são identificadas regiões codificadoras com base na parte estrutural (códon de início, códon de término) (WEISS, 2010). A anotação de um genoma pode ser dividida em três classes: a anotação de nucleotídeos, onde a localização das sequências genéticas é determinada; a anotação de proteínas para inferir funções aos genes presentes e anotação de processos, onde são estabelecidas vias metabólicas para o organismo estudado (FIGURA 8) (STEIN, 2001). Essas informações são obtidas por meio de dois processos principais: anotações automáticas, buscas realizadas por programas em bancos de dados públicos e anotações manuais, que passam pela curadoria de especialistas.

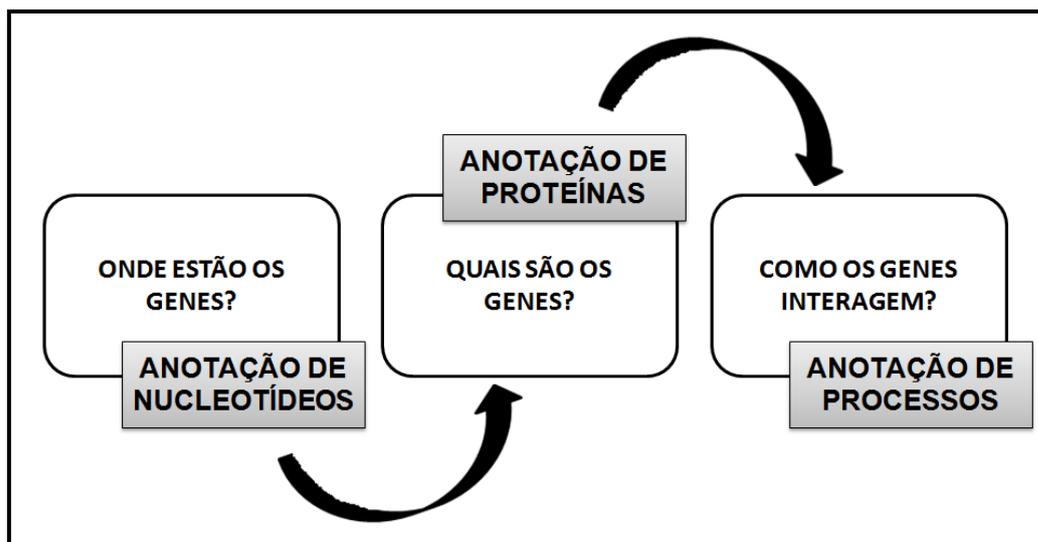


FIGURA 8: TIPOS DE ANOTAÇÃO. A anotação de nucleotídeos determina a localização das sequências e genes; a anotação de proteínas atribui funções aos genes presentes e anotação de processos relaciona vias metabólicas ao organismo estudado. FONTE: Adaptado de STEIN 2001.

As pesquisas em bancos de dados biológicos têm importância fundamental, pois neles se encontram depositadas inúmeras informações que permitem inferir funcionalidade, similaridade e realizar análise genômica comparativa. Essa comparação de proteínas entre espécies é muito rica em se tratando de anotação funcional (LIEBERMAN, 2004). Analisando a similaridade entre as sequências é possível inferir função a aproximadamente 60-70% das proteínas em genomas mais elucidados (CHOI *et al.*, 2011; QIAO *et al.*, 2013). As demais proteínas, com ou sem homólogos, de função desconhecida são denominadas hipotéticas ou hipotéticas conservadas (KOONIN *et al.*, 2002).

Proteínas hipotéticas são definidas como proteínas identificadas em análises computacionais a partir de sequências de ácidos nucléicos; sendo assim, tem sua existência comprovada, mas não existe evidência experimental da sua expressão. Enquanto a proteína hipotética conservada descreve uma fração de genes que são homólogos a genes encontrados em outros organismos, mas que ainda não foram funcionalmente caracterizados e descritos no nível químico da proteína (KOONIN *et al.*, 2005).

Informações disponíveis nos bancos de dados *NCBI*, *Broad Institute* e *Fungal Genomes* evidenciam que mais de 200 genomas de fungos estão

completos ou parcialmente sequenciados e grande parte dos genes anotados (dados obtidos em dezembro de 2015). O estudo de genomas sequenciados de fungos patógenos tem provado ser um excelente recurso para explorar semelhanças e diferenças na forma como essas espécies interagem com seus hospedeiros (MORAN *et al.*, 2011). Como os *drafts* de *Sporothrix schenckii*, agente etiológico da esporotricose (CUOMO *et al.*, 2014), *Cladophialophora immunda*, uma levedura negra patógena humana (STERFLINGER *et al.*, 2006) e *Paracoccidioides brasiliensis*, agente causal da paracoccidioidomicose (FELIPE *et al.*, 2005), elucidados visando auxiliar no tratamento das doenças.

3.8 CARACTERIZAÇÃO CARIOTÍPICA EM FUNGOS

A maior parte da informação genética dos eucariotos encontra-se no conjunto de cromossomos, denominado cariótipo. O estudo deste material é fundamental para a compreensão da organização genômica de um organismo (TSUCHIYA; TAGA, 2001). A forma mais comum de caracterizar os cromossomos é através da cariotipagem (GUERRA; SOUZA, 2002), metodologia que permite a análise de número e tamanho dos cromossomos, determinação do tamanho do genoma, caracterização dos cromossomos e detecção de possíveis polimorfismos genéticos. Gerando dados relevantes para estudos evolutivos, de biologia celular, melhoramento genético, sistemática e taxonomia (LOUREIRO, 2007).

Barbara McClintock foi pioneira no estudo do cariótipo de fungos ao observar por microscopia e uso de vários corantes de DNA, os cromossomos do fungo *Neurospora crassa* (McCLINTOCK, 1945). Corantes também foram utilizados na observação dos cromossomos de outros fungos ascomicetos como *Tuber aestivum* (POMA *et al.*, 1998) e *Erysiphe graminis* (BORBYE *et al.*, 1992). Contudo, os autores evidenciaram a baixa nitidez das observações e a dificuldade em apontar um número definitivo de cromossomos.

Para ultrapassar estas dificuldades, ocorreu o desenvolvimento da técnica de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE – *Pulsed Field Gel Electrophoresis*) que permitiu determinar o cariótipo de organismos que não puderam ser elucidados através de técnicas citológicas. Schwartz e

colaboradores desenvolveram um aparelho com alterações periódicas de campo elétrico, onde a separação de moléculas de DNA de grandes dimensões está relacionada com o tempo que essas moléculas necessitam para se reorientarem no gel. Essa técnica foi desenvolvida, em 1983, com o objetivo de separar os cromossomos de *Saccharomyces cerevisiae*, com tamanhos moleculares entre 200-2200 Kb (SCHWARTZ & CANTOR, 1984).

A técnica de PFGE constituiu um avanço na cariotipagem de fungos filamentosos e leveduras, já que pode ser aplicada a várias espécies independentemente da fase sexual, permitindo observar os cromossomos em gel e algumas características. As limitações desta técnica estão relacionadas com as bandas obtidas, uma vez que podem não corresponder aos cromossomos intactos. Além desta limitação, a técnica de PFGE não revela todas as características morfológicas e estrutura dos cromossomos (WIELOCH, 2006). Desde o início dos anos 80, cariótipos de fungos vêm sendo esclarecidos por meio da técnica de eletroforese em gel de campo pulsado, sendo a primeira, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (KLOTZ *apud* MAGALHÃES, 2005). Espécies de importância clínica também tiveram o cariótipo estudado, como *Candida albicans* e *Candida glabrata*, agentes patógenos humanos (ASAKURA *et al.*, 1991), *Cochliobolus sativus*, patógeno de planta (ZHONG *et al.*, 2002) ou mesmo, espécies com aplicações biotecnológicas como *Metarhizium anisopliae* (KAVA-CORDEIRO *et al.*, 2005). Consagrando a técnica como padrão ouro para separação de moléculas de DNA com relação ao tamanho.

A metodologia de observação de cromossomos de fungos sofreu avanço com a introdução do método de ruptura dos tubos germinativos (GTBM – *Germ Tube Burst Method*), que ao espalhar os cromossomos nas lâminas de vidro permite sua contagem e caracterização morfológica (SHIRANE *et al.*, 1988). As limitações desta técnica estão relacionadas com a dificuldade na determinação do tamanho preciso e a necessidade de otimização da amostra para maximizar o número de células em metáfase (TAGA *et al.*, 2007).

O uso combinado das técnicas de GTBM e PFGE permite contornar as limitações de cada uma. Os resultados de ambas devem ser analisados e comparados, uma vez que a técnica de GTBM possibilita distinguir cromossomos com tamanho idêntico e PFGE permite estimar o tamanho do

genoma. Estas duas técnicas são complementares e fornecem informações essenciais para a cariotipagem de uma espécie (TAGA *et al.*, 2007).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LINHAGEM UTILIZADA

Fungo da espécie *F. monophora* foi depositado pela primeira vez no ano de 1937 no Centro de Biodiversidade Fúngica (CBS), Holanda por M. Moore & F. P. Almeida. No entanto, esta espécie foi descrita somente em 2004, por Hoog, G. S.; Vicente, V. A. & D. Attili. Esse isolado, denominado CBS 269.37 é considerado referência da espécie e foi utilizado em todas as metodologias descritas neste trabalho.

4.2 SEQUENCIAMENTO GENÔMICO E MONTAGEM

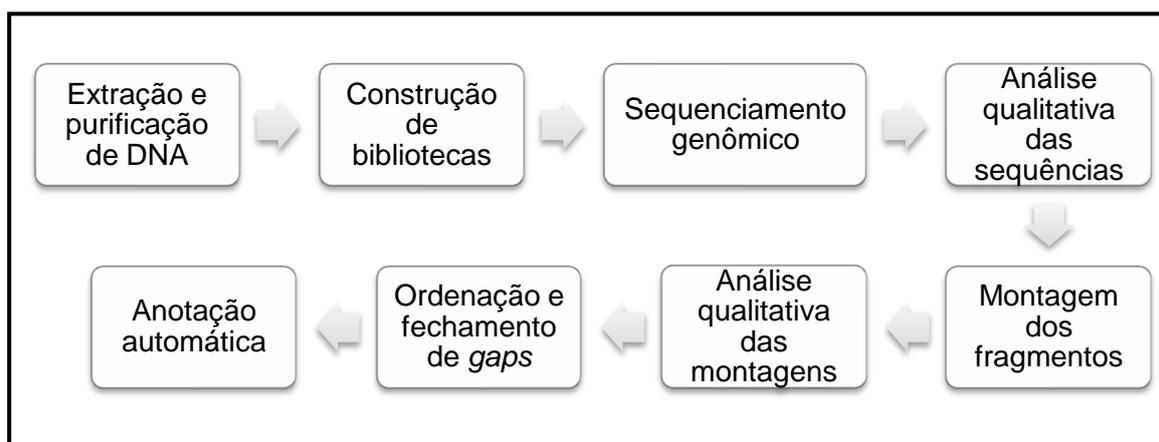


FIGURA 9: FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE OBTENÇÃO DA MONTAGEM PARCIAL DE GENOMA E ANOTAÇÃO AUTOMÁTICA DO GENOMA DE *F. monophora*.

FONTE: O AUTOR, 2015.

4.2.1 Extração e Purificação de DNA

A metodologia de extração utilizada foi estabelecida por Vicente e colaboradores (2008). Aproximadamente 1cm² de micélio, das linhagens de leveduras negras cultivadas em Ágar Sabouraud, foram transferidas para tubos

plásticos de volume 1,5mL contendo tampão CTAB e uma mistura de sílica em pó (sílica gel/celite 2:1). O material foi triturado, incubado em banho-maria a 65°C por 10 minutos e foi adicionado CIA seguido de centrifugação. Foram obtidas duas fases distintas, a fase aquosa foi coletada e transferida para tubos plásticos esterilizados, acrescentado etanol para a precipitação do DNA. Após a precipitação do DNA, foi procedida a lavagem com álcool 70% gelado. O DNA obtido foi quantificado por espectrofotometria (260nm) e sua integridade verificada em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio.

Para purificação do DNA, o kit Microbial DNA UltraClean foi usado conforme instruções recomendadas pelo fabricante. A purificação inicia adicionando 100µL da solução denominada MD2 ao tubo plástico contendo DNA, agita por 5 minutos em agitador e deixa a amostra repousar por 10 minutos em banho gelo. Após centrifugação de 2 minutos, o sobrenadante foi transferido para tubo plástico estéril com filtro, onde foi adicionado 900µL da solução MD3. Após nova centrifugação, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 300µL da solução MD4 ao tubo plástico com filtro, após centrifugação o sobrenadante foi descartado. O DNA aderido ao filtro, então transfere-se o filtro para um tubo plástico estéril e adiciona-se 50µL de água ultrapura autoclavada. Após centrifugação o DNA é removido do filtro pela água.

4.2.2 Construção das Bibliotecas Genômicas nas plataformas Illumina MiSeq e Ion Proton

A biblioteca genômica da plataforma Illumina foi contruída utilizando o kit Nextera XL conforme instruções do fabricante. Em um poço de placa contendo 96 poços, foi adicionado 20µL de DNA a 2,5ng/mL, 25µL de tampão TD e 25µL de tampão TDE1 (solução enzimática com transposons). Após homogeneização das soluções com pipeta, a placa foi selada com película adesiva Microseal e centrifugada a 280 g por 1 minuto. A placa foi colocada em termociclador, onde ocorre a fragmentação do DNA por reação enzimática.

Após a fragmentação do DNA é necessário realizar a remoção dos transposons com kit de purificação Zymo para que as próximas etapas não sejam prejudicadas pela presença de enzimas. Para isto, em nova placa, adicionou-se 180 μ L de tampão de ligação Zymo e 50 μ L da amostra com DNA fragmentado. O conteúdo foi homogeneizado e centrifugado a 1300g por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e a placa, lavada com solução tampão de lavagem. Adicionou-se 25 μ L de RSB e a placa foi incubada por 2 minutos em temperatura ambiente. Após este período a placa seguiu para centrifugação a 1.300g por 2 minutos.

Para realizar a etapa de amplificação dos fragmentos por reação em cadeia da polimerase (PCR), em nova placa foi adicionado 20 μ L do DNA fragmentado e purificado, 15 μ L de NPM e 5 μ L de PPC. A homogeneização do conteúdo foi feita com pipeta e a placa foi selada com película adesiva Microseal. Após centrifugação a 280g por 1 minuto, a placa seguiu para termociclador onde ocorreu a PCR.

O produto da PCR segue para etapa de purificação com pequenas esferas da AMPure XP, também conhecidas como *beads*, onde ocorre uma seleção de fragmentos pelo tamanho e os menores são removidos. Para isto, 30 μ L da solução *Agencourt AMPure XP Reagent* foi adicionado a 50 μ L de produto da PCR e incubado por 5 minutos em temperatura ambiente. Então a placa foi colocada sobre suporte magnético por 2 minutos. Após este período foram realizadas duas lavagens subsequentes com etanol 80% e já removida do suporte magnético foi adicionado 32,5 μ L de RBS a amostra. Após 2 minutos, uma alíquota de 30 μ L foi coletada para seguir para a reação de sequenciamento.

A biblioteca genômica da plataforma Ion Proton foi construída utilizando o kit *IonXpress gDNA Fragment Library Preparation* conforme instruções do fabricante. Para a fragmentação do DNA, foram adicionados 100 ng de DNA e 50 μ L de TE em tubo plástico, posteriormente submetido a banho sônico em aparelho sonicador Covaris S2. Para purificação do DNA fragmentado, adicionou-se 180 μ L da solução *Agencourt AMPure XP Reagent* contendo *beads* e a amostra foi incubada por 5 minutos em temperatura ambiente. Após este período, o microtubo foi colocado sobre suporte magnético por 3 minutos

para sedimentar e o sobrenadante removido. Com o microtubo ainda sobre o suporte magnético foram realizadas 3 lavagens com etanol 70%.

O tubo plástico foi removido do suporte magnético e adicionou-se 25 μ L de TE. Após homogeneização da amostra, o DNA eluído foi transferido para tubo plástico de 1,5mL. Um mix de soluções foi preparado e submetido à corrida em termociclador com as seguintes condições: 25°C por 15 minutos e 72°C por 5 minutos.

O produto da reação foi transferido para novo tubo plástico e a etapa anterior foi repetida. Foi adicionada novamente a solução *Agencourt AMPure XP Reagent*, o tubo plástico foi colocado sobre suporte magnético por 3 minutos para sedimentar e o sobrenadante removido. Com o tubo ainda sobre o suporte magnético foram realizadas 3 lavagens com etanol 70%. O tubo plástico foi removido do suporte magnético e adicionou-se 20 μ L de TE. Após homogeneização da amostra, o DNA eluído foi transferido para microtubo de 1,5mL.

Para purificação do DNA eluído e remoção dos *beads* residuais, o tubo foi colocado em suporte magnético por 2 minutos e o sobrenadante transferido para novo microtubo estéril.

4.2.3 Sequenciamento Genômico e Análise Qualitativa das Sequências

O sequenciamento genômico de *F. monophora* foi realizado no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, utilizando no equipamento de sequenciamento Illumina (GA tecnologia IIx) plataforma MiSeq e Ion Proton (Ion Torrent Systems, Inc., Guilford, CT).

Para análise qualitativa das sequências obtidas pelo sequenciamento genômico foi usado o software FastQC aplicando os parâmetros *default* (BIOINFORMATICS, 2015).

4.2.4 Montagens e Análise Qualitativa Das Montagens

Para a realização da montagem do genoma da espécie *F. monophora* foram utilizados os softwares Celera e Spades. O pipeline do montador Celera (MYERS *et al.*, 2000) é composto por diversos estágios buscando uma fidelidade absoluta, onde busca-se descartar repetições e assumir regiões verdadeiras e conservadas. Seu algoritmo é baseado na construção de um gráfico de sobreposição, onde cada leitura é um nó no gráfico, e bordas conectam as sobreposições. Esse montador também tenta corrigir erros de sequenciamento usando a sobreposição para confirmar as leituras. O software Spades (BANKEVICH *et al.*, 2012), difere das abordagens dos montadores existentes, pois apesar de ser baseado no gráfico de Bruijn, dispõe de novas soluções algorítmicas em vários estágios de seu pipeline. Seu algoritmo foi desenvolvido para decifrar dados provenientes dos sequenciadores Illumina, Ion Torrent e PacBio.

Para análise dos dados da montagem, como N50, número de *contigs*, conteúdo de GC%, foi usado o software QUAST (*Quality Assessment Tool for Genome Assemblies*) (GUREVICH, 2013). A poda das sequências com tamanho inferior a 1.000pb foi feita no editor NotePad++.

4.2.5 Ordenação de *Contigs* e Fechamento de *Gaps*

A ordenação dos *contigs* obtidos da montagem selecionada foi realizada no software MatLab usando função cedida por RAITTZ, R.T. (comunicação pessoal) e como genoma de referência *Fonsecaea pedrosoi* CBS 271.37 disponível em http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/Black_Yeasts/GenomesIndex.html.

O programa Fgap é uma ferramenta que possibilita a redução do número de *gaps* dentro de uma montagem através da fusão de diferentes versões de montagens ou através da incorporação de novas sequências (PIRO *et al.*, 2014). O programa analisa a região de *gap* e as pontas de *contigs* e indicar a melhor sequência para fechá-los.

4.2.6 Anotação Automática e Análise Genômica Parcial

A identificação das *ORFs* (*Open Reading Frame*) foi realizada com o software GeneMark-ES. Para anotação de proteínas, os softwares InterPro (MITCHELL *et al.*, 2015) e ARTEMIS (CARVER *et al.*, 2012) foram usados com consulta a diversos bancos de dados públicos como *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), *Black Yeast Database - Broad Institute* e *Gene Ontology* (GO). A análise das proteínas e implicação em vias metabólicas foi realizada com base nos bancos dados como o *Kyoto Encyclopedia of Genes e Genomes* (KEGG), *Gene Ontology* (GO) e outros bancos que permitem inferir funções as proteínas e correlacioná-las dentro de uma via metabólica. Análises manuais também foram realizadas baseadas na literatura atual.

4.3 CARACATERIZAÇÃO CARIOTÍPICA

4.3.1 Cariotipagem Citológica

Na cariotipagem citológica, para a visualização dos cromossomos é necessária a interrupção da divisão celular na fase de metáfase do ciclo celular, aumentando a probabilidade da observação de cromossomos individualizados. Para esta finalidade, foi realizado teste de agente bloqueador do ciclo celular com tiabendazol (50mg/mL) (TSUCHIYA; TAGA, 2001; TAGA *et al.*, 2007). Este composto interfere no transporte de aminoácidos durante a síntese protéica e na cadeia respiratória mitocondrial, evitando a redução do citocromo C (ALLEN & GOTTLIEB *apud* OPINIÃO, 2012). Para este fim, uma solução de esporos com concentração 10^6 (esporos/mL) em meio líquido Sabouraud foi incubada em estufa a 28°C por 18 horas, para germinação. Após este período, a solução foi filtrada em papel filtro com auxílio de bomba a vácuo. Os esporos obtidos foram ressuspensos em 150µL de tiabendazol

(50mg/ml) e após períodos de incubação, foram estriados em placas de petri com ágar Sabouraud, incubados a 28°C para posterior avaliação de presença ou ausência de crescimento do fungo (TAGA *et al.*, 2007). A ação do tiabendazol foi avaliada em 0, 1, 2, 3, 24 e 48 horas de exposição ao agente bloqueador. Foram realizadas três repetições e como controle, esporos germinados foram ressuspendidos em 150 µL de solução salina 0,85%. A cariotipagem citológica baseada na técnica de Eusebio-Cope e colaboradores (2009), inicia com o preparo 100µL de solução de esporos com concentração 10^6 (esporos/mL) em meio sabouraud líquido. Uma gota desta solução é dispensada em lâmina microscópica em câmara úmida *overnight*. Após este período, adiciona-se 200µL de tiabendazol (50mg/ml) por 3 horas. Após incubação, as lâminas são brevemente mergulhadas em água destilada, limpas com papel filtro e imersas em fixador (metanol+ácido acético glacial 9:1 (v/v) por 15-30 minutos. Finalmente, as lâminas são secas à chama e armazenadas em condição seca até sua utilização. Após este preparo, as lâminas são coradas com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), um corante fluorescente que liga-se fortemente em regiões ricas em adenina e timina e pode ser utilizado para corar células vivas ou fixadas (TAGA *et al.*, 2007).

4.3.2 Cariotipagem Eletroforética

O primeiro passo na caracterização eletroforética de *F. monophora*, consistiu em otimizar a obtenção de protoplastos a partir da solução de esporos germinados. Em seguida, os protoplastos foram imobilizados em plugs de agarose para serem submetidos à eletroforese em gel de campo pulsado.

Para obtenção de protoplastos de fungos melanizados é necessário que os esporos estejam germinando, pois assim, apresentam a camada de melanina com espessura menor. Para otimizar a germinação dos esporos, soluções de esporos com concentração 10^6 (esporos/mL) em 150mL de meio líquido Sabouraud, foram incubadas a 28°C em shaker a 280 g. Após períodos de incubação, alíquotas da solução eram dispensadas em lâminas para observação em microscópio. Os esporos foram observados a cada hora, de 6 a 24 horas, em três repetições. (KAVA-CORDEIRO *et al.*, 2005).

Também foram avaliados como estabilizadores osmóticos as soluções KCl (0,7M), MgSO₄ (0,4M) e NaH₂PO₄ (0,5M). Ambos combinados com a enzima *Lysing Enzymes* (Sigma). A solução de esporos com concentração 10⁶ (esporos/mL) em 150mL de meio líquido Sabouraud e incubados a 28°C de 18 horas em shaker a 280 g. A coleta do material foi feita em papel filtro com auxílio de bomba a vácuo. Os esporos obtidos foram ressuspensos em solução enzimática com *Lysing Enzymes* from *Trichoderma harzianum* L2265 (Sigma), utilizando-se em média 100mg de micélio por mL de solução enzimática para cada tratamento. Seguido de incubação em shaker a 28°C a 280 g por 3 horas para protoplastizar (TAGA *et al.*, 2007). A produção de protoplastos foi avaliada por contagem em câmara de Neubauer a partir de alíquotas retiradas em intervalos de uma hora. Foram realizadas 3 repetições para cada estabilizador osmótico.

Após a otimização da obtenção de protoplasto, foi realizado o procedimento de montagem de plugs de agarose. A solução contendo os protoplastos foi filtrada em seringa com lã de vidro e centrifugada por 5 minutos. Os protoplastos foram ressuspensos em solução GMB até obter a concentração 2x10⁹ (protoplastos/mL) e aquecidos em banho-maria a 42°C (TAGA *et al.*, 2007). A solução com protoplastos foi homogeneizada lentamente com 1mL de agarose Chromosomal Grade (Sigma) 0,6%, dispensada em moldes de *plugs* para o aparelho CHEF-DRII Sistema (Bio-Rad) e solidificaram em banho gelo por 10 minutos. Os *plugs* foram incubados em solução de lise durante 48 h a 50°C. Após este período a solução de lise foi substituída por EDTA 50 mM e n-lauroylsarcosinato de sódio 1% por 30 minutos a 50°C. Os *plugs* foram armazenados em EDTA 50 mM a 4°C até à sua utilização (KAVA-CORDEIRO *et al.*, 2005).

A eletroforese de campo pulsado é realizada em aparelho CHEF-DRII Sistema (Bio-Rad). Para a corrida eletroforética utiliza-se o gel de agarose Chromosomal Grade (Sigma) 0,6% e tampão TBE 0,5x. Os *plugs* pré-moldados contendo protoplastos de *F. monophora*, são inseridos nas cavidades do gel e selados com a mesma agarose usada para preparar o gel da eletroforese. As condições aplicadas nas corridas são (intervalos de pulso e durações): 50 minutos, 45 minutos e 37 minutos, durante 73 horas, 18 horas e 73 horas, respectivamente, com uma voltagem de 46 volts. Para visualização dos

resultados, o gel de agarose é corado em brometo de etídio (0,5 mg / mL) durante 20 minutos, descorado em água destilada durante 20 minutos e fotografados sob luz ultravioleta (KAVA-CORDEIRO *et al.*, 2005). Como marcador a espécie *Aspergillus nidulans* é aplicada por ter o cariótipo eletroforético elucidado com tamanhos conhecidos (BRODY & CARBON, 1989).

5 RESULTADOS

5.1 SEQUENCIAMENTO GENÔMICO E MONTAGEM

O sequenciamento genômico de *F. monophora* foi realizado utilizando os equipamentos sequenciamento Illumina (GA tecnologia Ilx) plataforma MiSeq e Ion Proton (Ion Torrent Systems, Inc., Guilford, CT). Foram realizados quatro sequenciamentos distintos, agrupados em 4 conjuntos de dados. Todos os conjuntos foram avaliados quantitativamente e qualitativamente com o software FastQc e tiveram rendimento satisfatório, sendo mantidos nas estratégias de montagens (ANEXO II). O primeiro conjunto de dados denominado S10 foi gerado em outubro/2014 e gerou 4.422.768 *reads* divididos em duas fitas denominadas R1 e R2. No segundo sequenciamento, tivemos rendimento inferior com 1.890.264 *reads*. O montador Spades demonstrou melhor desempenho nas montagens e por isso, foi mantido como principal montador. Para a geração do conjunto de dados S4, foi realizada nova extração e purificação de DNA e construção de nova biblioteca genômica, buscando melhorar os dados de montagem (TABELA 2).

TABELA 2: QUATRO CONJUNTOS DE DADOS GERADOS NOS SEQUENCIAMENTOS GENÔMICOS REALIZADOS DE *F. monophora*.

DATA	PLATAFORMA	CONJUNTO DE DADOS	READS OBTIDOS
Outubro/2014	Illumina MiSeq	S10	2.211.384 2.211.384
Março/2015	Illumina MiSeq	S11	945.132 945.132
Abril/ 2015	Illumina MiSeq	S4	1.617.744 1.617.744
Julho/2015	Ion Proton	Ion02	19.396.784
		TOTAL	28.945.304

Como não houve melhora significativa nas montagens, foi adotada a estratégia de gerar dados em uma nova plataforma de sequenciamento, o Ion Proton. No mês de julho/2015, o conjunto de dados denominado Ion2 proporcionou novas montagens com resultados satisfatórios (TABELA 3).

TABELA 3: MONTAGENS REALIZADAS COM OS QUATRO CONJUNTOS DE DADOS OBTIDOS DOS SEQUENCIAMENTOS GENÔMICOS DE *F. monophora*.

MONTAGEM/ MONTADOR	CONJUNTOS DE DADOS UTILIZADOS	CONTIGS >1000 PB	N50	%GC	TAMANHO DO GENOMA
1º Celera*	S10	1540	37391	52	34,7 Mb
2º Spades**	S10	1258	49533	52.33	34,33 Mb
3º Celera	S10 e S11	1349	55723	52.19	34,31 Mb
4º Spades	S10 e S11	1019	63402	52.24	34,18 Mb
5º Spades	S11	3143	792	49.14	34,98 Mb
6º Spades	S10, S11, S4	974	69812	52.22	34,56 Mb
7º Spades	S4	1719	36538	52.33	36,84 Mb
8º Spades	S4 e S10	1062	63018	52.28	34,42 Mb
9º Spades	S4 e S11	7508	6295	52.56	36,34 Mb
10º Spades	Ion2	829	88742	52.22	34,22 Mb
11º Spades	Ion2 e S10	450	224916	52.22	34,33 Mb
12º Spades	Ion2 e S11	602	107509	52.22	34,20 Mb
13º Spades	Ion2 e S4	568	234967	52.54	34,73 Mb
14º Spades	Ion2, S10, S11	328	268916	52.22	34,21 Mb
15º Spades	Ion 2, S10, S4	408	270432	52.2	34,53 Mb
16º Spades	Ion2, S11, S4	522	210674	52.48	34,58 Mb
17º Spades	Ion,S10,S11,S4	331	285692	52.2	34,41 Mb

LEGENDA: PB: pares de base, Mb: MegaByte. *Celera e **Spades:Softwares de montagem.

Análises quantitativas e qualitativas da 14^o e 17^o montagens com o software QUAST foram realizadas para selecionar a melhor montagem. A 14^o montagem apresentou 374 *contigs* sendo destes 328 *supercontigs* com mediana (N50) de 268.916 pb, um teor de G + C de 52% e 34,21Mb de tamanho. Enquanto, a 17^o montagem apresentou 450 *contigs* sendo destes 331 *supercontigs* com mediana (N50) de 285.692 pb, um teor de G + C de 52% e 34,41 Mb de tamanho. Apesar do N50 da 17^o montagem apresentar valor inferindo maior qualidade, selecionamos a 14^o montagem para as próximas etapas do trabalho por apresentar um número menor de *contigs* (TABELA 4).

A montagem selecionada apresentou cobertura de 90x e foi ordenada usando como genoma referência a espécie *Fonsecaea pedrosoi* CBS 271.37, para posterior submissão ao software Fgap. Os contigs da 14^o montagem com tamanho inferior a 1.000pb foram retirados da montagem para serem utilizados no fechamento dos *gaps* e reinseridos na montagem. Assim, foram fechados 27 *gaps*, curados manualmente obtendo assim, uma nova montagem com 301 *scaffolds*.

TABELA 4: DADOS DA MONTAGEM DE MAIOR QUALIDADE OBTIDA DO GENOMA DE *F. monophora*.

DADOS	<i>F. monophora</i>
<i>Contigs</i>	374
<i>Scaffolds</i>	328
Tamanho	34,21 Mb
Cobertura	90x
N50	285.692 pb
GC%	52%
<i>Scaffolds</i> após Fgap	301

5.1.1 Anotação Automática e Análise Genômica Parcial

A identificação das ORFs (*Open Reading Frame*) foi realizada com o software GeneMark-ES, que evidenciou a presença de genes, sendo 12.026

proteínas e além destas, 32 moléculas de RNA transportador e 4 de RNA ribossômico.

A anotação no programa InterPro possibilitou identificar e inferir função a diversas proteínas. Conforme demonstrado na figura 10, dentre os genes identificados até o momento nesta análise parcial, destacam-se aqueles que decodificam proteínas relacionadas ao processo de respiração, proteínas estruturais e proteínas envolvidas no processo de degradação e nos metabolismos de carboidratos, lipídeos, zinco e vitaminas. Também se destacam proteínas relacionadas a mecanismos de tolerância e resistência como estresse oxidativo e choque térmico.

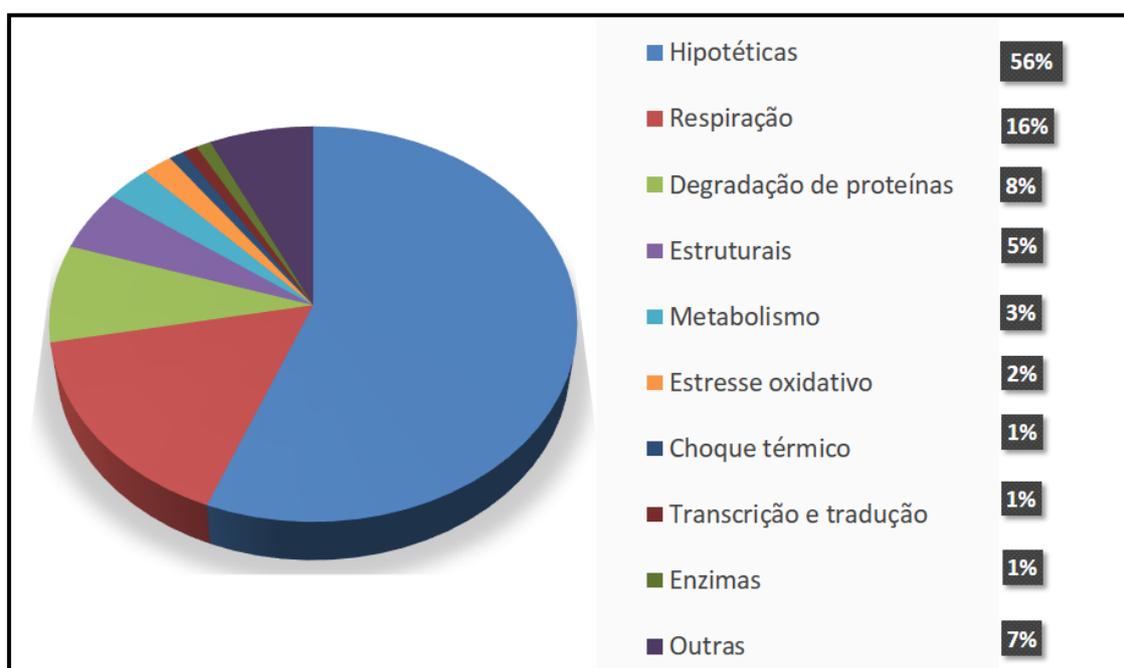


FIGURA 10: CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DAS PROTEÍNAS. As proteínas anotadas foram separadas conforme a função atribuída.

FONTE: O AUTOR (2015).

A seguir serão apresentadas tabelas contendo os dados das sequências relacionadas as principais categorias funcionais de genes de *F. monophora* identificados neste trabalho.

Foram identificados genes de *F. monophora* que codificam proteínas similares à proteínas envolvidas na respiração celular, mais especificamente proteínas que constituem a cadeia transportadora de elétrons (ETC) (TABELA

5 e FIGURA 11). A proteína NADH-ubiquinona oxidorreductase corresponde ao complexo I na cadeia transportadora de elétrons, enquanto a citocromo c oxidase constituída pelas subunidades transmembrânicas I, II e III é definida como o complexo IV da ETC.

TABELA 5: SEQUÊNCIAS DE DNA ANOTADAS COMO PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA RESPIRAÇÃO CELULAR PELA ANÁLISE DE SIMILARIDADE DE SEQUÊNCIA GENÔMICA.

IDENTIFICAÇÃO (POSIÇÃO*)	ANOTAÇÃO	LOCALIZAÇÃO
ID322 (906061)	NADH:ubiquinona	<i>Contig 1; 2</i>
ID703 (860723)	oxidoreductase	
ID59 (162225)	Succinato semialdeído	<i>Contig 1 ; 5</i>
ID1636 (739803)	desidrogenase (NADP+)	
ID679 (810763)	Fumarato	<i>Contig 2; 4</i>
ID 1088 (73367)		
ID41 (133114)	Citocromo c oxidase	<i>Contig 1; 2</i>
ID499 (306910)		
ID211(600491)	Proteína transportadora	<i>Contig 1; 2</i>
ID547 (424285)	mitocondrial	

*Relacionada à sequência em pares de bases.

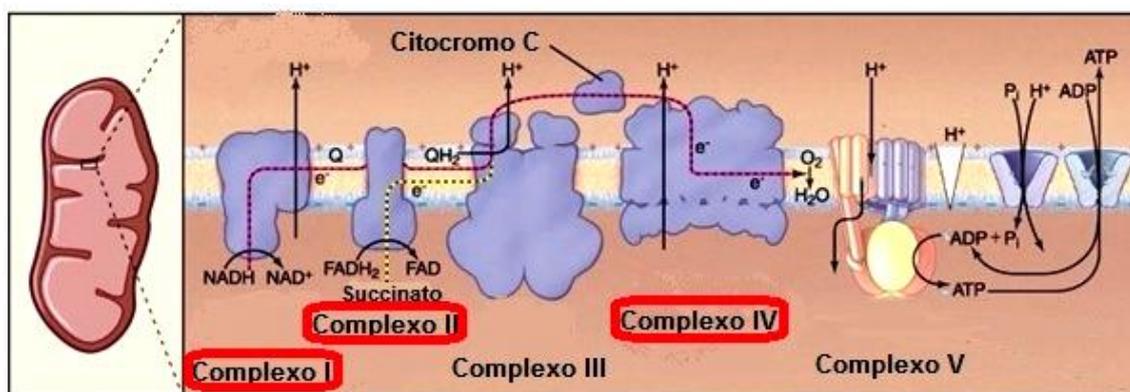


FIGURA 11: ESQUEMA DA CADEIA TRANSPORTADORA DE ELÉTRONS NA MATRIZ MITOCONDRIAL. Os círculos vermelhos representam os complexos proteicos que foram identificados em *F. monophora*.

FONTE: Adaptado de <www.acervosaude.com.br/images/004.png>.

Foram identificados genes de *F. monophora* que codificam proteínas que apresentaram similaridade com proteínas transportadoras, como transportadores de zinco, ferro, manganês e açúcares (TABELA 6).

TABELA 6: SEQUÊNCIAS DE DNA ANOTADAS COMO PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS PELA ANÁLISE DE SIMILARIDADE DE SEQUÊNCIA GENÔMICA.

IDENTIFICAÇÃO (POSIÇÃO*)	ANOTAÇÃO	LOCALIZAÇÃO
ID123 (346408)	MFS transportadora, família DHA1	<i>Contig 1</i>
ID1017 (750857)	Maior Superfamília Facilitadora	<i>Contig 3</i>
ID582 (528222)	Proteína transportadora de zinco	<i>Contig 2</i>
ID307(870795)	Transportador de ferro e	<i>Contig 1; 3</i>
ID991 (688359)	sideróforos	
ID198 (565055)	Família transportadora de	<i>Contig 1; 4</i>
ID1119 (156103)	açúcares	
ID247 (699319)	Família transportadora CNT	<i>Contig 1;3;5</i>
ID1025 (768149)		
ID1583 (605005)		
ID166 (469790)	Transportadora de manganês	<i>Contig 1</i>

*Relacionada à sequência em pares de bases.

Também foram anotadas pela análise de similaridade sequências de DNA como proteínas envolvidas no ciclo do glioxalato (TABELA 7).

TABELA 7: SEQUÊNCIAS DE DNA ANOTADAS COMO PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NO CICLO DO GLIOXILATO PELA ANÁLISE DE SIMILARIDADE DE SEQUÊNCIA GENÔMICA.

IDENTIFICAÇÃO (POSIÇÃO*)	ANOTAÇÃO	LOCALIZAÇÃO
ID140 (391850)	Família ACN (aconitato hidratase)	<i>Contig 1; 2</i>
ID67 (182468)	Malato sintase	<i>Contig 1; 4</i>
ID1291 (629997)		
ID134 (377264)	Citrato sintase	<i>Contig 1; 2; 3</i>
ID431 (126432)		
ID877 (392912)		
ID622 (645732)	NADP+ oxiredutase	<i>Contig 2; 4</i>
ID1172 (295212)		
ID209 (596597)	Metilisocitrato liase	<i>Contig 1; 2</i>
ID450 (179799)		

*Relacionada à sequência em pares de bases.

O ciclo do glioxilato é uma via metabólica alternativa para a síntese de carboidratos a partir de compostos de carbono, como acetato e outros produtos da degradação de etanol, ácidos graxos e poli-b-hidroxibutirato. Consiste em uma modificação do ciclo do ácido cítrico (TCA), pois compartilha as mesmas reações iniciais da geração de citrato e isocitrato, mas ao invés de seguir as reações do ciclo do ácido cítrico que levam à oxidação completa dos compostos de carbono à CO₂ para geração de energia, segue para a formação de succinato e glioxilato (FIGURA 12) (DUNN; RAMIREZ-TRUJILLO; HERNÁNDEZ-LUCAS; 2009).

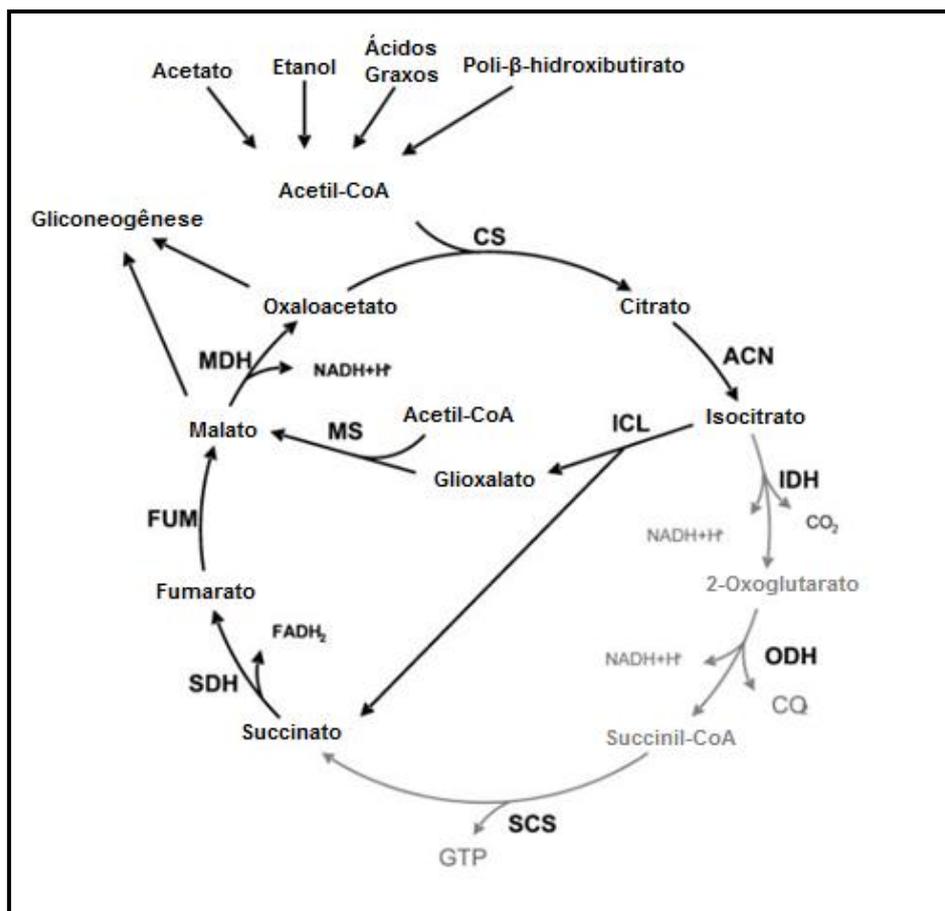


FIGURA 12: AS REAÇÕES ENZIMÁTICAS DO CICLO DO GLIOXILATO E DO CICLO DO ÁCIDO CÍTRICO (TCA). Abreviaturas: CS, citrato sintase; ACN, aconitase; IDH, isocitrato desidrogenase, IDH, 2-oxoglutarato desidrogenase; SCS, succinil-CoA sintetase; SDH, succinato desidrogenase; FUM, fumarase; MDH, malato desidrogenase; MS, da malato sintetase; ICL, isocitrato liase.

FONTE: Adaptado de DUNN *et al.*, 2009.

As proteínas de controle de divisão celular 42 (CDC 42), identificadas em *F. monophora* pela análise de similaridade, são consideradas um fator de virulência por desempenhar um papel crucial como reguladoras de várias vias, como por exemplo, sendo a responsável pelas alterações morfológicas no desenvolvimento celular nos estágios de crescimento de alguns fungos (FIGURA 13).

As proteínas de choque térmico (ou proteínas de estresse térmico) são consideradas fatores de virulência por atribuírem termotolerância aos fungos patogênicos. São classificadas em famílias baseando-se em peso molecular aproximado de cada molécula, por exemplo, se uma Hsp tem 30kDa, sua família será a Hsp 30. Existem várias famílias descritas como Hsp10, Hsp30, Hsp 60, Hsp70, Hsp100, entre outras. Em nossa análise parcial podemos descrever em *F. monophora* as seguintes famílias: Hsp40, Hsp60 e Hsp70 (TABELA 9).

TABELA 9: SEQUÊNCIAS DE DNA ANOTADAS COMO PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO PELA ANÁLISE DE SIMILARIDADE DE SEQUÊNCIA GENÔMICA.

IDENTIFICAÇÃO (POSIÇÃO*)	ANOTAÇÃO	LOCALIZAÇÃO
ID222 (630770)	Proteína do choque térmico	<i>Contig 1; 2</i>
ID501(312132)	HSp20	
ID182 (512873)	Chaperonas histonas	<i>Contig 1</i>
ID760 (100373)	Chaperona histona Rttp106	<i>Contig 3</i>
ID248 (704156)	Chaperona histona ASF1	<i>Contig 1; 4</i>
ID1311(682998)		
ID310 (874567)	Protéina do choque térmico 9/12	<i>Contig 1; 5; 6</i>
ID1625 (698014)		
ID1757 (256674)		
ID 95 (266614)	Fator de choque térmico	<i>Contig 1</i>

*Relacionada à sequência em pares de bases.

Estudos sobre melanina também a classificaram como um fator de virulência por conferir resistência ao calor, ao frio, a enzimas e a solventes orgânicos, por exercer papel antioxidante, aumentar a resistência a antifúngicos e potencializar a invasão a tecidos (NOSANCHUK; CASADEVALL, 2003). E suas vias principais de produção são: a via da dihidroxifenilalanina ou via da DOPA, por oxidação da L-dopa formando intermediários semelhantes aos da via humana e a via do dihidroxinaftaleno ou via DHN (FIGURA 14), tendo sua produção constitutiva a partir do acetato (acetil-CoA) derivado do

metabolismo da glicose. Sendo a segunda descrita como a mais frequentemente encontrada em ascomicetos e deuteromicetos e é o que caracteriza alguns fungos como sendo negros ou demáceos (LANISNIK RIZNER; WHEELER; 2003).

TABELA 10: SEQUÊNCIAS DE DNA ANOTADAS COMO PROTEÍNAS RELACIONADAS A PRODUÇÃO DE MELANINA PELA ANÁLISE DE SIMILARIDADE DE SEQUÊNCIA GENÔMICA.

IDENTIFICAÇÃO (POSIÇÃO*)	ANOTAÇÃO	LOCALIZAÇÃO
ID 83 (224832) ID614 (625563)	Desidratase scitalone	<i>Contig 1; 2</i>
ID 59 (162225) ID773 (135774)	Homogentisato -1,2-dioxigenase	<i>Contig 1; 3</i>
ID 17 (46070)	1,3,8 trihidroxinaftaleno	<i>Contig 1</i>
ID 1668 (6876)	Lacase	<i>Contig 6</i>
ID692 (842132) ID811 (229790)	Tirosinase	<i>Contig 2; 3</i>

*Relacionada à sequência em pares de bases.

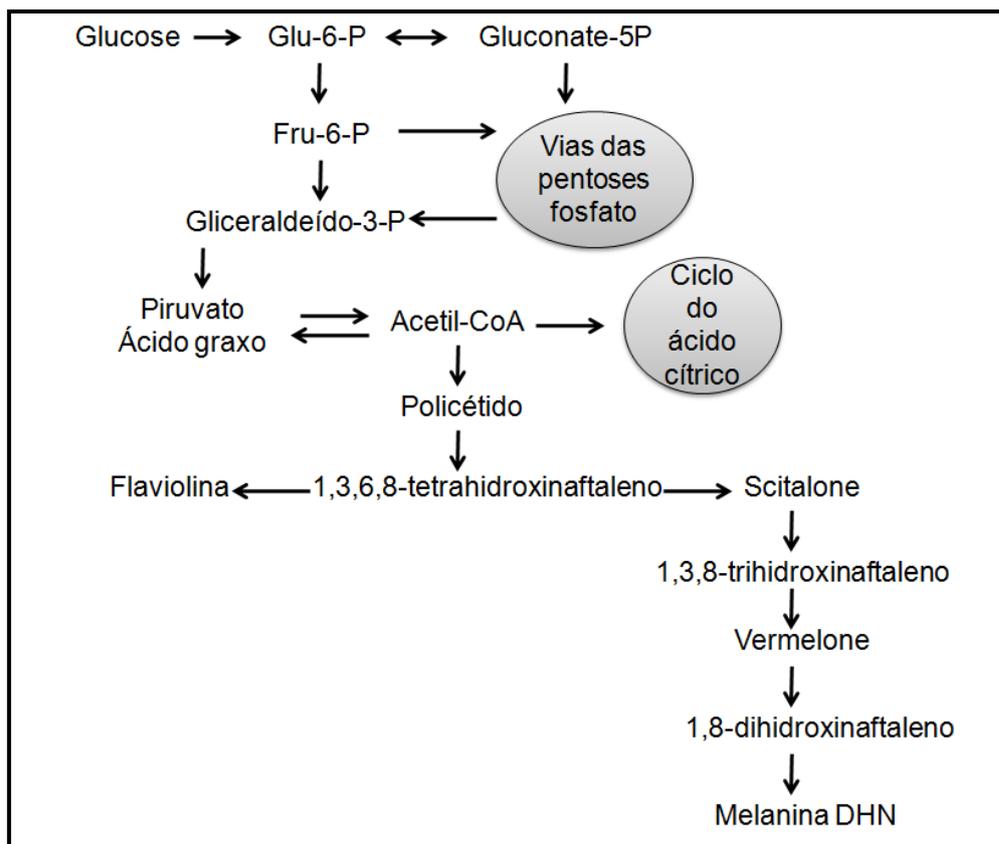


FIGURA 14: VIA DHN DE SÍNTESE DE MELANINA EM FUNGOS. A via de síntese de melanina com compostos identificados por similaridade na anotação parcial de *F. monophora* foi a DHN.

FONTE: URÂN & CANO, 2008.

A anotação e análise preliminar de *F. monophora* neste trabalho contribuiu para ampliar o entendimento dos genes envolvidos nos mecanismos de virulência, patogenicidade e maior compreensão da biologia molecular do fungo. Esclareceu algumas vias metabólicas básicas como respiração celular e outras estratégicas como proteínas de choque térmico e o ciclo do glioxilato, apontando novos alvos de estudo e direcionando uma continuidade na pesquisa com uma anotação mais avançada.

5.1.2 Montagem do DNA Mitocondrial

A montagem do DNA mitocondrial foi realizada com êxito, obtendo 5 *contigs* com 26kb e conteúdo GC de 29%. A anotação automática no software SILA (VIALLE *et al.*, 2013) permitiu a anotação de 43 proteínas (FIGURA 15). A maioria das proteínas foram consideradas hipotéticas, as demais estão relacionadas a mecanismo de respiração e metabolismo energético como as moléculas NADH, ATP e cytochrome C.

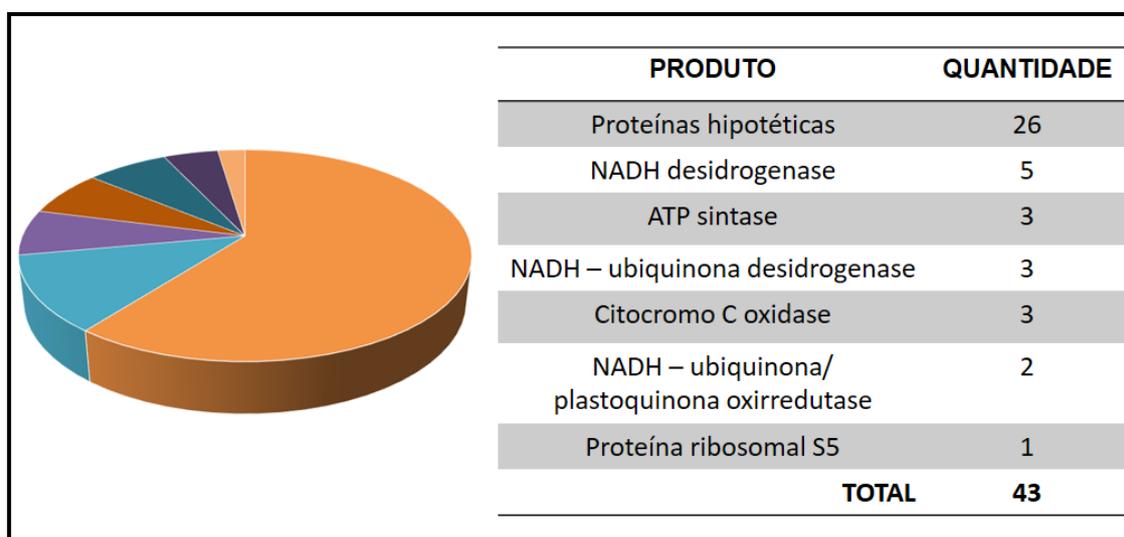


FIGURA 15: ANOTAÇÃO AUTOMÁTICA DO DNA MITOCONDRIAL GERADO NO SOFTWARE SILA. A maioria das proteínas foram anotadas como proteínas hipotéticas, algumas relacionadas a mecanismo de respiração e metabolismo energético como as moléculas NADH, ATP e citocromo C.

FONTE: Adaptado do software SILA, 2016.

5.2 CARACTERIZAÇÃO CARIOTÍPICA

5.2.1 Cariotipagem Citológica

A cariotipagem citológica baseia-se na observação microscópica de cromossomos metafásicos, considerando que nesta fase do ciclo mitótico os cromossomos apresentam-se em elevado estado de condensação sendo

possível a sua individualização e conseqüente contabilização. Das observações recolhidas em outros estudos com fungos (TSUCHIYA & TAGA, 2001; EUSEBIO-COPE *et al.*, 2009) tem sido evidente que o período de germinação dos esporos é determinante no número de metáfases identificadas. A germinação dos esporos foi avaliada num intervalo entre 6 e 24 horas, sendo que o tempo ótimo de germinação dos esporos foi determinada em 18 horas de incubação da solução de esporos a 28°C (FIGURA 16).

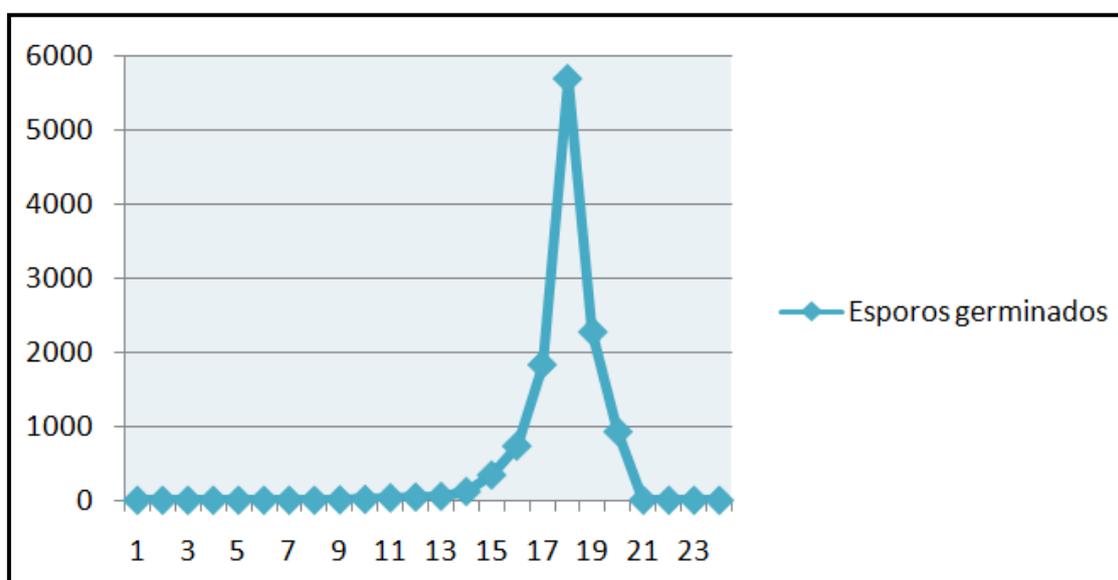


FIGURA 16: GRÁFICO COM MÉDIA DE ESPOROS GERMINADOS EM TRÊS REPETIÇÕES REALIZADAS. A taxa de germinação dos esporos foi avaliada e contabilizada de hora em hora. O maior número de esporos germinando foi contabilizado no período de 18 horas de incubação da solução de esporos a 28°C nas três repetições.

FONTE: O AUTOR, 2015.

Contudo, o número de núcleos em metáfase foi insuficiente ao usualmente necessário para caracterizar o cariótipo de um organismo e, por isso, testou-se um composto químico responsável pela interrupção do ciclo celular na metáfase. O tiabendazol mostrou-se eficiente, foi observado inibição total no desenvolvimento dos esporos e um aumento no número de núcleos metafásicos após 3 horas de exposição do fungo ao composto (FIGURA 17).

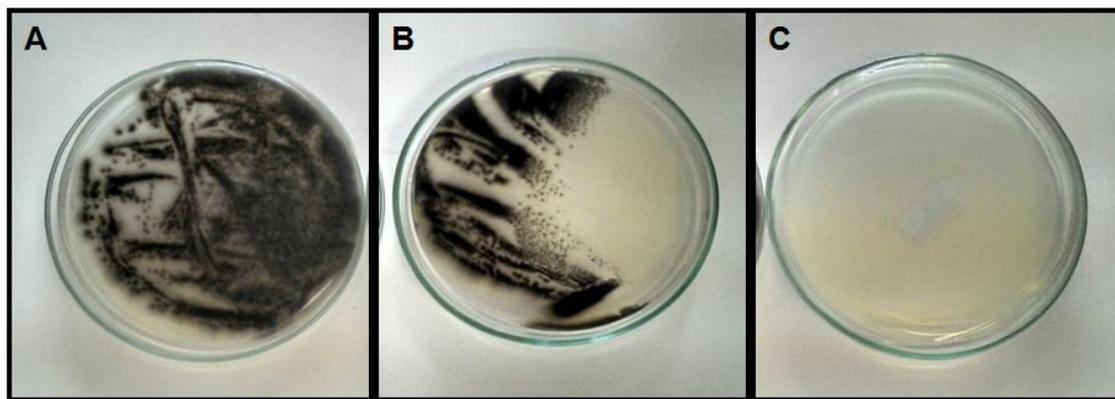


FIGURA 17: PLACAS DE ÁGAR SABOURAUD ESTRIADAS COM SOLUÇÃO DE ESPOROS DE *F. monophora* EXPOSTAS AO AGENTE BLOQUEADOR TIABENDAZOL. A) Placa apenas com solução salina 0.85% como controle. B) Placa com 2 horas de exposição ao tiabendazol e inibição parcial do desenvolvimento do fungo. C) Placa com 3 horas de exposição ao tiabendazol apresentando inibição total do desenvolvimento do fungo.

FONTE: O AUTOR, 2015.

5.2.2 Cariotipagem Eletroforética

Para a determinação do cariótipo eletroforético, também foi necessário realizar a etapa de germinação de esporos descrita anteriormente. A partir da solução de esporos germinados, iniciou-se a otimização da obtenção de protoplastos. A formação de protoplastos depende de vários fatores, como tipo e concentração de solução enzimática aplicada, tempo de digestão, estabilizador osmótico, pH e temperatura de incubação (MARCHI *et al.*, 2006). As diferenças na composição e estrutura da parede celular dos fungos também têm grande relevância neste processo.

Baseados em literatura, foram selecionados e testados três estabilizadores osmóticos, cloreto de potássio (KCl), sulfato de magnésio ($MgSO_4$) e fosfato monossódico (NaH_2PO_4) combinados a vários períodos de exposição à solução enzimática Lysing Enzymes (Sigma), incubados em shaker a 28°C (TAGA, 2007; KAVA-CORDEIRO, 2005).

Obtivemos os melhores resultados, ou seja, o maior número de protoplastos obtidos nas três repetições realizadas, na combinação do estabilizador osmótico $MgSO_4$ associado a 2 horas de exposição dos esporos a solução enzimática, conforme demonstrado na tabela 11.

TABELA 11: AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA FORMAÇÃO DE PROTOPLASTOS EXPOSTOS AOS DIFERENTES ESTABILIZADORES OSMÓTICOS ASSOCIADO AO TEMPO DE EXPOSIÇÃO DOS ESPOROS À SOLUÇÃO ENZIMÁTICA.

Tempo exposição à solução enzimática	KCl			MgSO ₄			NaHPO ₄		
	1ªrep	2ªrep	3ªrep	1ªrep	2ªrep	3ªrep	1ªrep	2ªrep	3ªrep
30 minutos	2x10 ⁶	2x10 ⁶	2x10 ⁶						
1 hora	2x10 ⁶	2x10 ³	2x10 ⁴	2x10 ⁶					
2 horas	2x10 ³	2x10 ²	2x10 ³	2x10 ⁶	2x10 ⁶	2x10 ⁶	1x10 ⁶	2x10 ²	2x10 ⁴
3 horas	837	1x10 ³	1x10 ²	2x10 ⁴	2x10 ⁶	2x10 ⁵	1x10 ²	2x10 ²	1x10 ³
4 horas	X	375	468	866	2x10 ⁴	1x10 ²	x	1x10 ³	973
5 horas	X	X	X	X	943	x	x	547	X

LEGENDA: rep - repetição

Foram obtidos protoplastos com a solução enzimática Lysing Enzymes from *Trichoderma harzianum* L2265 (Sigma). A observação microscópica mostrou que protoplastos que se encontravam individualizados (FIGURA 18) ou agregados. O número de protoplastos formados foi suficiente, atingido a concentração necessária para a realização de PFGE, que está reportada em 10⁶ protoplastos/ml (TSUCHIYA & TAGA, 2001).

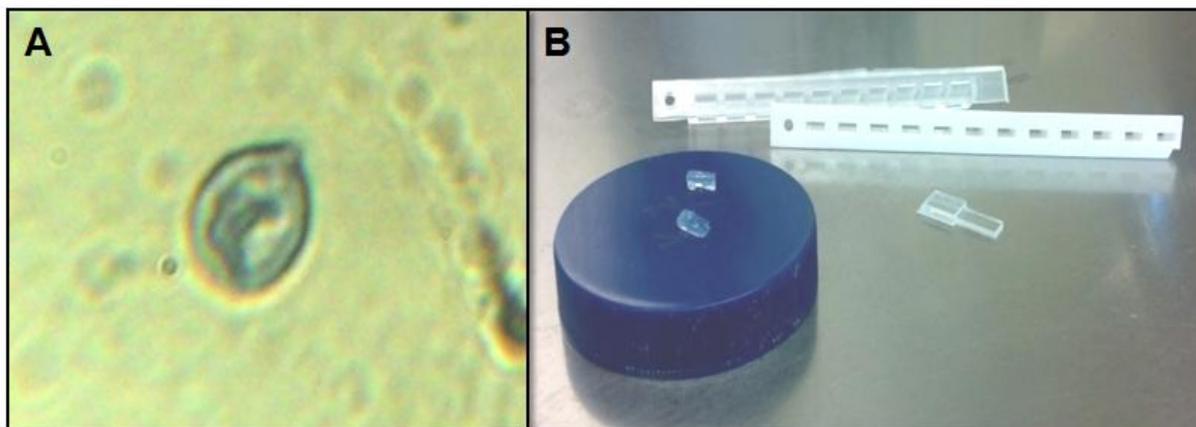


FIGURA 18: OBTENÇÃO DE PROTOPLASTO DE *Fonsecaea monophora*. A) PROTOPLASTO DE *Fonsecaea monophora*. Observação microscópica de protoplasto individualizado. B) MOLDES DO APARELHO CHEF-DRII E PLUGS DE AGAROSE CONTENDO PROTOPLASTOS. A solução de protoplastos misturada a agarose formando os plugs de agarose que devem ser submetidos à corrida eletroforética. FONTE: O AUTOR, 2015.

A solução com protoplastos homogeneizada com agarose Chromosomal Grade (Sigma) 0,6% foi dispensada em moldes para montagem dos plugs de agarose (FIGURA 22). Após incubação em Solução de lise, os plugs estão armazenados em EDTA 50 mM a 4°C até a sua utilização. A corrida eletroforética será realizada com os plugs de agarose em tampão TBE (0,5x) (*Tris Boric Acid EDTA Buffer*). A espécie *Aspergillus nidulans* será utilizada como marcador. Na realização da PFGE serão aplicadas as condições recomendadas para fungos.

6 DISCUSSÃO

O *draft* de *F. monophora* de melhor qualidade obtido tem 374 *contigs* sendo destes 328 *scaffolds* com mediana (N50) de 268.916 pb, um teor de G + C de 52% e 34,21Mb de tamanho. Esta montagem teve um número de *contigs* próximo ao que vem sendo publicado recentemente, como dois trabalhos realizados com espécies de leveduras negras, onde os *drafts* de *Cladophialophora imunda* apresentou 466 *contigs* (STERFLINGER *et al.*, 2014) e *Phialophora attae* apresentou 139 *contigs* (MORENO *et al.*, 2015).

A anotação preliminar permitiu inferir várias funções aos genes, como proteínas envolvidas no processo de respiração, proteínas estruturais, metabolismos de carboidratos, lipídeos, zinco e vitaminas, relacionadas ao estresse oxidativo e choque térmico. Dentre estas, podemos relacionar 16% (1.920) das proteínas anotadas ao metabolismo de respiração e 5% (600) às proteínas estruturais; valores maiores do que os encontrados no transcriptoma de *F. pedrosoi*, onde 2% (7) das proteínas foram relacionadas à respiração e 5% (17) foram anotadas como proteínas estruturais (FERRAZ, 2011).

Dentre as proteínas transportadoras anotadas, as proteínas transportadoras reguladas por zinco estão presentes no citoplasma e em várias organelas, incluindo núcleo, retículo endoplasmático, complexo de Golgi e mitocôndrias. O zinco é um micronutriente essencial para os eucariontes, sendo cofator de várias enzimas e componente estrutural crucial de várias moléculas, como por exemplo, os dedos de zinco. Como o zinco não possui atividade redox, seu acúmulo excessivo na célula pode ser tóxico e essa toxicidade está associada a ligações inadequadas às proteínas, que podem interromper processos bioquímicos relevantes, como respiração; além de gerar espécies reativas de oxigênio que danificam lipídios, proteínas e DNA, levando à morte celular. Pela importância biológica adquirida pelos transportares de zinco, esses transportadores tornaram-se altamente conservados filogeneticamente entre os eucariontes (MACDIARMID; GAITHER; EIDE; 2000).

A Maior Superfamília Facilitadora (MFS) é uma das maiores famílias de transportadores, ubíquas a todos os organismos vivos estudados, estão envolvidas na extrusão ativa de drogas antifúngicas (PAULSEN *et al.*, 2000).

Pouco se conhece sobre esses transportadores, mas sua presença extensiva em *C. albicans*, *A. fumigatus* e *C. neoformans*, associados a estudos demonstrando expressão elevada dos genes codificadores destas proteínas perante o tratamento com drogas, sugerem fortemente que estão associadas à resistência a antifúngicos (COSTA *et al.*, 2014).

Também foram anotadas pela análise de similaridade sequências de DNA como proteínas envolvidas no ciclo do glioxilato, uma via metabólica alternativa para a formação de succinato e glioxilato (DUNN; RAMIREZ-TRUJILLO; HERNÁNDEZ-LUCAS; 2009). Estudos de regulação genética do ciclo do glioxilato revelaram que os genes de isocitrato liase e malato sintase são fatores essenciais para o crescimento de plantas e na patogenicidade de bactérias e fungos (LORENZ; FINK; 2002; VEREECKE *et al.*, 2002). Na infecção por *M. tuberculosis*, *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *C. neoformans* e *R. fascians*, a síntese de isocitrato liase e malato sintase favorece, a partir de compostos simples de carbono, a formação de polissacarídeos complexos, tais como celulose, glucanas e quitina – componentes fundamentais para sobrevivência e disseminação do patógeno dentro do hospedeiro. Em *P. brasiliensis*, fungo que causa a paracoccidioidomicose em humanos, Derengowski e colaboradores (2008) relataram aumento nos níveis transcricionais dos genes isocitrato liase e malato sintase do fungo em modelo de infecção, sugerindo um possível mecanismo de adaptação do fungo em resposta ao ambiente interno do fagossomo, pobre em fontes complexas de carbonos.

Já foram relatados trabalhos caracterizando o ciclo do glioxilato nos fungos patogênicos de humanos *Candida albicans* (LORENZ; BENDER, FINK 2004) e *Penicillium marneffe* (THIRACH; COOPER; VANITTANAKOM; 2008), e na bactéria *Mycobacterium tuberculosis* (DUBNAU *et al.*, 2002). Esses patógenos durante a infecção apresentaram aumento da expressão de isocitrato liase em resposta à fagocitose por macrófagos. Todos esses trabalhos reforçam a relevância do ciclo do glioxilato na virulência de fungos e bactérias em plantas, animais e humanos, evidenciando alvos promissores para drogas inibidoras específicas, como a inativação das enzimas que bloqueariam o ciclo do glioxilato, podendo diminuir drasticamente a patogênese desses organismos.

As proteínas de controle de divisão celular 42 (CDC 42), encontradas na análise genômica de *F. monophora*, são reguladoras das alterações morfológicas no desenvolvimento celular nos estágios de crescimento de alguns fungos. Em fungos patógenos humanos como *C. albicans* e *P. marneffeii*, são responsáveis pela polarização das formas leveduriformes e micelial.

Em *E. dermatitidis*, a expressão ativa de CDC42 está associada a transição morfológica das células leveduriformes para formação de corpos muriformes. Em *F. monophora*, CDC42 já foi relacionada a transição morfológica alterando tanto células miceliais, quanto células leveduriformes para corpos muriformes (XIE *et al.*, 2012).

Quanto as proteínas relacionadas ao estresse oxidativo, a enzima oxidase alternativa presente na membrana mitocondrial interna de plantas e alguns fungos e protozoários, participa de uma via alternativa de oxidação da cadeia transportadora de elétrons na respiração celular (VANLERBERGHE; McINTOSH, 1997). Nos fungos *Neurospora crassa* e *Hansenula anomala*, quando a via citocromo c oxidase é inibida, os níveis dos transcritos do gene nuclear AOX1, que codificam a oxidase alternativa aumentam; esses resultados apontam para ativação de uma via alternativa. Esta ativação é aplicada para corrigir uma condição de estresse oxidativo do organismo, diminuindo a produção de EROs na respiração ao competir com elétrons da via clássica de oxidação. Alguns estudos revelaram que a expressão do gene AOX1 pode ser estimulada em condições de estresse, como baixas temperaturas, espécies reativas de oxigênio (EROs) e na infecção de patógenos. Desse modo, AOX1 atuaria como agente antioxidante contra espécies reativas de oxigênio (EROS) gerados da respiração e da infecção (MISSALL; LODGE; McEWEN; 2004). Sendo assim, durante o processo infeccioso, as células fagocíticas podem utilizar o estresse oxidativo como mecanismo de defesa contra patógenos intracelulares (WESTWATER; BALISH; SCHOFIELD; 2005). Alguns patógenos mesmo no ambiente hostil de fagossomos conseguem resistir ao estresse oxidativo, através da produção de enzimas antioxidantes que detoxificam as EROs, como a oxidase alternativa, a catalase e a superóxido dismutase.

As enzimas superóxido dismutase catalisam a dismutação de ânions superóxidos a peróxidos de hidrogênio e oxigênio (BONFIM, 2014). Juntamente com outras enzimas antioxidantes, a superóxido dismutase desempenha papel protetor às células contra os efeitos tóxicos das espécies reativas de oxigênio (EROs). Os peróxidos de hidrogênio, por sua vez podem ser detoxificados pelas enzimas catalase, glutarredoxinas e tioredoxinas.

As tioredoxinas são moléculas relacionadas ao estresse oxidativo, detoxificam diretamente moléculas como o peróxido de hidrogênio. São moléculas necessárias para a manutenção de homeostase redox, além de serem implicadas em várias funções fisiológicas que incluem expressão genética, crescimento celular e apoptose. A presença de tioredoxinas já foi evidenciada em *F. pedrosoi* caracterizando um metabolismo para a manutenção do balanço redox celular e um mecanismo de adaptação muito versátil, e por isso considerado um fator de virulência (FERRAZ, 2011).

As proteínas de choque térmico (ou proteínas de estresse térmico) são altamente conservadas, sendo encontradas em todos os organismos procariontes e eucariontes estudados. A primeira função atribuída a estas proteínas foi a de proporcionar termotolerância ao organismo. Depois, foi atribuída a função de chaperona molecular ou seja, também executam o dobramento de outras proteínas. Trabalhos posteriores demonstraram que vários fatores desencadeavam a síntese das proteínas de choque térmico como estresse oxidativo, estresse nutricional, radiação UV e exposição a substâncias químicas indicando um papel protetor da proteínas ao estresse térmico, auxiliando na adaptação celular (POCKLEY, 2001).

A melanina aumenta a capacidade de resistência e tolerância desse fungo às condições hostis. A via de síntese de melanina descrita para *F. pedrosoi* foi a DHN (CUNHA, FRANZEN *et al.*, 2005), também acreditamos ser a via de *F. monophora*, já que podemos identificar várias destas proteínas (CASADEVALL; EISENMAN, 2012). A presença desse pigmento em fungos é relatada desde 1960 e esta via de síntese de melanina já foi descrita e citada como fator de virulência em vários fungos patogênicos, como *C. albicans* e *C. neoformans*, *Aspergillus spp.*, *E. dermatitidis*, *P. brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum* e *Sporothrix schenckii* (JACOBSON, 2000; LANGFELDER,

STREIBEL *et al.*, 2003; MORRIS-JONES *et al.*, 2003; NOSANCHUK; CASADEVALL, 2003).

As fenoloxidasas são enzimas que catalisam a oxidação de fenóis e possuem como característica comum: oxidam compostos aromáticos, tendo como aceptor terminal de elétrons o oxigênio molecular (MAYER; STAPLES, 2002). Nos fungos, estão associadas a síntese de melaninas e outros pigmentos. As fenoloxidasas dividem-se em duas subclasses: lacases e tirosinases (DURAN; ESPOSITO, 2000).

A lacase oxida polifenóis, metoxi fenóis substituídos, diaminas e uma considerável série de outros substratos (MINUSSI *et al.*, 2002). Do ponto de vista fisiológico, as lacases fúngicas estão envolvidas em processos de morfogênese, degradação de lignina, patogênese e formação de pigmentos (MOROZOVA *et al.*, 2007). Lacases têm sido extensivamente pesquisadas, devido suas propriedades que as tornam altamente úteis em diversos processos biotecnológicos (LIBARDI JUNIOR, 2010). Dentre as várias aplicações desta enzima podemos destacar: a descoloração de corantes industriais, síntese de polímeros, biossensores amperométricos para detecção de fenol e também no processamento de alimentos e bebidas, remoção de xenobióticos em sistemas de águas, remoção de compostos fenólicos de vinhos, análises de drogas e produção de etanol (MAYER; STAPLES, 2002; MACIEL *et al.*, 2010).

As tirosinases são enzimas associadas ao escurecimento enzimático e à pigmentação em fungos. As tirosinases fúngicas possuem grande importância nas indústrias farmacêuticas (síntese de fármacos o-difenólicos) e de alimentos (DURÁN *et al.*, 2002; HALAOULI *et al.*, 2006), também tem sido aplicadas na descoloração de corantes industriais e remoção de fenóis presentes em efluentes (CHIACCHIERINI; RESTUCCIA, D.; VINCI, G.; 2004).

Estudos têm sugerido que pode haver ligações fisiológicas entre assimilação de hidrocarboneto aromático e certos padrões de infecção em mamíferos (PRENAFETA-BOLDU *et al.*, 2006). Muitas das linhagens estão intimamente relacionadas com as espécies de fungos patogênicos humanos, agentes de micoses e infecções neurológicas (GOSTINCAR; GRUBE; GUNDE-CIMERMAN; 2011).

A anotação e análise preliminar de *F. monophora* permitiu o entendimento de alguns genes envolvidos nos metabolismos de carboidratos, respiração e mecanismos de virulência e patogenicidade, esclarecendo assim a biologia deste organismo.

Para a observação microscópica de cromossomos, obtivemos bons resultados com o tiabendazol como agente bloqueador do ciclo celular. Em 2004, Tsuchiya e colaboradores demonstraram a eficácia deste composto na interrupção do ciclo celular na metáfase para o fungo *N. crassa*, assim como Eusebio-Cope e colaboradores, em 2009, ao observar os cromossomos de *Cryphonectria parasítica*. Tsuchiya e Taga (2001) tinham observado anteriormente a ineficácia deste composto no aumento da frequência metafásica para os fungos *C. heterostrophus*, *C. carbonum* e *C. sativus*.

Para a cariotipagem eletroforética, otimizamos a produção de protoplastos com a combinação do estabilizador osmótico MgSO₄ associado a 2 horas de exposição dos esporos a solução enzimática, o mesmo estabilizador usado nesta análise com a espécie *Mycosphaerella graminicola* (MEHRABI, TAGA, KEMA; 2007).

Em 2006, Marchi e colaboradores demonstraram que a concentração da solução enzimática e o tempo de incubação também influenciam a produção de protoplastos. O tempo de incubação do material biológico com a solução enzimática também foi testado, demonstrando que após 5 horas de incubação, ocorria um decréscimo no número de protoplastos observados, provavelmente devido à degeneração dos primeiros protoplastos formados (KIM *et al.*, 2000). A metodologia para montagem dos *plugs* de agarose foi aplicada com sucesso em diversos estudos (KAVA-CORDEIRO *et al.*, 2005; MEHRABI, TAGA, KEMA; 2007; EUSEBIO-COPE *et al.*, 2009). Como controle será usado o *Aspergillus nidulans*, espécie que apresenta seu cariótipo eletroforético elucidado (BRODY, CARBON; 1989).

7 CONCLUSÃO

A combinação de mais de uma plataforma de sequenciamento, no caso Illumina MiSeq e Ion Proton, promoveram melhora significativa no processo de montagem do genoma de *F. monophora*. As leituras Illumina MiSeq e Ion Proton conseguiram boa complementariedade quando submetidas em conjunto ao montador.

Um draft de *F. monophora* foi obtido apresentando 301 *contigs* com mediana (N50) de 268.916 pb, com cobertura de 90x, um teor de G + C de 52% e 34,21Mb de tamanho. Os dados de anotação preliminares foram promissores, apontando vias de metabolismo básicas e vias estratégicas, além de evidenciar proteínas específicas relacionadas à patogenicidade do microrganismo como a CDC42 e as tioredoxinas. Esse material direciona estudos futuros, apresentando genes e proteínas específicos como alvos para avanços no entendimento da epidemiologia destes agentes.

Como resultado parcial para a cariotipagem citológica, o tiabendazol se mostrou eficiente como agente bloqueador com inibição total no desenvolvimento dos esporos a partir de 3 horas de exposição do fungo ao composto.

Para a cariotipagem eletroforética, o protocolo para a obtenção de protoplastos foi estabelecido com a combinação da otimização da germinação dos esporos de *F. monophora* com 18 horas de incubação, com posterior exposição dos esporos a solução enzimática por 2 horas combinado ao tampão osmótico MgSO₄.

Os dados de bioinformática gerados direcionam este estudo para análises mais efetivas, aprofundando as anotações de proteínas, as construções de vias metabólicas e o estudo de proteínas ortólogas. A caracterização cariotípica, ainda demanda continuação da execução dos protocolos. As duas linhas de trabalho deste estudo necessitam de continuidade.

8 PERSPECTIVAS

Esse trabalho terá continuidade no período de doutorado, já iniciado em dezembro de 2015 pela modalidade de progressão. Nesta próxima etapa temos como objetivo principal comparar o padrão de expressão global de genes expressos nas espécies patogênicas, agentes causais de infecção em hospedeiros humanos: *F. monophora* e *F. pugnacius*. Métodos de sequenciamento de última geração, como o PacBio, serão utilizados para geração de dados possibilitando a análise genômica comparativa estrutural e funcional com o objetivo de identificar as principais diferenças gênicas estruturais e os genes diferencialmente expressos nas espécies.

Para este fim, temos como objetivos específicos:

- Realizar a extração de DNA, sequenciamento genômico, montagem e anotação do genoma parcial de *F. pugnacius*.
- Explorar os dados gerados pelo sequenciamento genômico, montagem e anotação do genoma parcial de *F. monophora* e *F. pugnacius*.
- Elucidar vias metabólicas das espécies de estudo.
- Identificar genes e mecanismos de patogenicidade e virulência.
- Estudar a homologia de sequências de nucleotídeos e aminoácidos entre as espécies do gênero *Fonsecaea*.
- Caracterizar o cariótipo das espécies *F. monophora* e *F.pugnacius*.

As informações geradas permitirão ampliar o entendimento dos genes envolvidos nos mecanismos de virulência, patogenicidade e maior compreensão da biologia destes agentes, possibilitando o desenvolvimento de biomarcadores para diagnóstico, estudos epidemiológicos e alvos para o desenvolvimento de drogas.

REFERÊNCIAS

- ABRAMO, F.; BASTELLI, F.; NARDONI, S.; MANCIANTI, F. Feline cutaneous phaeohyphomycosis due to *Cladophialophora bantiana*. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v: 4 p:157-163, 2002.
- AL-ABDELY, H.M.; NAJVAR, L.; BOCANEGRA, R.; FOTHERGILL, A.; LOEBENBERG, D.; RINALDI, M.G.; GRAYBILL, J.R. SCH 56592, amphotericin B, or itraconazole therapy of experimental murine cerebral phaeohyphomycosis due to *Ramichloridium obovoideum* ("*Ramichloridium mackenziei*"). **Antimicrob Agents Chemother**. v: 44 p: 1159-1162, 2000.
- ALVIANO, C.S.; FARBIARZ, S.R.; SOUZA, W.; ANGLUSTER, J.; TRAVASSOS, L.R. Characterization of *Fonsecaea pedrosoi* melanin. *J Gen Microbiol*. v: 137 p: 837-844, 1991.
- ALVIANO, D. S.; FRANZEN, A. J.; TRAVASSOS, L. R. *et al.* Melanin from *Fonsecaea pedrosoi* Induces Production of Human Antifungal Antibodies and Enhances the Antimicrobial Efficacy of Phagocytes. **Infection and Immunity** , v. 72, n. 1, p. 229–237, 2004.
- ARIAS, M. C.; FRANCISCO, F. O.; SILVESTRE, D. O DNA mitochondrial em estudos populacionais e evolutivos de meliponíneos. **Apoidea Neotropica**. UNESC, 2003.
- ASAKURA, K.; *et al.* Electrophoretic karyotypes of clinically isolated yeasts of *Candida albicans* and *C. glabrata*. **Journal of General Microbiology**. v: 137 p: 2531-2538, 1991.
- ATTAPATTU, M.C. Chromoblastomycosis—a clinical and mycological study of 71 cases from Sri Lanka. **Mycopathologia**. v:137 p:145–51, 1997.
- AZEVEDO, C. M. P. S.; GOMES, R. R.; VICENTE, V. A.; SANTOS, D. W. C. L.; MARQUES, S. G.; NASCIMENTO, M. M. F.; ANDRADE, C. E. W.; SILVA, R. R.; QUERIOZ-TELLES, F.; HOOG, G. S. *Fonsecaea pugnacius*, a novel agent of disseminated chromoblastomycosis. **J Clin Microbiol**. v: 53 p: 2674-2685, 2015.
- BADALI, H.; GUEIDAN, C.; NAJAFZADEH, M. J.; BONIFAZ, A.; GERRITS VAN DEN ENDE, A. H. G.; HOOG, G. S. DE. Biodiversity of the genus *Cladophialophora*. **Studies in Mycology**. v.175, p. 191, 2008.
- BADALI, H.; BONIFAZ, A.; BARRÓN-TAPIA, T.; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, D.; ESTRADA-AGUILAR, L.; CAVALCANTE OLIVEIRA, N.M.; *et al.* *Rhinocladiella aquaspersa*, proven agent of verrucous skin infection and a novel type of chromoblastomycosis. **Medical Mycology**. v:48 p:696–703, 2010.

BANKEVICH, A.; NURK, S.; ANTIPOV, D.; GUREVICH, A.A.; et al. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. **Journal Of Computational Biology**. v: 19 p: 455-477, 2012.

BERGLUND, E. C.; KIIALAINEN, A.; SYVANEN, A.C. Next-generation sequencing technologies and applications for human genetic history and forensics. **Investig Genet**. v: 2 p: 23, 2011.

BIOINFORMATICS, B. FastQC Manual. Disponível em: <http://www.bioinformatics.nl/courses/RNAseq/FastQC_Manual.pdf>. Acesso em: 6/8/2015.

BLATTNER, F. R., PLUNKETT, G., III, BLOCH, C. A., PERNA, N. T., BURLAND, V., RILEY, M., COLLADO-VIDES, J., GLASNER, J. D., RODE, C. K., MAYHEW, G. F.; et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. **Science**. v: 277 p: 1453-1474, 1997.

BOCCA, L, M.; BRITO, S. M. P. P.; FIGUEIREDO, F.; TOSTA, C. E. Inhibition of nitric oxide production by macrophages in cromoblastomycosis: a role for *Fonsecaea pedrosoi* melanin. **Mycopathologia**. v. 161, p. 195-203, 2006.

BONFIM, S. M. R. C. **Análise proteômica do fungo Paracoccidioides durante o processo infeccioso em macrófagos**. Tese (Doutorado em Medicina Tropical e Saúde Pública) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

BORBYE, L.; LINDE-LAURSEN, I.; CHRISTIANSEN, S.K.; GIESE, H. The chromosome complement of *Erysiphe graminis* f.sp *hordei* analysed by light microscopy and field inversion gel electrophoresis. **Mycology Research**. v: 96 p: 97-102, 1992.

BRODY, H.; CARBON, J. Electrophoretic karyotype of *Aspergillus nidulans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v: 86 p: 6260–6263, 1989.

CARDOSO, R.L.A. **Montagem genômica da bactéria endofítica diazotrófica *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M4**. Dissertação (Mestrado em Bioinformática) - Programa de Pós-Graduação em Bioinformática. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 2011.

CARVER, T.; HARRIS, S.R.; BERRIMAN, M.; PARKHILL, J. E.; MCQUILLAN, J. A. Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence based on experimental data. **Bioinformatic** (Oxford, Inglaterra). v: 28, p: 464-469, 2012.

CASADEVALL, A. Cards of Virulence and the Global Virulome for Humans. **Microbes Infect**. v:1 p:6, 2006.

CASADEVALL, A.; EISENMAN, E.C. Synthesis and assembly of fungal melanin. **Appl Microbiol Biotechnol**. v: 93 p: 931–940, 2012.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. Microbial virulence results from the interaction between host and microorganism. **Trends in Microbiology**. v: 11 p: 157–158, 2003.

CATEAU, E.; CANTE, V.; HERMOSO, D.G.; RODIER, M. Case of *Fonsecaea nubica* chromoblastomycosis from the French territory of Mayotte. **JMM Case Rep**, 2014.

CH Aidaroon, W.; TANANUVAT, N.; CHAVENGSAKSONRAM, P.; ANITTANAKOM, N. Corneal chromoblastomycosis caused by *Fonsecaea pedrosoi*. **Case Rep. Ophthalmol**. v:6 p:82-87, 2015.

CHANG, H.L.; KIM, D.S.; PARK, D.J.; KIM, H.J.; LEE, C.H.; SHIN, H.J. Acute cerebral phaeohyphomycosis due to *Wangiella dermatitidis* accompanied by cerebrospinal eosinophilia. **Journal of Clinical Microbiology**. v: 38 p:1965-1966, 2000.

CHÁVEZ, R.; FIERRO, F.; GORDILLO, F.; MARTIN, J.F.; EYZAGUIRRE. Electrophoretic karyotype of the filamentous fungus **Penicillium purpurogenum** and chromosomal location of several xylanolytic genes. **FEMS Microbiology Letters**. v: 1 p: 379-383, 2001.

CHIACCHIERINI, E., RESTUCCIA, D.; VINCI, G. Bioremediation of food industry effluents: recent applications of free and immobilised polyphenoloxidases. **Food and Science Technology International**. v: 10, p: 373-382, 2004.

CHOI, S. B., NORMI, Y. M., WAHAB, H. A. Revealing the functionality of hypothetical protein KPN00728 from *Klebsiella pneumoniae* MGH78578: molecular dynamics simulation approaches. **BMC Bioinformatics**, 2011.

COLE, S. T.; BROSCHE, R.; PARKHILL, J.; GARNIER, T.; CHURCHER, C.; HARRIS, D.GORDON, S. V.; EIGLMEIER, K.; GAS, S.; BARRY, C. E.; *et al.* Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**. v: 393 p: 53744, 1998.

CORRAD, I M.M.; CECÍLIO FILHO, A.B.; CAVARIANNI, R.L.; CAZETA, J.O.; PIMENTA, V.M.. Teor de nitrato em almeirão, em função da cultivar e densidade de plantio, em cultivo no solo e em hidroponia. **Hort. Bras**. v: 31 p:153- 156, 2006.

COSTA, C.; DIAS, P.J; SÁ-CORREIA, I.; TEIXEIRA, M.C. MFS transportadores de múltiplas drogas em fungos patogênicos: eles têm impacto clínico real? **Frente Physiol**.v: 5 p: 197, 2014.

CUNHA, M.M.; FRANZEN, A.J.; ALVIANO, D.S.; ZANARDI, E.; ALVIANO, C.S.; SOUZA, W.; ROZENTAL, S. Inhibition of melanin synthesis pathway by tricyclazole increases susceptibility of *Fonsecaea pedrosoi* against mouse macrophages. **Microsc Res Tech**. v: 68 p: 377-384, 2005.

CUOMO, C.A.; RODRIGUEZ-DEL VALLE, N.; PEREZ-SANCHEZ, L.; ABOUELLEIL, A.; GOLDBERG, J.; YOUNG, S.; ZENG, Q.; BIRREN, B.W. Genome Sequence of the Pathogenic Fungus *Sporothrix schenckii* (ATCC 58251). **Genome Announc.** v: 2(3):e00446, 2014.

DERENGOWSKI, L.S.; TAVARES, A.H.; SILVA, S.; PROCÓPIO, L.S.; FELIPE, M.S.; SILVA PEREIRA, I. Upregulation of glyoxylate cycle genes upon *Paracoccidioides brasiliensis* internalization by murine macrophages and in vitro nutritional stress condition. **Med Mycol.** v: 46 p:125–134, 2008.

DONG, B.; LI, D.; LI, R.; CHEN, SC-A.; LIU, W.; LIU, W.; *et al.* A chitin-like component on sclerotic cells of *Fonsecaea pedrosoi* inhibits dectin-1-mediated murine th17 development by masking β -glucans. **PLoS ONE.** v: 9 p:12, 2014.

DOYMAZ, M.Z.; SEYITHANOGLU, M.F.; HAKYEMEZ, I.; GULTEPE, B.S.; CEVIK, S.; ASLAN, T. A case of cerebral phaeohyphomycosis caused by *Fonsecaea monophora*, a neurotropic dematiaceous fungus, and a review of the literature. **Mycoses.** v: 58 p:187-92, 2015.

DUBNAU, E.; FONTÁN, P.; MANGANELLI, R.; SOARES-APPEL, S.; SMITH, I. Mycobacterium tuberculosis genes induced during infection of human macrophages. **Infect Immun.** v:70 p:2787–2795, 2002.

DUNN, M.F.; RAMIREZ-TRUJILLO, J.A.; HERNÁNDEZ-LUCAS, I. Major roles of isocitrate lyase and malate synthase in bacterial and fungal pathogenesis. **Microbiology.** v: 155 p: 3166–3175, 2009.

DURAN, N.; ESPOSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. **Appl. Catal. B: Environ.** v: 28, p: 83–99, 2000.

DURÁN, N.; ROSA, M. A.; D'ANNIBALE, A.; GIANFREDA, L. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. **Enzyme and Microbial Technology.** v: 31, p: 907-931, 2002.

ELIES, L.; BALANDRAUD, V.; BOULOUHA, L.; CRESPEAU, F.; GUILLOT, J. Fatal systemic phaeohyphomycosis in a cat due to *Cladophialophora bantiana*. **Journal of Veterinary Medicine a Physiology, Pathology, Clinical Medicine.** v: 50 p: 50-53, 2003.

ESTERRE, P.; ANDRIAN TSIMAH VANDY, A.; RAMARCEL, E.R.; PECARRERE, J.L. Forty years of chromoblastomycosis in Madagascar: a review. **Am J Trop Med Hyg.** v: 55 p: 45–7, 1996.

ESTERRE, P.; QUEIROZ-TELLES, F. Management of chromoblastomycosis: novel perspectives. **Current Opinion in Infectious Diseases.** v. 19, p. 148-152, 2006.

EUSEBIO-COPE, A.; SUZUKI, N.; SADEGHI-GARMAROODI, H.; TAGA, M. Cytological and electrophoretic karyotyping of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. **Fungal Genetics and Biology**. v: 46 p: 342–351, 2009.

FELIPE, M.S.S.; *et al.* Functional genome of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**. v: 45 p: 369–381, 2005.

FERRAZ, M.C.M. **Caracterização do transcriptoma parcial do fungo patogênico *Fonsecaea pedrosoi***. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) - Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular. Universidade de Brasília, 2011.

FERREIRO, L.; SPANAMBERG, A.; BORBA, M.R.; SANCHES, E.M.C.; ROEHE, C.; SANTURIO, J.M.; CHERMETTE, R. Feohifomicoses: infecções micóticas emergentes. **Acta Scientiae Veterinariae**. v: 35 p: 239-241, 2007.

FLEISCHMANN, R.D.; ADAMS M.D.; WHITE, O.; CLAYTON, R.A.; KIRKNESS, E.F.; KERLAVAGE, A.R.; BULT, C.J.; TOMB, J.F.; DOUGHERTY, B.A.; MERRICK, J.M.; *et al.* Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. **Science**. V: 269 p: 496-512.1995.

GALAGAN, J. E.; CALVO, S. E.; BORKOVICH, K. A.; SELKER, E. U.; READ, N. D.; *et al.* The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. **Nature**. v: 422 p: 859–868, 2003.

GARDNER, M. J.; HALL, N.; FUNG, E.; WHITE, O.; BERRIMAN, M.; HYMAN, R. W.; CARLTON, J. M. ; PAIN, A. ; NELSON, K. E. ; BOWMAN, S. ; *et al.* Genome se-quence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Nature**. v: 419 p: 498-511, 2002.

GARNICA, M.; NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F. Difficult mycoses of the skin: advances in the epidemiology and management of eumycetoma, phaeohyphomycosis and chromoblastomycosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**. v: 22, p: 559-563, 2009.

GIMENES, V.M.F.; SOUZA, M.G.; FERREIRA, K.S.; MARQUES, S.G.; GONÇALVES, A.G.; SANTOS, D.V.C.L.; SILVA, C.M.P.; ALMEIDA, S.R. Cytokines and lymphocyte proliferation in patients with different clinical forms of chromoblastomycosis. **Microbes Infect**. v: 7 p: 708-713, 2005.

GOSTINCAR, C.; GRUBE, M.; GUNDE-CIMERMAN, N. Evolution of fungal pathogens in domestic environments. **Fungal biology**. v: 115, p: 1008–18, 2011.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. Como observar cromossomos: um guia de técnica em citogenética vegetal, animal e humana. **São Paulo, Funpec** v. 8, p. 131, 2002.

GUREVICH, A.; SAVELIEV, V.; VYAHHI, N.; TESLER, G. QUASt: Quality assessment tool for genome assemblies. **Oxford Journal of Bioinformatics** v: 29 p: 1072-1075, 2013.

HALAOULI, S., ASTHER, M., SIGOILLOT, J. C., HAMDI, M. & LOMASCOLO, A. Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications. **Journal of Applied Microbiology**. v:100, p: 219-232, 2006.

HOOG, G.S.; GERRITS VAN DEN ENDE, A.H.G. Molecular diagnostics of clinical strains of filamentous basidiomycetes. **Mycoses**. v. 41, p.183–189, 1998.

HOOG, G.S.; WEENINK, X.O.; GERRITS VAN DEN ENDE, A.H.G. Taxonomy of the *Phialophora verrucosa* complex with the description of two new species. **Studies in Mycology**. v: 4 p: 107-122, 1999.

HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; FIGUERAS, M. J. **Atlas of clinical fungi**. 2. ed. Utrecht: Universitat Rovira i Virgili, 2000.

HOOG, G. S. DE.; ATTILI-ANGELIS, D.; VICENTE, V. A.; VAN DEN ENDE, A. H. G.; QUEIROZ-TELLES, F. Molecular ecology and pathogenic potential of *Fonsecaea* species. **Medical Mycology**. v. 42(5), p. 405-416, 2004.

HOOG, G. S.; NISHIKAKU, A. S.; FERNANDEZ-ZEPPEFELDT, G.; PADIN GONZALEZ, C. BURGER, E.; BADALI, H.; RICHARD-YEGRES, N; GERRITS VAN DEN ENDE, A. H. G. Molecular analysis and pathogenicity of the *Cladophialophora carrionii* complex, with the description of a novel species. **Studies in Mycology**. v: 58, p: 219-234, 2007.

HOOG, G S; VICENTE, V. A; NAJAFZADEH, M. J. *et al.* Waterborne *Exophiala* species causing disease in cold-blooded animals. **Persoonia**, v. 27, p. 46-72, 2011.

HORRÉ, R.; HOOG, G. S. Primary cerebral infections by melanized fungi: a review. **Studies in Mycology**. v: 43 p: 176 –193, 1999.

JACOBSON, E. S. Pathogenic roles for fungal melanins. **Clin Microbiol Rev.** v: 13 p: 708-17, 2000.

JAMIL, A.; LEE, Y.Y.; THEVARAJAH, S. Invasive squamous cell carcinoma arising from chromoblastomycosis. **Med Mycol.** v: 50 p:99–102, 2012.

KAVA-CORDEIRO, V.; QUEIROZ, M.V.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. Pulsed Field Gel Electrophoresis Reveals Chromosome Length and Number Differences in Brazilian Strains of *Metarhizium Anisopliae*. **Brazilian archives of biology and technology**. v:48 p: 1-6, 2005.

KEGG, KYOTO ENCYCLOPEDIA OF GENES AND GENOMES. Disponível em: <<http://www.genome.jp/kegg/>>. Acesso em: dez/2015.

KIM, B.H.; KANG, J.H.; JIN, M.; KIM, H.V.; SHIM, M.J.; CHOI, E.C. Mycelial protoplast isolation and regeneration of *Lentimus lepideus*. **Life Sciences**. v: 66, p: 1359-1367, 2000.

KOMBILA, M.; GOMEZ DE DIAZ, M.; RICHARD-LENOBLE, D.; RENDERS, A.; WALTER, P.; BILLIAULT, X.; *et al.* Chromoblastomycosis in Gabon. Study of 64 cases. **Sante**. v:5 p:235-44, 1995.

KOO, S.; KLOMPAS, M.; MARTY, F.M. *Fonsecaea monophora* cerebral phaeohyphomycosis: case report of successful surgical excision and voriconazole treatment and review. **Medical Mycology**. v: 48 p: 769-774, 2010.

KOONIN, E. V., GALPERIN, M. Y. (2002). Sequence-Evolution-Function. Computational Approaches in Comparative Genomics. Kluwer Academic, Boston, MA.

KOONIN, E. V. Orthologs, Paralogs, and Evolutionary Genomics1. **Annu Rev Genet**. v: 39 p: 309-338, 2005.

LA HOZ, R.M.; BADDLEY, J.W. Subcutaneous fungal infections. **Curr Infect Dis Rep**. 2012.

LANDER, E. S.; LINTON, L. M.; BIRREN, B.; NUSBAUM, C.; ZODY, M. C.; BALDWIN, J.; DEVON, K.; DEWAR, K.; DOYLE, M.; FITZHUGH, W.; *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**. v: 409 p: 860-921, 2001.

LANGFELDER, K., STREIBEL, M., JAHN, B., HAASE, G. e BRAKHAGE, A. A. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. **Fungal Genet Biol**. v:38 p:143-58, 2003.

LANISNIK RIZNER, T.; WHEELER, M. H. Melanin biosynthesis in the fungus *Curvularia lunata* (teleomorph: *Cochliobolus lunatus*). **Can J Microbiol** v:49 p: 110-9, 2003.

LEROY E. H.; MICHAEL W. H.; LLOYD M. S. Automated DNA sequencing and analysis of the human genome. **Genomics**. v:1 p: 201-212, 1987.

LI, D. M.; HOOG, G. S. Cerebral phaeohyphomycosis—a cure at what lengths? **Lancet Infectious Diseases**. v: 9 p: 376 -383, 2009.

LIBARDI JUNIOR, N. **Estudo de lacases fúngicas para degradação de compostos interferentes endócrinos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Departamento de Engenharia de Processos, Universidade da Região de Joinville, Joinville, Santa Catarina, 2010.

LIEBERMAN D. E.; BRAMBLE, D. M. Endurance running and the evolution of *Homo sapiens*. **Nature**. v: 432 p: 345-352

LIU, L. *et al.* Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. **Biomed Res Int.** v: 2012, 2012.

LORENZ, M.C.; FINK, G.R. Life and death in a macrophage: role of the glyoxylate cycle in virulence. **Eukaryot Cell.** v: 1 p:657–662, 2002.

LORENZ, M.C.; BENDER, J.A., FINK, G.R. Transcriptional response of *Candida albicans* upon internalization by macrophages. **Eukaryot Cell.** v: 3 p:1076-1087, 2004.

LOUREIRO, J. C. M. **Aplicação da citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal.** Dissertação (Doutorado em Biologia) Universidade de Aveiro, Portugal, 2007.

LUCASSE, C.; CHARDOME, J.; MAGIS, P. Cerebral mycosis from *Cladosporium trichoïdes* in a native of the Belgian Congo. **Ann Soc Belg Med Trop.** v:34 p:475-478, 1954.

LUPI, O.; TYRING, S.K.; MCGINNIS, M.R. Tropical dermatology: fungal tropical diseases. **J. Am. Acad. Dermatol.** v: 53 p:931–51, 2005.

MACDIARMID, C.W.; GAITHER, L.A., EIDE, D. Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO J.** v: 19 p:2845–2855, 2000.

MACIEL, M. J. M.; CASTRO E SILVA, A.; RIBEIRO, H. C. T. Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: a review. **Electronic Journal of Biotechnology.** v: 58, p: 582-594, 2010.

MACLEAN, D.; JONES, J. D.; STUDHOLME, D. J. Application of 'next-generation' sequencing technologies to microbial genetics. **Nature Reviews Microbiology.** v:7 p: 287-296, 2009.

MADHUGIRI, V.S.; SINGH, R.; VAVAHARE, M.; VIJAVAHARI, R.; *et al.* Opportunistic *Fonsecaea pedrosoi* brain abscess in a patient with non-cirrhotic portal fibrosis-induced hypersplenism- a novel association. **British Journal of Neurosurgery.** v: 27p: 690-693, 2013.

MAGALHÃES, V.D.; FERREIRA, J.C.; BARELLI, C.; DARINI, A.L.C. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia – uma revisão técnica. **Rev Inst Adolfo Lutz.** v: 64 p:155-161, 2005.

MARCHI, C.E.; BROMMONSCHENKELI, S.H.; QUEIROZ, M.V.; MIZUBUTI, E.S.G. Isolamento e regeneração de protoplastos de *Magnaporthe grisea*. **Summa Phytopathologica.** v: 32, p: 232-238, 2006.

MARDIS, E. R. The impact of next-generation sequencing technology on genetics.

Trends in Genetics. v: 24 p: 133-141, 2008.

MARGULIES, M.; EGHOLM, M.; ALTMAN, W. E.; ATTIYA, S.; BADER, J. S.; BEMBEN, L. A.; BERKA, J.; BRAVERMAN, M. S.; CHEN, Y. J.; CHEN, Z.; *et al.* Genome sequencing micro fabricated high-density picolitre reactions. **Nature.** v:437 p: 326-327, 2005.

MARTÍNEZ, R. L.; TOVAR, L.J.M. Chromoblastomycosis. **Clinics in Dermatology.** v: 25, p: 2188–194, 2007.

MAYER, A. M.; STAPLES, R. C. Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry.** v: 60; p:551-565, 2002.

MAXAM, A. M.; GILBERT, W. A new method for sequencing DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences. V: 74 p: 560–564, 1977.**

MEHRABI, R.; TAGA, M.; KEMA, G. H. J. Electrophoretic and cytological karyotyping of the foliar wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* reveals many chromosomes with a large size range. **Mycologia.** v: 99 p: 868-876, 2007.

McCLINTOCK B. *Neurospora*. I. Preliminary observations of the chromosomes of *Neurospora crassa*. **American Journal of Botany,** v: 32, p: 671–678, 1945.

MCKERNAN, D. P. *et al.* Age-Dependent Susceptibility of the Retinal Ganglion Cell Layer to Cell Death. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** V: 47 p: 807–814, 2006.

MILLER, J. R.; KOREN, S.; SUTTON, G. Assembly algorithms for next-generation sequencing data. **Genomics.** v: 95 p: 315-327, 2010.

MINUSSI, R. C. **Produção, purificação, caracterização e aplicação industrial de lacase fúngica.** Tese (Doutorado em Engenharia). Departamento de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 2002.

MISSAL, T.A.; LODGE, J.K.; McEWEN, J.E. Mechanisms of resistance to oxidative and nitrosative stress: implications for fungal survival in mammalian hosts. **Eukaryot Cell.** v: 3 p: 835–846, 2004.

MITCHELL, A.; CHANG, H.; DAUGHERTY, L.; FRASER, M.; HUNTER, S.; LOPEZ, R.; *et al.* The InterPro protein families database: the classification resource after 15 years. **Nucleic Acids Research,** 2015.

MORAN, G. P.; COLEMAN, D. C.; SULLIVAN, D. J.. Comparative Genomics and the Evolution of Pathogenicity in Human Pathogenic Fungi. **Eukaryotic Cell.** v. 1:10, p. 34-42, 2011.

MORENO, L. F.; STIELOW, J. B.; DE VRIES, M.; WEISS, V. A.; VICENTE, V. A.; DE HOOG, S. Draft genome sequence of the ant-associated

fungus *Phialophora attae* (CBS 131958). **Genome Announcement**. v: 3 p: 6, 2015.

MOROZOVA, O. V.; SHUMAKOVICH, G. P.; GORBACHEVA, M. A.; SHLEEV, S. V.; YAROPOLOV, A. I. "Blue" Laccases. **Biochemistry**. v: 72, p: 1136 -1150, 2007.

MORRIS-JONES, R., YOUNGCHIM, S., GOMEZ, B. L., AISEN, P., HAY, R. J., NOSANCHUK, J. D., CASADEVALL, A.; HAMILTON, A. J. Synthesis of melanin-like pigments by *Sporothrix schenckii* in vitro and during mammalian infection. **Infect Immun**. v:71 p:4026-33, 2003.

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

MYERS, E.W.; SUTTON, G.; DELCHER, A.L.; *et al.* A Whole-Genome Assembly of *Drosophila*. **Science**. v: 287, p: 2196, 2000.

NAJAFZADEH, M. J.; GUEIDAN, C.; BADALI, H.; *et al.* Genetic diversity and species delimitation in the opportunistic genus *Fonsecaea*. **Medical Mycology** v. 47: 17–25, 2009.

NAJAFZADEH, M. J.; SUN, J.; VICENTE, V. A.; XI, L.; GERRITS VAN DEN ENDE, A. H. G.; HOOG G. S. DE. *Fonsecaea nubica*, a new species of agent of human chromoblastomycosis revealed using molecular data. **Medical Mycology**. v. 48 (6): 800-6, 2010.

NAJAFZADEH, M. J.; SUN, J.; VICENTE, V. A.; CORNE, H. W.; KLAASSEN BONIFAZ, A., GERRITS VAN DEN ENDE, A. H. G.; STEPH, B. J.; MENKEN, HOOG, G. S. DE. Molecular Epidemiology of *Fonsecaea* species. **EID Journal**. v.17: 3, 2011a.

NAJAFZADEH, M. J.; VICENTE, V. A.; SUN, J.; MEIS, J. F.; HOOG, G. S. *Fonsecaea multimorphosa* sp. nov, a new species of Chaetothyriales isolated from a feline cerebral abscess. **Fungal Biology**. v: 115 p: 1066–1076, 2011b.

NIERMAN, C. W.; EISEN, J. A.; Fleischmann, R. D.; Fraser, C. M. Genome data: what do we learn? **Structural Biol**. v:10 p: 343-348, 2000.

NÓBREGA, J.P.S.; ROSEMBERG, S.; ADAMI, A. M.; HEINS-VACCARI, E.M.; LACAZ, C.S.; BRITO, T. Feohifomicose cerebral ("cromoblastomicose") por *Fonsecaea pedrosoi*: primeiro caso demonstrado por cultura do fungo no Brasil. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**. v: 45 p:4, 2003.

NOSANCHUK J.D.; CASADEVALL, A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. **Cell Microbiol**. v:5 p: 203-223, 2003.

OPINIÃO, A.I.B. **Caracterização cariológica do fungo *Hemileia vastatrix* responsável pela ferrugem alaranjada do cafeeiro.** Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia. Faculdade de Ciências e Tecnologia Nova de Lisboa, 2012.

PANTEU, M.P. & TYPAS, M.A. Electrophoretic karyotype and gene mapping of the vascular wilt fungus *Verticillium dahliae*. **FEMS Microbiology Letters.** v:245 p: 213-220, 2005.

PAULSEN, I.T.; SLIWINSKI, M.K.; SAIER, M.H. Microbial genome analyses: Global comparisons of transport capabilities based on phylogenies, bioenergetics and substrate specificities. **J Mol Biol.** v: 301 p:75–100, 2000.

PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA, M.; KRZYŚCIAK, P.; PIASZCZYŃSKI, M.; CIEŚLIK, S.; JANUSZEWSK, K.; IZDEBSKA-STRASZAK, G.; JARZĄB, J.; HOOG, G.S.; JAGIELSKI, T. Chromoblastomycosis as an endemic disease in temperate Europe: first confirmed case and review of the literature. *Eur. Journal Clin. Microbiol. Infect. Dis.* v: 33 p:391–398, 2014.

PIRO, V.C.; FAORO, H.; WEISS, V.A.; STEFFENS, M.B.R.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; RAITTZ, R.T. FGAP: an automated gap closing tool. **BMC Research Notes.** v:7 p:371, 2014.

POCKLEY, A.G. Disruption of the gene for Hsp30, an alpha-crystallin-related heat shock protein of *Neurospora crassa*, causes defects in import of proteins into mitochondria. **Bio Chem.** v: 380 p: 1231-1236, 2001.

POMA, A., PACIONI, G., RANALLI, R., MIRANDA, M. Ploidy and chromosomal number in *Tuber aestivum*. **FEMS Microbiology Letters.** 167, 101-105, 1998.

POP, M. Genome assembly reborn: recent computational challenges. **Brief Bioinform.** V: 10 p: 354–366, 2009.

PRENAFETA-BOLDÚ, F. X.; SUMMERBELL, R.; SYBREN DE HOOG, G. Fungi growing on aromatic hydrocarbons: biotechnology's unexpected encounter with biohazard? **FEMS Microbiology reviews.** v: 30, p: 109-30, 2006.

QIAO, J., SHAO, M., CHEN, L., WANG, J., WU, G., TIAN, X., LIU, J., HUANG, S., ZHANG, W. Systematic characterization of hypothetical proteins in *synechocystis* sp. pcc 6803 reveals proteins functionally relevant to stress responses. **Gene.** v: 1 p:6-15, 2013.

QUEIROZ-TELLES, F.; GINNIS, M.R.; SALKIN, I.; GRAYBILL, J.R. Subcutaneous mycoses. **Infect Dis Clin North Am.** v:17 p:59–85, 2003.

QUEIROZ-TELLES, F.; ESTERRE, P.; PEREZ-BLANCO, M.; VITALE, R.G.; SALGADO, C.G.; BONIFAZ, A. Chromoblastomycosis: an overview of clinical manifestations, diagnosis and treatment. **Med Mycol**. v:47 p:3-15, 2009.

QUEIROZ-TELLES, F.; ESTERRE, P.; PEREZ-BLANCO, M.; VITALE, R.G.; SALGADO, C.G.; BONIFAZ, A. Chromoblastomycosis: an overview of clinical manifestations, diagnosis and treatment. **Med Mycol** v: 47 p: 3–15, 2011.

QUEIROZ-TELLES, F.; SANTOS, D.W. Challenges in the therapy of chromoblastomycosis. **Mycopathologia**. v: 175 p:477–88, 2013.

QUEIROZ-TELLES, F.; SANTOS, D.W.C.L.; PEDROSO, C. *Diagnosis and Treatment of Fungal Infections*, Infectious Disease, **Springer International Publishing Switzerland**, 2015.

RADOUANE, N.; HALI, F.; KHADIR, K.; SOUSSI, M.; QUAKADI, A.; MAROUANE, S.; ZAMIATI, S.; BENCHIKHI, H. Generalized chromomycosis caused by *Phialophora verrucosa*. **Annales de Dermatologie et de Vénérologie**. v:140 p: 197-201, 2013.

RAPARIA, K.; POWELL, S. Z.; CERNOCH, P.; TAKEI, H. Cerebral mycosis: 7-year retrospective series in a tertiary center. **Neuropathology**. v: 30 p:218-23, 2010.

REISS, E. H.; SHADOMY, H.J.; LYON, M. Mycoses of implantation: fundamental medical mycology. **Hoboken: Wiley-Blackwell**. p:475, 2012.

REVANKAR, G. S.; PATTERSON, J. E.; SUTTON, D. A. Disseminated phaeohyphomycosis: review of an emerging mycosis. **Clinical Infectious Diseases**. v: 34, p: 467-476, 2002.

RIBEIRO, T.S.; SOMENZI, C.C.; MENEZES, A. Características Particulares da Micologia Clínica e o Diagnóstico Laboratorial de Micoses Superficiais. **NewsLab**, 2006.

ROSSETTO, A.L.; DELLATORRE, G.; PÉRSIO, R.A.; ROMEIRO, J.C.M.; CRUZ, R.C.B. Feo-hifomicose subcutânea por *Exophiala jeanselmei* localizada na bolsa escrotal - relato de caso. **An. Bras. Dermatol**. v:85, 2010.

ROTHERBERG, J.M.; HINZ, W.; REARICK, T.M.; SHULTZ, J.; MILESKI, W. *et al*. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. **Nature**. v: 475 p: 48-352, 2011.

RUDOLPH M. Über die brasilianische “Figueira” Vorläufige Mitteilung. **Archiv Schiffs und Tropen-Hyg**. v:18 p:498–9, 1914

SALGADO, C. G.; DA SILVA, J. P.; DINIZ, J. A.; DA SILVA, M. B.; DA COSTA, P.F.; TEIXEIRA, C.; SALGADO, U. I. 2004. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from thorns of *Mimosa pudica*, a probable natural source of

chromoblastomycosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v: 46 p: 33–36, 2004.

SAMPAIO, S.A.P. ; RIVITTI, E. Manual de dermatologia clínica. **Artes Médicas**, v: 1 p: 347-377, 2014.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors (DNA polymerase/nucleotide sequences/bacteriophage 4X174). **Biochemistry**. v: 74 p: 5463-5467, 1977.

SATOW, M. M. **Avaliação do método de Iwatsu et al., (1981) para isolamento de leveduras negras do solo, degradadoras de hidrocarbonetos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, São Paulo, 2008.

SCHATZ, M. C.; DELCHER, A. L.; SALZBERG, S. L. Assembly of large genomes using second-generation sequencing. **Genome Res**. v: 20 p: 1165–1173, 2010.

SCHWARTZ, D.C.; CANTOR, C.R. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. **Cell Press**. v: 37 p: 67-75, 1984.

SCHIEFFELIN, J.S.; GARCIA-DIAZ, J.B.; LOSS Jr., G.E.; BECKMAN, E.N.; KELLER, R.A.; STAFFELD-COIT, C.; GRACES, J.C.; PANKEY, G.A. Phaeohyphomycosis fungal infections in solid organ transplant recipients: clinical presentation, pathology, and treatment. **Transplant Infectious Disease**. v: 16, p: 270–278, 2014.

SCHMIDT, A.J. Estudo da dinâmica populacional do caranguejo-uçá, Ucides cordatus (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Decapoda, Brachyura), e dos efeitos de uma mortalidade em massa desta espécie em manguezais do Sul da Bahia. PhD thesis, Universidade de São Paulo, 2006.

SCHUSTER, S. C. Next-generation sequencing transforms today's biology. **Nature Methods**. v:5 p:16-18, 2008.

SEYEDMOUSAVI, S.; NETEA, M.G.; MOUTON, J.W.; MELCHERS, W.J.G.; VERWEIJ, P.E.; HOGG, G.S. Black yeasts and their filamentous relatives: principles of pathogenesis and host defense. **Clinical Microbiology Reviews** v: 27 p: 527–542, 2014.

SHENDURE, J.; JI, H. Next-generation DNA sequencing. **Nat Biotechnol**. v: 26 p: 1135–1145, 2008.

SHIRANE, N.; YOSHIHACHI, W. Comparison of infection process of Botrytis cinerea on cucumber cotyledon and strawberry petal. **Ann. Phytopath. Soc. Japan** v: 51 p: 501-505, 1988.

SILVA, J.P.; DE SOUZA, W.; ROZENTAL, S. Chromoblastomycosis: a retrospective study of 325 cases on Amazonic Region (Brazil).

Mycopathologia. v: 143 p:171–5, 1999.

SLESAK, G.; INTHALAND, S.; STROBEL, M.; MARSCHAL, M.; HALL, J.R.M.; NEWTON, P.N. Chromoblastomycosis after a leech bite complicated by myiasis: a case report. **BMC Infectious Diseases**. v: 11 p:14, 2011.

STEIN, L. Genome annotation: from sequence to biology. **Nature reviews Genetics**. v: 2 p:493-503, 2001.

STERFLINGER, K. Black Yeasts and Meristematic Fungi: Ecology, Diversity and Identification. In: ROSA, C. e PETER, G. (Org.). **Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts**. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. p: 501-514, 2006.

STERFLINGER, K.; LOPADIC, K.; BIASI, B.; POYNTER, C.; HOOG, S.; TAFER, H. Draft genome of *Cladophialophora immunda*, a black yeast and efficient degrader of polyaromatic hydrocarbons. **Genome Announcements**. v: 3 p: 1, 2014.

SUN, J.; NAJAFZADEH, M. J.; ENDE, A. H. G. G. VAN DEN; *et al.* Molecular characterization of pathogenic members of the genus *Fonsecaea* using multilocus analysis. **Mycosis**. v: 7 p: 1–10, 2012.

SURASH, S.; TYAGI, A.; HOOG, G.S.; ZENG, J-S.; BARTON, R.C.; HOBSON, R.P.

Cerebral phaeohyphomycosis caused by *Fonsecaea monophora*. **Medical Mycology**., v: 43 p: 465-/472, 2005.

TAGA, M.; MEHABI, R.; KEMA, G. H. J..Electrophoretic and cytological karyotyping of the foliar wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* reveals many chromosomes with a large size range. **Mycologia**. v. 99(6), p. 868–876, 2007.

TAKEI, H.; GOODMAN, J.C.; POWELL, S.Z. Cerebral phaeohyphomycosis caused by *Cladophialophora bantiana* and *Fonsecaea monophora*: report of three cases. **Clinical Neuropathology**. v: 26 p:21-27, 2007.

TRIRACH, S.; COOPER, C.R.J.; VANITTANAKOM; N. Molecular analysis of the *Penicillium marneffe* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding gene (*gpdA*) and differential expression of *gpdA* and the isocitrate lyase-encoding gene (*acuD*) upon internalization by murine macrophages. **J Med Microbiol**. v: 57 p:1322-1328, 2008.

TSUCHIYA, D. & TAGA, M. Cytological Karyotyping of Three *Cochliobolus* spp by the Germ Tube Burst Method. **Phytopathology**. v. 91, 354-360, 2001.

TSUCHIYA, D.; KOGA, H.; TAGA, M. Scanning electron microscopy of mitotic nuclei and chromosomes in filamentous fungi. **Mycologia**. v: 96, p: 208-210, 2004.

ÚRAN, M.E.; CANO, L.E. Melanina: implicaciones en la patogénesis de algunas enfermedades y su capacidad de evadir la respuesta inmune del hospedero. **Infect**. v: 12, 2008.

VANLERBERGHE, G.C.; McINTOSH, L. Alternative oxidase. **Annu Ver Plant Physiol Plant Mol Biol**. v: 48 p:703-734, 1997.

VARGHESE, P.; JALAL, M.J.A.; AHMAD, S.; KHAN, Z.; JOHNY, M.; MAHADEVAN, P.; JOSEPH, L.; CHANDY, R.; PAUL, S. Cerebral phaeohyphomycosis caused by *Fonsecaea monopora*: first report from India. **International Journal of Surgery and Medicine**. 2015.

VEREECKE, D.; CORNELIS, K.; TEMMERMAN, W.; JAZIRI, M.; VAN MONTAGU, M.; HOLSTERS, M.; GOETHALS, K. Chromosomal locus that affects pathogenicity of *Rhodococcus fascians*. **J Bacteriol**. v: 184 p:1112–1120, 2002.

VIALLE, R.A. **SILA - Um sistema para anotação automática de genomas utilizando técnicas independentes de alinhamento**. Dissertação (Mestrado em Ciências- Bioquímica) - Programa de Pós-Graduação em Boinformática. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 2013.

VICENTE, V. A. **Isolamento e caracterização de fungos da cromoblastomicose**. Tese (doutorado em Agronomia, Área de concentração: Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”, Universidade de São Paulo, 181 p., 2000.

VICENTE, V. A.; ATTILI-ANGELIS, D.; PIE, M. R.; QUEIROZ-TELLES, F.; CRUZ, L. M.; NAJAFZADEH, M. J.; HOOG, G. S.; ZHAO, J. S.; PIZZIRANI-KLEINER, A. Environmental isolation of black yeast-like fungi involved in human infection. **Studies in Mycology**.v. 61, p.137–144, 2008.

VICENTE, V. A.; ORÉLIS-RIBEIRO, R.; NAJAFZADEH, J.; SUN, J.; SCHIER GUERRA, R.; MIESCH, S.; OSTRENSKY, A.; MEIS, J.; CORNÉ, K.; HOOG, G. S. DE; BOEGER, W.. Black yeast-like fungi associated with Lethargic Crab Disease (LCD) in the mangrove-land crab, *Ucides cordatus* (Ocypodidae). **Veterinary Microbiology**. v. 158(1-2), p.109-22, 2012.

VICENTE, V. A.; NAJAFZADEH, MOHAMMAD JAVAD; SUN, JIUFENG; GOMES, R. R.; ROBL, D.; PEDROSO, C.; MARQUES, S.; HOOG, S. G. DE. Environmental siblings of black agents of human chromoblastomycosis. **Fungal Diversity**. v. 62, p. 1-17, 2014.

- WEISS, V.A. **Estratégias de finalização da montagem do genoma da bactéria diazotrófica endofítica *Herbaspirillum seropedicae* SmR1.** Dissertação (Mestrado em Ciências- Bioquímica) - Programa de Pós-Graduação em Ciências- Bioquímica. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 2010.
- WEISS, V.A. **Montagem, anotação e análise comparativa do genoma da bactéria *Herbaspirillum lusitanum* p6-12.** Tese (Doutorado em Ciências- Bioquímica) - Programa de Pós-Graduação em Ciências- Bioquímica. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 2014.
- WESTWATER, C.; BALISH, E.; SCHOFIELD, D.A. *Candida albicans*-conditioned medium protects yeast cells from oxidative stress: a possible link between quorum sensing and oxidative stress resistance. **Eukaryot Cell.** v: 4 p:1654-1661, 2005.
- WIELOCH, W. Chromosome visualization in filamentous fungi. **Journal of Microbiological Methods.** v: 67 p: 1-8, 2006.
- WODICKA, L.; DONG, H.; MITTMANN, M.; HO, M.H.; LOCKHART, D.J. Genome-wide expression monitoring in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nature Biotechnology.** v: 15 p: 1359- 1367, 1997.
- XIE, Z.; FENG, P.; ZHANG, J.; LI, X.; SUN, J.; LU, C.; HUANG, H.; XI, L. Molecular cloning, characterization and differential expression of **Cdc42** in *Fonsecaea monophora*. **Molecular Biology Reports.** v: 39 p: 839-844, 2012.
- ZENG, J.S.; HOOG, G.S. *Exophiala spinifera* and its allies: diagnostics from morphology to DNA barcoding. **Medical Mycology.** v: 46, p: 193-208, 2008.
- ZERBINO, D. R.; BIRNEY, E. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. **Genome research.** v:18 p: 821-829, 2008.
- ZHANG, J.; XI, L.; LU, C.; XIE, T.; ZHANG, H.; XIE, Z.; HOGG, G.S. Successful treatment for chromoblastomycosis caused by *Fonsecaea monophora*: a report of three cases in Guangdong, China. **Mycoses.** v: 52 p: 176–181, 2008.
- ZHI, X.; FENG, P.; ZHANG, J.; LI, X.; SUN, J.; LU, C.; HUANG, H.; XI, L. Molecular cloning, characterization and differential expression of Cdc42 in *Fonsecaea monophora*. **Molecular Biology Reports.** v. 39 p. 839–844, 2012.
- ZHONG, S.; STEFFENSON, B.J; MARTINEZ, J.P.; CIUFFETTI, L.M. A molecular genetic map and electrophoretic karyotype of the plant pathogenic fungus *Cochliobolus sativus*. **Molecular Plant-Microbe Interactions.** v:15 p: 481-492, 2002.
- ZUCCARO, A., BASIEWICZ, M., ZURAWSKA, M., BIEDENKOPF, D., KOGEL, K. Karyotype analysis, genome organization, and stable genetic transformation

of the root colonizing fungus *Piriformospora indica*. **Fungal Genetics and Biology**. v: 46 p: 543-550, 2009.

ANEXO I – MEIOS DE CULTURAS E SOLUÇÕES

Meio Ágar Sabouraud Dextrosado

Dextrose - 40g

Peptona - 10g

Agar - 15g

Água destilada – 1.000mL

Tampão CTAB

Tris-base - 2,42g

Cloreto de sódio - 8,2g

EDTA - 2,0g

Água destilada - 8,0mL

CIA - Clorofórmio Álcool isoamílico

Clorofórmio - 96mL

Álcool isoamílico - 4mL

Brometo de etídio

O brometo de etídio 1,0% (p/v) foi dissolvido em água destilada, agitando-se por 2 horas. A solução foi estocada a temperatura ambiente. Para a revelação, foram diluídos em 3 μ L em água destilada.

Meio Líquido Sabouraud

Dextrose - 40g

Peptona - 10g

Água destilada – 1.000mL

Solução salina 0,85%

Cloreto de sódio – 8,5g

Água destilada – 1.000mL

Solução de lise

EDTA – 0,5M

Tris HCl – 10mM

n-lauroylsarcosinate – 1%

Autoclavar a solução e manter a 4°C. Adicionar proteinase K (1mg/mL) quando for utilizar.

Solução GMB

EDTA - 0,125M

Sorbitol – 0,9M

Aquecer em banho-maria a 98°C por 15 minutos e armazenar a 4°C.

EDTA 50 mM

Dissolver 18,6 g em 100 ml de água destilada.

Ajustar o pH se necessário (pH 8,0).

Guardar a solução à temperatura ambiente.

Tampão TBE 0,5x

Tris-base - 54,0g

Ácido bórico - 27,5g

EDTA - 20 mL

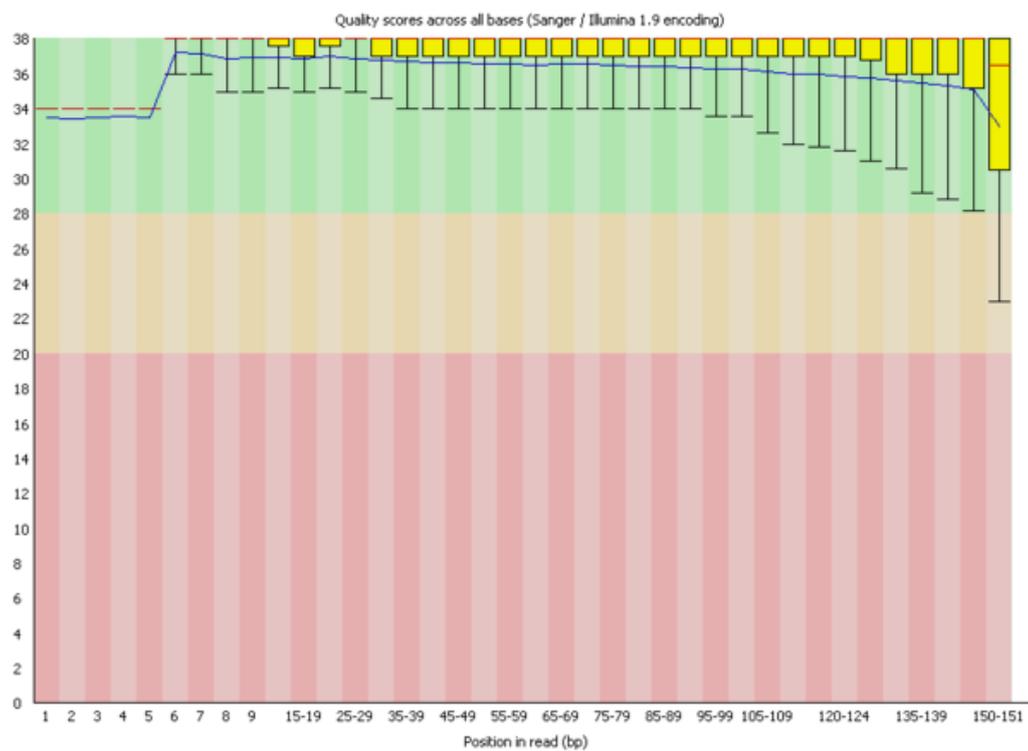
Os sais foram dissolvidos em 800mL de água mili-Q. Completou-se o volume para 1000mL.

ANEXO II – ANÁLISE DOS CONJUNTOS DE DADOS OBTIDOS DOS SEQUENCIAMENTOS EM SOFTWARE FASTQC

Basic Statistics

Measure	Value
Filename	Fungo-1Amanda_S10_L001_R1_001.fastq.gz
File type	Conventional base calls
Encoding	Sanger / Illumina 1.9
Total Sequences	2211384
Sequences flagged as poor quality	0
Sequence length	35-151
%GC	52

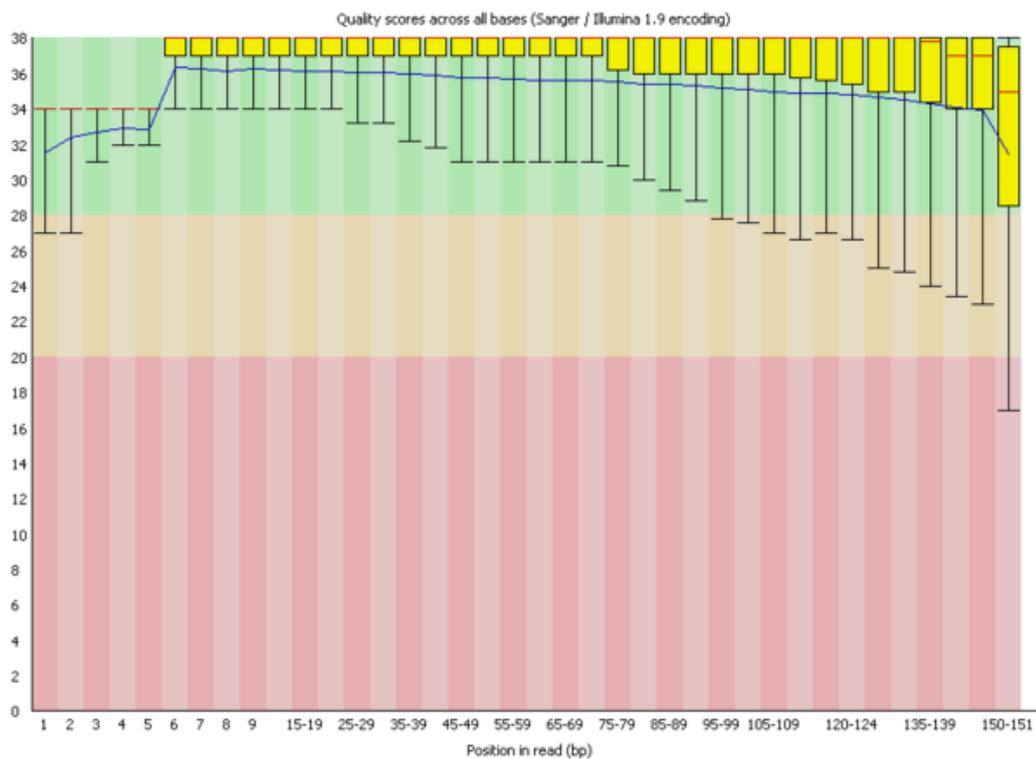
Per base sequence quality



✓ Basic Statistics

Measure	Value
Filename	Fungo-1Amanda_S10_L001_R2_001.fastq.gz
File type	Conventional base calls
Encoding	Sanger / Illumina 1.9
Total Sequences	2211384
Sequences flagged as poor quality	0
Sequence length	35-151
%GC	52

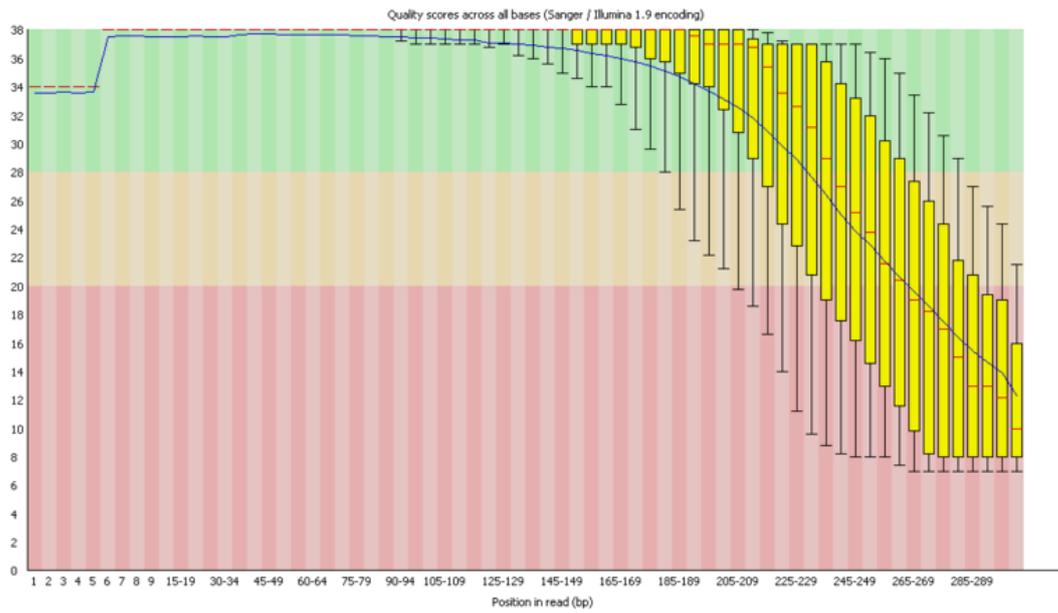
Per base sequence quality



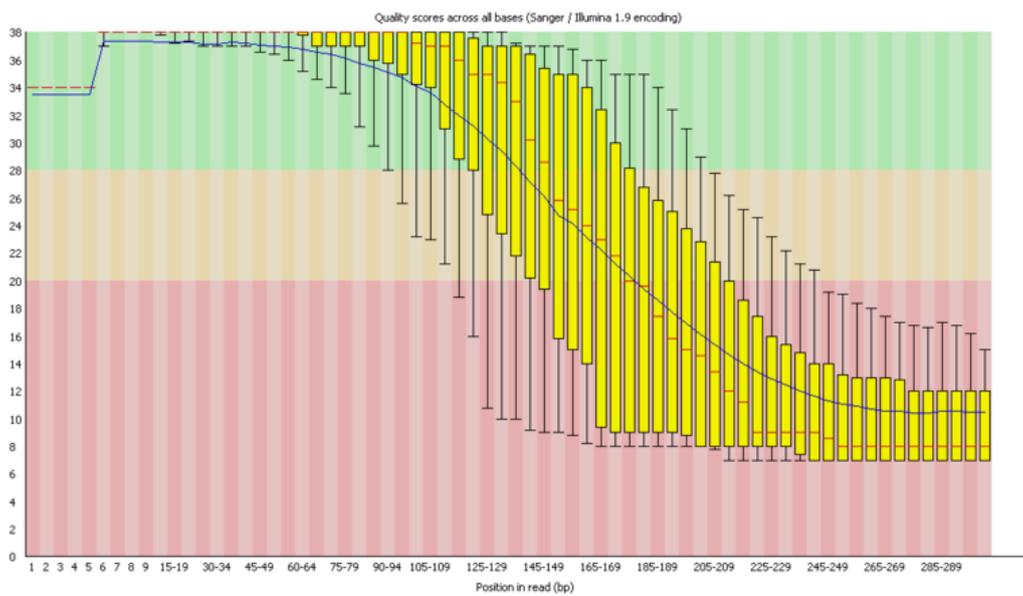
✓ Basic Statistics

Measure	Value
Filename	Fmonophora_S11_L001_R1_001.fastq.gz
File type	Conventional base calls
Encoding	Sanger / Illumina 1.9
Total Sequences	945132
Sequences flagged as poor quality	0
Sequence length	35-301
%GC	45

Per base sequence quality



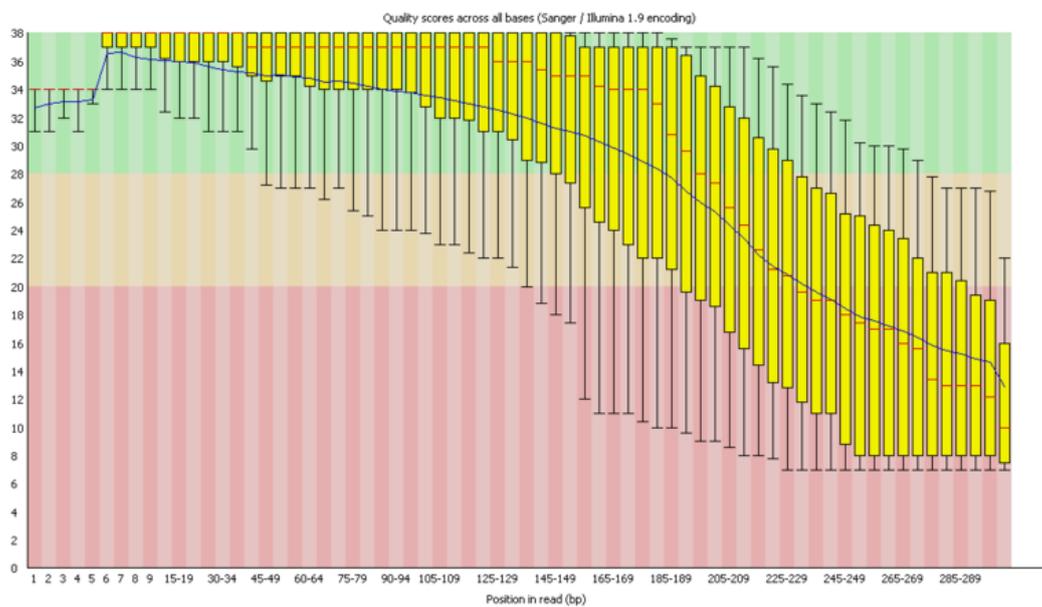
Per base sequence quality



✓ Basic Statistics

Measure	Value
Filename	F MONO_S4_L001_R1_001.fastq.gz
File type	Conventional base calls
Encoding	Sanger / Illumina 1.9
Total Sequences	1617744
Sequences flagged as poor quality	0
Sequence length	35-301
%GC	52

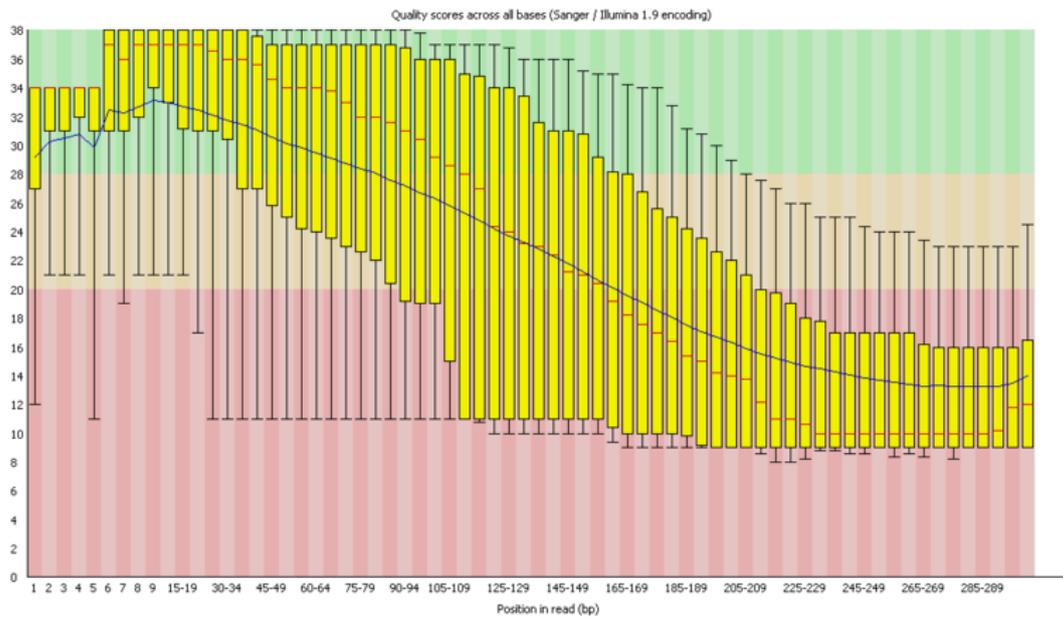
📊 Per base sequence quality



✓ Basic Statistics

Measure	Value
Filename	F MONO_S4_L001_R2_001.fastq.gz
File type	Conventional base calls
Encoding	Sanger / Illumina 1.9
Total Sequences	1617744
Sequences flagged as poor quality	0
Sequence length	35-301
%GC	54

Per base sequence quality



Basic Statistics

Measure	Value
Filename	IonXpress_002_R_2015_07_14_14_36_50_user_Bioquimica-68-Ion_NFN_run_60_genomas_14072015_Auto_user_Bioquimica-68-Ion_NFN_run_60_genomas_14072015_111.fastq
File type	Conventional base calls
Encoding	Sanger / Illumina 1.9
Total Sequences	19396784
Sequences flagged as poor quality	0
Sequence length	25-373
%GC	51

Per base sequence quality

