

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GIOVANNA ZUZARTE CANDIDO

Fonsecaea pugnacius: ECOLOGIA, AGROTRANSFORMAÇÃO E POTENCIAL DE
VIRULÊNCIA

CURITIBA

2019

GIOVANNA ZUZARTE CANDIDO

Fonsecaea pugnacius: ECOLOGIA, AGROTRANSFORMAÇÃO E POTENCIAL DE
VIRULÊNCIA

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador (a): Prof. (a). Dr(a). Vânia Aparecida Vicente

Coorientador(a): Prof(a). Dr(a). Renata Rodrigues Gomes

Colaborador(a): Dr(a). Juliana Degenhardt-Goldbach

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Dulce Maria Bieniara – CRB/9-931)

Candido, Giovanna Zuzarte

Fonsecaea pugnacius: ecologia, agrot transformação e potencial de virulência. / Giovanna Zuzarte Candido. – Curitiba, 2019.

78 p.: il.

Orientadora: Vânia Aparecida Vicente

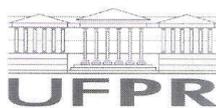
Coorientadora: Renata Rodrigues Gomes

Colaboradora: Juliana Degenhardt-Goldbach

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

1. Micoses 2. Infecção 3. Cromoblastomicose I. Título II. Vicente, Vânia Aparecida III. Gomes, Renata Rodrigues IV. Degenhardt-Goldbach, Juliana V. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 589.2



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MICROBIOLOGIA,
PARASITOLOGIA E PATOLOGIA - 40001016044P0

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de GIOVANNA ZUZARTE CANDIDO intitulada: *Fonsecaea pugnacius*: Ecologia, Agrotransformação e Potencial de Virulência, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 15 de Abril de 2019.


VANIA APARECIDA VICENTE

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


JOSIANE APARECIDA GOMES FIGUEIREDO

Avaliador Externo (UNESPAR)


JULIANA DEGENHARDT GOLDBACH

Avaliador Externo (EMBRAPA)

A minha mãe e meu pai.

Aos meus avôs: Marcelina, Cantalício (*in memoriam*), Joaquim e Anita

Aos amigos

A Deus.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me abençoado com força e conhecimento para chegar até aqui;

Aos meus pais (Denise e Franscisco) por serem meu porto seguro, minha motivação e espelho; por me ajudarem a seguir com os meus sonhos mesmo que enormes;

À minha família, especialmente meus avôs e minha tia Sandra, pelo amor, carinho e companherismos que me proporcionaram;

À Prof. Dr. Vânia Aparecida Vicente, pela sua orientação, tempo, incentivo e carinho;

À Dr. Juliana Degenhardt-Goldbach, que concedeu apoio antes mesmo de entrar no mestrado, me mostrando como a pesquisa com vegetais é difícil, mas recompensadora, afinal são organismos lindos;

Ao pesquisador Douglas Steinmacher da Vivetech Agrociências, Dr. Leonardo Ferreira Dutra e Msc. Marisa Taniguchi Satro, pelo suporte científico, envio de amostras e troca de conhecimentos realizados, foi um prazer trabalhar com vocês;

Ao RECA, Vivetech, EMBRAPA Florestas e EMBRAPA Clima Temperado pelo apoio físico e financeiro;

Aos meus amigos do Laboratório de Cultura Vegetal na EMBRAPA, principalmente a Janaína e a Laudiane, sem o apoio e ajuda de vocês eu não conseguiria cuidar das plantinhas e de todo o resto;

Aos meus amigos do LabMicro, Isabela, Jason, Isabelle, Amanda, Jade, Sofia, Gabriela, Kassiely e Andressa, por toda amizade, risadas, carinho, companheirismo experiência e união, mas especialmente a Flavia, Morgana e Bruna, marcaram a minha vida! Nunca me esquecerei de nenhuma palavra e de todo o suporte que vocês me deram ao longo desses dois anos;

Aos meus amigos de mestrado, que lutaram ao meu lado e sabem o quanto é difícil: Lucas Bochnia Bueno e Bruno Batista Bortoluzzi;

Aos meus amigos Lúgia, Gabriel, Leonardo e Isabelle, vocês são meus pilares de apoio, sem vocês eu não teria chegado até aqui

Aos professores da UFPR e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia

À CAPES pelo apoio financeiro.

*“Mudam-se os tempos, mudam-se as vontades, muda-se o ser, muda-se a
confiança; Todo o mundo é composto de mudança, tomando sempre novas
qualidades.”*

Luíz Vaz de Camões

RESUMO

A cromoblastomicose é definida como uma micose de implantação, no qual o agente causal encontra-se no ambiente e se implanta no tecido subcutâneo do hospedeiro através de um trauma normalmente causado por espinhos de plantas vivas, inoculando nos tecidos do hospedeiro estruturas vegetativas e reprodutivas do fungo que irão se transformar em células septadas e pigmentadas, conhecidas como células muriformes, consideradas a forma parasitária da doença. Embora os dados epidemiológicos comprovem a fonte de infecção ambiental da doença, os aspectos associados a ecologia e virulência destes agentes ainda não estão totalmente elucidados, sendo necessário o estabelecimento de modelos biológicos adequados para o melhor entendimento dos mecanismos de virulência envolvidos na evolução clínica desta doença. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo realizar transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* de *Fonsecaea pugnacius*, um dos agentes causais da cromoblastomicose, visando obter uma linhagem de origem clínica marcada molecularmente para estudos do potencial de virulência e mecanismos de infecção. A linhagem transformada foi aplicada em modelos de estudo da relação parasita/hospedeiro e da mesma forma utilizada para investigar os mecanismos relacionados à rota de infecção. Um total de 43 transformantes com o plasmídeo controle (*pAD1625*) e 3 com o plasmídeo contendo o gene de fluorescência (*DsRed*) foram obtidos (*pCAMDsRed*). Os mutantes obtidos por meio de transformação mostraram-se estáveis, porém não fluorescentes. Entretanto, a transformação foi confirmada por PCR primer-específico. Dois organismos com cada plasmídeo foram selecionados aleatoriamente inoculados nos três espécimes vegetais selecionados como hospedeiros para os testes *in vitro* (*Bactris gasipaes*, *Butia odorata* e *Mimosa pudica*). Amostras de plantas contaminadas e da solução fúngica contendo 10^7 cels/mL da linhagem transformada de *F. pugnacius* foram inoculadas via lesão traumática em camundongo BALB/c. De acordo com os resultados iniciais foi possível visualizar sinais de inflamação nos animais inoculados com espinhos contaminados, nos quais foi possível observar estruturas fúngicas vegetativas no local da lesão traumática. Tais resultados indicam a capacidade de infecção via inoculação traumática e um possível caminho para demonstração da rota de infecção de *F. pugnacius*. Além disso, este estudo confirmou o potencial de infecção e a habilidade de sobrevivência deste agente em tecidos vegetais. No entanto, variações deste modelo e comparações com outras espécies são imprescindíveis para a elucidação dos mecanismos de infecção da espécie em questão.

Palavras-chave: *Fonsecaea pugnacius*, micose de implantação, rota de infecção, modelos de infecção, cromoblastomicose.

ABSTRACT

Chromoblastomycosis is an implantation mycosis, wherein the etiological agent present in environmental material is inoculated in the subcutaneous tissue of the host through a trauma, usually with plant spines, inoculating fungal vegetative and reproductive structures into host tissues. Fungal structures in host tissue can become septate and pigmented cells, known as muriform cells that are considered the parasitic form of the disease. Although epidemiological data show the environmental origin of the disease, the ecology and virulence of the agents have not been fully elucidated. Therefore, the establishment of biological models is essential for this elucidation. In this context, the objective of this work was use the Agrobacterium mediated transformation (ATMT) of the *Fonsecaea pugnacius*, one of the agents of the disease, in order to obtain a clinical strain molecularly marked. The transformants was applied in animal models to investigate the mechanisms of infection and virulence. A total of 43 transformants with the control plasmid (pAD1625) and 3 with the plasmid containing the fluorescence gene (DsRed) were obtained (pCAMDsRed). Moreover, the mutants obtained were not fluorescent, they were stable and the ATMT was confirmed by primer-specific PCR. A random selection of two (n=2) transformtants expressing gene markes of each plasmid was performed and these were inoculated into three plant *Bactris gasipaes*, *Butia odorata* and *Mimosa pudica* cultured *in vitro*. Samples of infected plants and as well the fungal solution containing 10^7 cels/mL of the mutant strain of *F. pugnacius* were inoculated by traumatic lesion in animal model BALB/c mice. Inflammatory signs were present only when the animal tissue was inoculated with contaminated spines, being observed vegetative fungal structures at the site of the inoculation. Such results indicate the capacity of infection by traumatic inoculation and represent a possible demonstration of *F. pugnacius* infection pathway. In addition, this study confirmed the infection potential and the survival ability of this agent in plant tissues. However, variations of the models used and comparison with other species are required in order to elucidate the mechanisms of infection.

Key words: *Fonsecaea pugnacius*, implantation mycosis, route of infection, infection models, chromoblastomycosis.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - IMAGENS DE LESÕES CAUSADAS NA PATA DE CAMUNDONGOS BALB/C POR <i>F. pedrosoi</i>	22
FIGURA 2 - IMAGENS DE LESÕES PROVENIENTES DA CROMOBLASTOMICOSE E AS CÉLULAS MURIFORMES	23
FIGURA 3 - IMAGENS DE LESÕES PROVENIENTES DA CROMOBLASTOMICOSE	24
FIGURA 4 - CORTES HISTOLÓGICOS DE LESÕES DE CROMOBLASTOMICOSE COM PARTES VEGETAIS EM SEU INTERIOR.....	31
FIGURA 5 - ASPECTOS DAS ESTRUTURAS VEGETATIVAS E REPRODUTIVAS DA <i>Mimosa pudica</i> L. (DORMIDEIRA).....	32
FIGURA 6 - ASPECTOS DAS ESTRUTURAS VEGETATIVAS E REPRODUTIVAS DA PALMEIRA <i>Bactris gasipaes</i> Kunth (PUPUNHA).....	34
FIGURA 7 - ASPECTOS DAS ESTRUTURAS VEGETATIVAS E REPRODUTIVAS DA PALMEIRA <i>Astrocaryum aculeatum</i> MEYER (TUCUMÃ)	35
FIGURA 8 – ASPECTOS DAS ESTRUTURAS VEGETATIVAS E REPRODUTIVAS DA PALMEIRA <i>Butia odorata</i> Barb. Rodr. (BUTIÁ).....	36
FIGURA 9 - ILUSTRAÇÃO SIMPLIFICADA DA TRANSFERÊNCIA DO T-DNA PARA AS CÉLULAS ALVO.....	38
FIGURA 10 - ESQUEMA DE TRANSFERÊNCIA DE DNA DA <i>A. TUMEFACIENS</i> PARA O FUNGO.....	39
FIGURA 11 - ESQUEMA DA AGROTRANSFORMAÇÃO	40
FIGURA 12 - MAPA GENÉTICO DO PLASMÍDEO <i>pCAMDsRed</i>	42
FIGURA 13 - FLUXOGRAMA DE TRABALHO PARA A AGROTRANSFORMAÇÃO	44
FIGURA 14 - TESTE DE SENSIBILIDADE À HIGROMICINA COM <i>F. pugnacius</i>	53
FIGURA 15 - PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO DO DNA TOTAL DAS CÉLULAS TRANSFORMADAS.....	55
FIGURA 16 – ASPECTOS DA PALMEIRA <i>Butia odorata</i> INTRODUZIDA <i>IN VITRO</i>	57
FIGURA 17 - ASPECTOS DA PALMEIRA <i>Bactris gasipaes</i> INTRODUZIDA <i>IN VITRO</i>	58
FIGURA 18 – ASPECTOS DA PLANTA <i>Mimosa pudica</i> INTRODUZIDA <i>IN VITRO</i> .	59

FIGURA 19 – MODELOS DE INFECÇÃO DE <i>F. pugnacius</i> EM TECIDOS VEGETAIS	61
FIGURA 20 - VIZUALIZAÇÃO DA BIOPSIA DO CAMUNDONGO BALB/c.....	63

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - GRUPOS EXPERIMENTAIS DO TESTE DE INFECÇÃO NO MODELO ANIMAL CAMUNDONGOS BALB/c	51
--	----

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - PERFIL DE SENSIBILIDADE DA LINHAGEM 139214 DE <i>Fonseacea pugnacius</i> À HIGROMICINA	52
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 OBJETIVOS	19
1.1.1 Objetivo geral	19
1.1.2 Objetivos específicos.....	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 CROMOBLASTOMICOSE	20
2.2 LEVEDURAS NEGRAS.....	25
2.2.1 FATORES DE VIRULÊNCIA.....	26
2.3 GÊNERO <i>FONSECAEA</i>	28
2.4 ESPÉCIMES VEGETAIS.....	29
2.4.1 <i>Mimosa pudica</i> (DORMIDEIRA).....	31
2.4.2 ESPÉCIES DE PALMEIRAS	33
2.5 TRANSFORMAÇÃO EM FUNGOS	36
2.5.1 TRANSFORMAÇÃO MEDIADA POR <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (TMAT OU AGROTRANSFORMAÇÃO).....	37
3 MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO	43
3.2 AGROTRANSFORMAÇÃO DE <i>Fonsecaea pugnacius</i>	43
3.2.1 TESTE DE SENSIBILIDADE À HIGROMICINA	44
3.2.2 PRODUÇÃO DO INÓCULO E CRESCIMENTO DA <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	45
3.2.3 CO-CULTIVO ENTRE AS LINHAGENS FÚNGICAS E DE <i>A. tumefaciens</i>	45
3.2.4 SELEÇÃO DOS FUNGOS AGROTRANSFORMADOS	46
3.2.5 TESTE DE FLUORESCÊNCIA DAS LINHAGENS TRANSFORMADAS	46
3.2.6 ESTABILIDADE MITÓTICA DAS LINHAGENS TRANSFORMADAS	46
3.2.7 ANÁLISE DAS LINHAGENS TRANSFORMADAS	47
3.3 CULTIVO <i>in vitro</i> DOS ESPÉCIMES VEGETAIS.....	48
3.3.1 CULTIVO <i>in vitro</i> DA PLANTA <i>Mimosa pudica</i>	48
3.3.2 CULTIVO <i>in vitro</i> DAS PALMEIRAS: <i>Astrocaryum aculeatum</i> (TUCUMÃ), <i>Bactris gasipaes</i> (PUPUNHA) E <i>Butia odorata</i> (BUTIÁ).....	49
3.4 TESTES DE INFECÇÃO EM TECIDO VEGETAL.....	49
3.5 TESTES DE INFECÇÃO EM HOSPEDEIROS ANIMAIS.....	50

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1 AGROTRANSFORMAÇÃO DE <i>F. pugnacius</i> COM O GENE DE FLUORESCÊNCIA <i>DsRed</i>	52
4.2 TESTES DE VIRULÊNCIA EM PLANTAS, UTILIZANDO COMO HOSPEDEIROS <i>Mimosa pudica</i> E AS ESPÉCIES DE PALMEIRAS PUPUNHA (<i>Bactris gasipaes</i>) E BUTIÁ (<i>Butia odorata</i>)	56
4.3 TESTES DE INFECÇÃO EM HOSPEDEIROS ANIMAIS	62
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
6 ARTIGOS SUBMETIDOS	66
REFERÊNCIAS	67
APÊNDICE	77

1 INTRODUÇÃO

As leveduras negras são microrganismos extremamente relevantes do ponto de vista ecológico e clínico. Estes agentes têm a capacidade de viver em ambientes oligotróficos onde os sapróbios comuns não sobrevivem, e ainda, apresentam um ciclo de vida composto, com potencial de patogenicidade, o que justifica a baixa ocorrência ambiental e a alta capacidade de infectar animais (SATOW et al, 2008; VICENTE et al, 2013). O potencial de infecção destes parece ser polifilético e conseqüentemente diferente entre as espécies (VICENTE et al, 2013; NAJAFZADEH, M. J *et al.* 2011a; NAJAFZADEH et al., 2011b; NAJAFZADEH et al., 2010a; DE HOOG et al, 1993; 1998; BADALI et al., 2008). Estes agentes estão associados a diversas doenças, as quais são reconhecidamente causadas por poucas espécies morfológicamente semelhantes à sua contraparte ambiental, que em muitos casos representam espécies que ainda não foram descritas (VICENTE et al., 2001).

As leveduras negras que potencialmente causam infecção em hospedeiros animais pertencem à ordem *Chaetothyriales* (DE HOOG; MCGINNIS, 1987), que reúne, por exemplo, os causadores de doenças como a Cromoblastomicose (CBM) e a Feohifomicose (QUEIROZ-TELLES et al., 2017). A feohimicose é caracterizada pela formação de hifas ou estruturas de reprodução do fungo no tecido do hospedeiro, podendo se estabelecer na forma cutânea, subcutânea ou disseminada e é especialmente comum em pacientes imunodeprimidos (AHMED et al, 2015).

A cromoblastomicose é uma micose de implantação, frequentemente causada através de traumas associados à material de origem vegetal, em que ocorre a hiperproliferação fúngica no tecido hospedeiro por meio da formação de células muriformes, caracterizadas por uma estrutura septada de forma transversal ou longitudinal, consideradas uma forma de adaptação parasitária e, portanto, assumida como um dos importantes mecanismos de defesa do agente frente à resposta imunológica do hospedeiro (QUEIROZ-TELLES et al, 2017). Os agentes causais da doença são leveduras negras da ordem *Chaetothyriales*, principalmente dos gêneros: *Cladophialophora*, *Exophiala*, *Fonsecaea*,

Phialophora e *Rhinocladiella* reunidos na família Herpotrichiellaceae (AZEVEDO, et al 2015; QUEIROZ-TELLES et al, 2015; VICENTE et al, 2013).

As espécies mais prevalentes pertencem aos gêneros *Cladophialophora* e *Fonsecaea*, distribuídos nas clades filogenéticas *carrionii* e *bantiana*. Na clade *carrionii* destaca-se a espécie *C. carrionii*, que apresenta uma grande distribuição na América Central (GONZALES et al, 2013), cuja infecção está associada ao trauma com espinhos de cactos (*Stenocereus* sp.). Estudos de isolamento demonstraram que isolados obtidos desta planta eram morfológicamente similares a *C. carrionii*, porém molecularmente se caracterizava por uma espécie diferente, a *C. yegresii*, a qual era capaz de formar estruturas similares aos corpos muriformes em plantas, da mesma forma que a espécie clínica se adapta ao tecido animal (GONZALES et al, 2013; QUEIROZ-TELES et al, 2017; VICENTE et al, 2013).

A clade *bantiana* reúne espécies do gênero *Cladophialophora* e *Fonsecaea*, incluindo espécies associadas a uma diversidade de quadros clínicos decorrentes de infecção em hospedeiros animais e humanos, assim como espécies ambientais que ainda não foram relacionadas a infecções em hospedeiros animais (VICENTE et al, 2013). Dentro da clade *bantiana*, encontra-se o *cluster* das espécies de *Fonsecaea* que agrupa os principais agentes da cromoblastomicose, como *F. pedrosoi*, *F. monophora*, *F. nubica* e a *F. pugnacius* recentemente descrita (DE AZEVEDO et al, 2015; NIMRICHER et al, 2005; QUEIROZ-TELLES et al., 2017; STERFLINGER et al, 2015; VICENTE et al, 2013). Embora agentes causais de cromoblastomicose, estas espécies se diferenciam quanto à disseminação no tecido, *F. pedrosoi* e *F. nubica* tem sido relatada apenas como agentes causais de infecção subcutânea (DE HOOG et al, 2004; NAJAFZADEH et al, 2010a), enquanto *F. monophora* e *F. pugnacius* podem, além da cromoblastomicose (CBM), causar a doença disseminada denominada de feohifomicose (AZEVEDO et al, 2015; DE HOOG et al, 2004. NAJAFZADEH et al, 2010b). Em animais destacam-se as espécies: *F. multimorphosa* e *F. brasiliensis* que causam infecção disseminada em gatos e em caranguejos, respectivamente (NAJAFZADEH et al., 2011b; VICENTE et al., 2012), as quais se reúnem em grupos distintos dentro da clade *bantiana*. Quanto à infecção subcutânea, existem poucos relatos da infecção subcutânea nestes

hospedeiros, como por exemplo em sapos (MILLER et al, 1992) e rãs (ELKAN; PHILPOT; 1973), porém nestes hospedeiros, as formas parasitárias não apresentam morfologia típica de corpos muriformes (ELKAN; PHILPOT; 1973; MILLER et al, 1992).

Ainda, dentro do gênero *Fonsecaea* existem espécies de origem ambiental, como a *F. erecta* e *F. minima*, isoladas de plantas vivas, associadas ao risco de trauma, em regiões endêmicas brasileiras (VICENTE et al, 2013), as quais estão geneticamente relacionadas às espécies de origem clínica, mas foram filogeneticamente identificadas como um novo táxon (GONZALES et al, 2013; QUEIROZ-TELES et al, 2017; VICENTE et al, 2013).

De acordo com a literatura, vários espécimes vegetais têm sido associados como fonte de infecção da doença, como por exemplo a planta *Mimosa pudica* no estado do Pará (SALGADO et al, 2004). E ainda, algumas espécies de palmeira, a planta babaçu relatada como a principal fonte de risco da infecção no estado do Maranhão, uma das áreas de maior prevalência da doença no Brasil e na América do Sul, onde supõe-se que o agente mais relevante seja a espécie *F. pedrosoi* (MARQUES et al, 2006; SILVA et al, 1995).

Estudos recentes utilizando modelos vegetais e animais, avaliando o potencial de virulência de isolados ambientais por meio de testes *in vitro*, demonstraram diferenças significativas entres espécies estritamente relacionadas à infecção subcutânea em humanos (*F. pedrosoi* e *F. monophora*) e aquelas de procedência ambiental, no caso *F. erecta* (FORNARI et al, 2018). Entretanto, existem ainda diversas lacunas em relação à rota de infecção da doença e ao ciclo evolutivo destes agentes. Dentro deste contexto, o presente trabalho visou desenvolver modelos robustos de reprodução da doença em animais, como o camundongo BALB/c, e em plantas, utilizando espécies vegetais com espinhos, originárias de área endêmica da doença. Adicionalmente, foi realizada a agrotransformação dos fungos visando o estabelecimento de linhagens marcadas apropriadas para estudos em modelos animais e vegetais, objetivando o entendimento da interação parasita hospedeiro e assim, elucidar questões relacionadas à ecologia destas espécies assim como aspectos relacionados a rota de infecção da doença.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a interação parasito-hospedeiro, assim como a rota de infecção da espécie *Fonsecaea pugnacius* por meio de ensaios em hospedeiros animais e vegetais com linhagens transformadas.

1.1.2 Objetivos específicos

- Agrotransformar a espécie *F. pugnacius* com genes de fluorescência *DsRed*;
- Avaliar o potencial da planta *Mimosa pudica* e das espécies de palmeiras Pupunha (*Bactris gasipaes*) e Butiá (*Butia odorata*) como material vegetal de infecção;
- Testar o potencial de infecção da linhagem de *Fonsecaea pugnacius* mutante;
- Avaliar um modelo de estudo para *F. pugnacius* por meio de infecção de plantas micropropagadas;
- Avaliar o potencial de infecção de espinhos infectados em camundongos da linhagem BALB/C.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CROMOBLASTOMICOSE

A cromoblastomicose (CBM) é uma doença fúngica negligenciada, endêmica nas regiões tropicais e subtropicais e em países com baixo índice de desenvolvimento, principalmente Brasil, Madagascar, China, Guatemala e México. Esta doença atinge principalmente homens de 30 a 60 anos, sendo considerada, uma doença ocupacional endêmica, afetando principalmente trabalhadores rurais, jardineiros, madeireiros e trabalhadores envolvidos em ações com o solo ou material em decomposição (MARQUES et al., 2006; QUEIROZ-TELLES et al., 2017).

A CBM é uma infecção subcutânea caracterizada pela presença da forma parasitária (células muriformes) dos fungos negros inoculados na pele do hospedeiro por trauma no tecido (QUEIROZ-TELLES et al, 2017; TORRES-GUERRERO et al, 2012; VICENTE et al, 2013). Os fungos causadores da CBM pertencem à ordem *Chaetothyriales*, onde estão os gêneros *Cladophialophora*, *Exophiala*, *Fonsecaea*, *Phialophora* e *Rhinocladiella*. As espécies mais encontradas nas lesões da CBM são a *Cladophialophora carrioni* e *Fonsecaea pedrosoi* (DE AZEVEDO et al, 2015; QUEIROZ-TELES et al, 2017).

Além de causar CBM, algumas leveduras negras também são capazes de causar micetoma ou feohifomicose. O micetoma é uma micose de implantação e infecção profunda no tecido, ocorrendo geralmente nas extremidades inferiores, caracterizado pela presença de grânulos micóticos, há drenagem dos seios, aumento do número de grânulos sanguíneos e tumefação (SEYEDMOUSAVI et al, 2014; VAN DE SANDE et al, 2014). A feohifomicose é cutânea e sistêmica que somente ocorre em pacientes imunocomprometidos. Seu diagnóstico é realizado quando há a identificação de elementos fúngicos pigmentados (hifas, pseudo-hifas e células das leveduras) (SEVERO et al, 2012).

A presença subcutânea da doença distingue a feohifomicose das outras duas micoses causadas por fungos negros; a cromoblastomicose e o micetoma. Em casos de cromoblastomicose, células muriformes com septação ao longo de um ou dois planos em diferentes níveis são observados no tecido. No micetoma,

o fungo se apresenta nos tecidos como uma micro colônia de hifas na forma de grãos (SEVERO et al, 2012).

A CBM apresenta quatro características: (1) inoculação traumática que resulta em lesão; (2) desenvolvimento progressivo e, posteriormente, crônico de uma lesão cutânea e subcutânea, causando uma resposta granulomatosa/fibrosa do hospedeiro, podendo formar abscessos; (3) resposta humoral ineficaz; (4) presença de células muriformes (forma parasitária fúngica) (QUEIROZ-TELLES et al, 2017).

Morfologicamente as células muriformes são constituídas pela agregação de 2 a 4 células que exibem septação transversal e longitudinal, além disso, apresentam uma alta melanização externa a parede celular. Este tipo celular é considerado um mecanismo de defesa do fungo para sobreviver no microambiente do hospedeiro, pois quando nesta morfologia são altamente resistentes à destruição imunológica. Esse mecanismo demonstra que a melanina é um fator de virulência importante para os fungos negros, pois além de apresentarem um mecanismo protetor e de adaptação as condições fisiológicas e químicas do tecido do hospedeiro, em função da deposição de melanina na superfície de células vegetativas (hifas) e reprodutivas (conídios), representam uma barreira contra a resposta imunológica, além das características imunogênica deste pigmento (DE HOOG et al, 2007; QUEIROZ-TELLES et al, 2017; VICENTE et al, 2013).

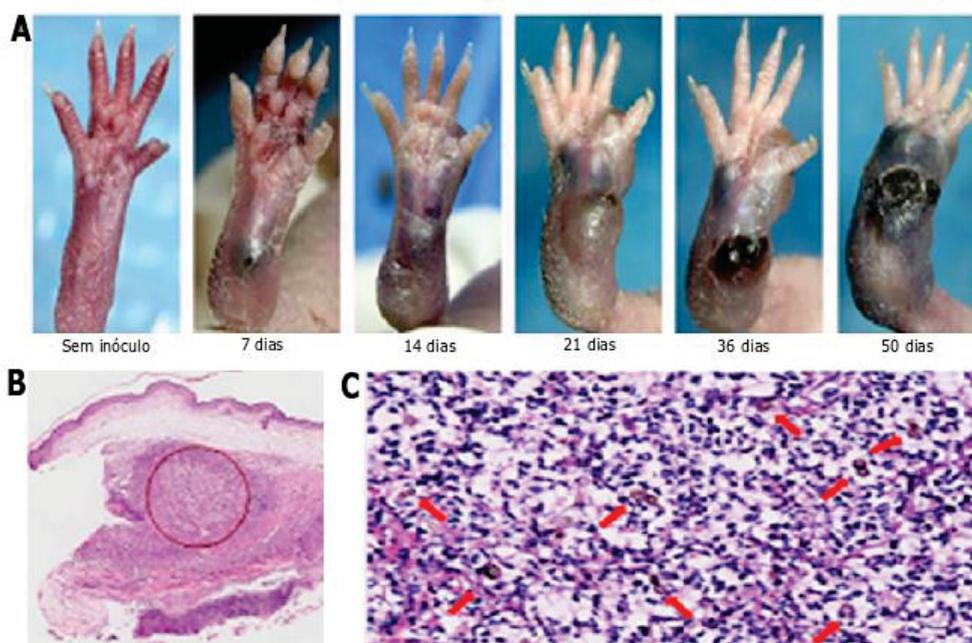
No estudo conduzido por DA SILVA et al. em 2008, foi demonstrado que os conídios *in vitro* levavam cerca de 6 dias para se converterem em células muriformes (DA SILVA et al., 2008; QUEIROZ-TELLES et al., 2017). Existem poucos estudos (BADALI et al., 2008; DA SILVA et al., 2008) em que houve a observação de células muriformes *in vitro*. Existem diversas dificuldades neste cultivo, pois somente se formam em tecido do hospedeiro, podendo ser em vegetais ou em animais. Para isto, pode ser feito o isolamento utilizando meio de cultura com tecido vivo animal (BADALI et al, 2008; SANTOS et al, 2007; SUN et al, 2012).

Modelos animais como o camundongo BALB/c, são frequentemente utilizados para mimetizar a doença, como descrito por DONG e colaboradores (2014; 2018), onde os camundongos foram infectados com *F. pedrosoi* via

inoculação na pata conforme FIGURA 01 (DONG et al., 2014; DONG et al., 2018).

A via de infecção traumática é apoiada por relatos clínicos de pacientes que exibem a presença de fragmentos vegetais no local onde ocorreu o trauma (MARQUES et al., 2006; QUEIROZ-TELLES et al., 2017; SUN et al., 2012). Após micro ou macro feridas, é ‘rompida’ a barreira da pele e assim, há a implantação do fungo no tecido do hospedeiro e, então, começa a conversão dos conídios e ou fragmentos de hifas em células muriformes, consideradas um mecanismo de resistência ao sistema imune do hospedeiro. Além disso, essas estruturas têm sido fortemente relacionadas ao desencadeamento da resposta de caráter inflamatório de aspecto crônico e granulomatoso. Inicialmente, logo após a implantação traumática, surgem nódulos indolores, sendo bastante comum o aparecimento das lesões periféricas, causadas pela a auto inoculação ou disseminação pelos vasos linfáticos (FIGURA 02). Essas lesões iniciais são moderadas de característica ulcerativa e de evolução lenta (QUEIROZ-TELLES et al, 2017).

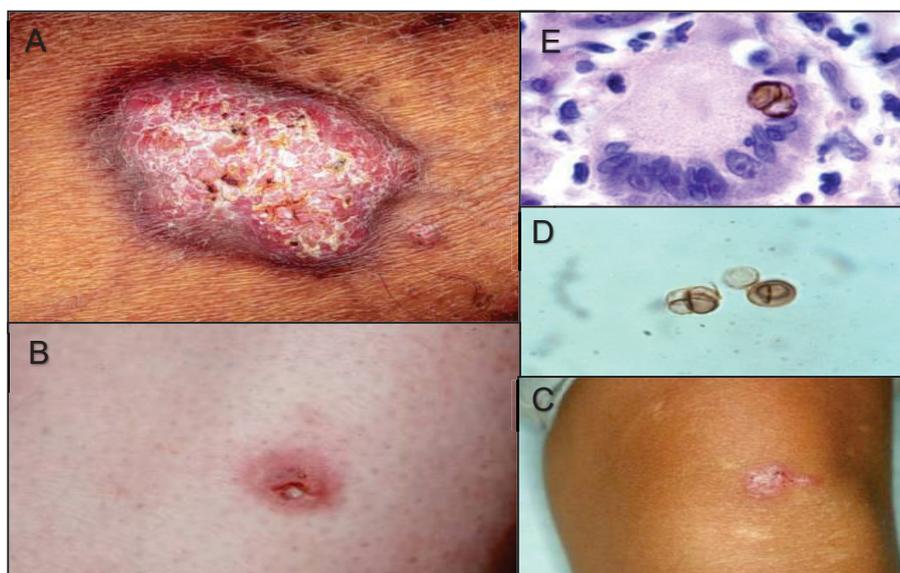
FIGURA 1 - IMAGENS DE LESÕES CAUSADAS NA PATA DE CAMUNDONGOS BALB/C POR *F. pedrosoi*



LEGENDA: (A) Inoculação de *Fonsecaea pedrosoi* na pata do camundongo, observações realizadas nos dias 7, 14, 21, 36 e 50 após a inoculação. Nota-se aumento visível do tamanho da pata e cronificação da lesão com início de necrose aos 50 dias. (B) Cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina no aumento de 40 e depois 250 vezes, as flechas mostram células muriformes no tecido após 14 dias de infecção. FONTE: Adaptação de DONG et al., 2014.

Com o tempo, a lesão inicial pode evoluir para diversas formas. Lesões iniciais, são pequenas e não pruriginosas, as células muriformes se espalham pela pele, formando novas lesões ao longo de meses ou anos. Estas lesões progridem para placas eritematosas, podendo apresentar escamas ou ulcerações, com bordas bem definidas, que podem se assemelhar à psoríase. Posteriormente, essa lesão se expande e desenvolve uma superfície verrucosa ou papilomatosa irregular (QUEIROZ-TELLES et al, 2017; TORRES-GUERRERO et al, 2012).

FIGURA 2 - IMAGENS DE LESÕES PROVENIENTES DA CROMOBLASTOMICOSE E AS CÉLULAS MURIFORMES



LEGENDA: (A) lesão crônica; (B) lesão progressiva cutânea; (C) infecção fúngica subcutânea; (D) células muriformes; (E) células muriformes no tecido.
 FONTE: Adaptação de (DE AZEVEDO et al, 2015; QUEIROZ- TELLES et al, 2017).

A classificação clínica das lesões é variável devido à versatilidade das morfologias e apresentações clínicas, incluindo nódulos verrucosos ou vegetantes, lesões tumorais, cicatriciais ou esporotricóides (FIGURA 03). Lesões mistas ou polimórficas são frequentemente encontradas nos pacientes e esta característica leva à confusão no diagnóstico, podendo ser erroneamente caracterizado como lepra, sífilis, leishmaniose, psoríase entre outros (QUEIROZ-TELLES et al., 2017; TORRES-GUERRERO et al, 2012).

As lesões verrucosas são semelhantes a uma couve-flor, podendo ulcerar e haver a liberação de pus devido à infecção. Pode haver a formação de queloides e a linfadenopatia pode estar presente em pacientes com lesões bacterianas secundárias. Em casos avançados pode-se desenvolver linfedema e elefantíase (QUEIROZ-TELLES et al, 2017; TORRES-GUERRERO et al, 2012).

FIGURA 3 - IMAGENS DE LESÕES PROVENIENTES DA CROMOBLASTOMICOSE



LEGENDA: (A) lesão nodular; (B) tumoral; (C) cicatricial; (D) plaque; (E) verrucosa.
FONTE: Adaptação de (QUEIROZ- TELLES et al, 2009).

Na cromoblastomicose pode ocorrer a disseminação, sendo normalmente vista nos membros periféricos, por meio do sistema linfático do hospedeiro (QUEIROZ-TELLES et al, 2017).

Os pacientes são geralmente assintomáticos, no entanto, quando as lesões são faciais, elas podem ser pruriginosas ou sensíveis. Quando em abscessos cerebrais, ocorre a propagação linfática de hifas acastanhadas. Das lesões crônicas pode-se desenvolver células escamosas e até carcinomas. A cromoblastomicose não se desenvolve em ossos ou músculos. Podem decorrer de 5 a 15 anos ou mais a partir do trauma até o diagnóstico ser feito (TORRES-GUERRERO et al, 2012).

Para o diagnóstico da CBM é necessário que as biopsias dos tecidos lesionados apresentem células muriformes. Após o diagnóstico inicial da doença, se faz necessário o sequenciamento genético para que haja a definição do gênero e espécie, visto que os gêneros causadores apresentam excentricidades

como o gênero *Fonsecaea* ser mais sensível aos antifúngicos do que o gênero *Cladophialophora*, por exemplo (QUEIROZ-TELLES et al, 2017; TORRES-GUERRERO et al, 2012).

O tratamento da cromoblastomicose consiste na união de diversas técnicas, as pequenas lesões podem ser retiradas cirurgicamente, já no caso das lesões maiores a taxa de cicatrização é muito baixa e os pacientes devem fazer tratamento com antifúngicos sistêmicos de uso contínuo. Sendo uma micose crônica e altamente resistente à maioria dos tratamentos, e ainda com a taxa de recorrência alta, deve-se tomar cuidado quanto a decretação de cura (QUEIROZ-TELLES et al., 2017).

O tratamento pode ocorrer com cirurgias, crio-cirurgias, termoterapia, quimioterapias como Calciferol, Tiabendazol, Fluconazol ou a combinação de cirurgias com o tratamento químico (QUEIROZ-TELLES et al., 2009).

2.2 LEVEDURAS NEGRAS

Os fungos negros (Fungos dematídeos, melanizados e ou leveduras negras) são saprófitas, de crescimento lento, apresentam células com formato leveduriforme e cadeias filamentosas. São encontrados na natureza, geralmente no solo, madeira ou em resíduos em decomposição. Recebem esta denominação, 'leveduras negras', pois apresentam pigmentação escura nas paredes celulares de células vegetativas e reprodutivas, devido ao acúmulo de melanina (DIXON; POLAK-WISS, 1991). Morfologicamente apresentam divisão celular por brotamento e predominância de estruturas unicelulares, mesmo quando em desenvolvimento micelial (AJELLO, 1978; SEYEDMOUSAVI et al, 2014; TORRES-GUERRERO et al, 2012; VICENTE et al, 2013).

As leveduras negras apresentam morfologia simples, porém têm alta resistência ao calor extremo, dessecação e radiação UV. Pela sua grande resistência, estes fungos estão presentes em ambientes nos quais a oferta de nutrientes não é grande, como máquinas de lavar roupa ou de lavar louça. Estas leveduras crescem em micro habitats, pois apresentam baixa capacidade de competição com outros organismos (GUNDE-CIMERMAN; DE HOOG; GRUBE, 2011; VICENTE et al, 2008).

As leveduras são divididas em três grupos ecológicos: (1) organismos sapróbios que não causam doença em vertebrados, como a *Cladophialophora immunda* e *F. minima*; (2) Organismos pouco virulentos que podem ou não causar patologias em mamíferos, como a *F. monophora*; (3) patógenos altamente específicos que não podem ser isolados diretamente do ambiente, necessitando de tecidos vivos para seu desenvolvimento, como a *F. pedrosoi* e *Exophiala jeanselmei* (SEYEDMOUSAVI et al, 2014; VICENTE et al, 2008).

As leveduras desta família são de crescimento lento, inicialmente leveduriforme, e com o tempo, a textura da colônia torna-se aveludada com hifas mononucleadas e talo regular e uniformemente pigmentado (DIXON; POLAK-WYSS, 1991), As principais leveduras negras pertencem aos gêneros *Fonsecaea*, *Phialophora*, *Cladophialophora*, *Exophiala* e *Rhinocladiella* (DE AZEVEDO et al, 2015; TORRES-GUERRERO et al, 2012).

É possível realizar a distinção dos gêneros com a morfologia reprodutora desses organismos. No gênero *Rhinocladiella* os conídios são produzidos de formas similares em extensões celulares alongadas; em *Fonsecaea* os conídios formam denticulos organizados em cadeias curtas; no gênero *Cladophialophora* os conídios estão em longas cadeias; nos gêneros *Phialophora* e *Cyphellophora* os conídios se organizam em estrutura semelhante a um colar, sendo que a *Cyphellophora* tem conídios curvos e septados; *Veronea* tem longos conídios em pares; e pôr fim a *Exophiala* apresenta as células produtoras de conídios em formato anular (QUEIROZ-TELLES et al., 2017).

Os membros do gênero *Fonsecaea*, apresentam colônias aveludadas planas ou levemente elevadas, têm crescimento lento e coloração que varia do preto, oliváceo ao cinza escuro, o seu reverso é negro. A análise de microscopia revela a presença de conidióforos ramificados originando conídios primários e secundários (DE HOOG et al, 2000; VICENTE, 2000).

2.2.1 FATORES DE VIRULÊNCIA

O potencial invasivo e de proliferação dentre as espécies de leveduras negras é muito diferenciado, porém quando separados em 'espécies ambientais' e 'espécies clínicas' os mecanismos de patogenicidade se tornam muito semelhantes (QUEIROZ-TELLES et al, 2017).

Vários potenciais de virulência estão envolvidos nas micoses causadas por fungos negros, dentre os quais, modificações na superfície celular, hidrofobicidade, secreção de enzimas proteolíticas e hidrolíticas, moléculas de adesão, incorporação de hidrocarbonetos aromáticos e especialmente a presença de melanina na parede celular (QUEIROZ-TELLES et al, 2017). Sabe-se que a virulência e a patogenicidade estão envolvidas com a presença da melanina em sua parede, na espessura que este composto gera e nas demais consequências, como a termotolerância, osmotolerância e hidrofobicidade. Sabe-se também que alguns desses fatores deram aos *Ascomycetes* a predisposição para o crescimento no tecido de mamíferos (QUEIROZ-TELLES et al., 2017; SEYEDMOUSAVI et al, 2014; VICENTE et al, 2013).

A melanina é o fator mais aparente, pois se encontra na parede de células vegetativas ou nos conídios dos fungos negros, não sendo um fator essencial para o crescimento, tornando-se um metabolito secundário. Esta substância confere às colônias tons oliváceos próximos ao preto. Ela apresenta três mecanismos que auxiliam na resistência dos fungos contra células imunes do hospedeiro: i) proteção contra enzimas proteolíticas; ii) proteção contra oxigênio e derivados de nitrogênio e, iii) diminuição da fagocitose (AJELLO, 1978; QUEIROZ-TELLES et al, 2017; SEYEDMOUSAVI et al, 2014).

A melanina é sintetizada naturalmente e está, obrigatoriamente, em todos os fungos pertencentes a ordem Chaetothyriales, constituindo um pigmento de caráter hidrofóbico, carga negativa e alto peso molecular. Cada espécie apresenta uma forma de síntese desse, e podem desta forma, produzir uma melanina diferente, tornando mais ou menos virulenta (QUEIROZ-TELLES et al, 2017; SEYEDMOUSAVI et al, 2014).

Este pigmento cria elusão para o sistema imunológico do hospedeiro pois interage com o óxido nítrico (NO), agindo como um tipo de armadilha para o elétron livre do NO, protegendo o fungo de danos oxidativos. Este efeito não permite que os fagócitos degenerem o agente (SEYEDMOUSAVI et al, 2014; TORRES-GUERRERO et al, 2012).

2.3 GÊNERO *Fonsecaea*

O gênero *Fonsecaea* é composto por vários agentes etiológicos da cromoblastomicose humana. Este gênero pertence à família Herpotrichiellaceae, que apresenta diversas espécies com potencial de causarem infecções disseminadas ou cerebrais, as quais se não tratadas a tempo podem levar a morte do paciente (FORNARI et al., 2018; SUN et al., 2012).

As características gerais do gênero são hifas marrons e septadas, conidióforos retos altamente ramificados no ápice, os conídios são marrons e em forma de barril, as colônias são semelhantes e apresentam tons oliváceos. Apresentam ótimo desenvolvimento a 33°C com termotolerância de 37°C (QUEIROZ-TELLES et al., 2017; SANTOS et al., 2007). Este gênero é composto por 8 espécies: *F. nubica*, *F. minima*, *F. erecta*, *F. multimorphosa*, *F. brasiliensis*, *F. monophora*, *F. pedrosoi* e *F. pugnacius* (SUN et al., 2012).

F. pedrosoi é o agente causal predominante da cromoblastomicose, e como a *F. nubica* é um patógeno estrito à cromoblastomicose, diferente da *F. monophora* que é oportunista e pode causar a feohifomicose cerebral, ela tem um neurotropismo acentuado (DE AZEVEDO et al., 2015; NAJAFZADEH et al., 2010; SANTOS et al., 2007).

As espécies *F. multimorphosa* e *F. brasiliensis* são patogênicas, mas em animais, como o caso de descrição da *F. multimorphosa* que foi isolada de uma gata na Austrália sem coordenação motora. A *F. brasiliensis* foi isolada e descrita como um dos agentes causais da doença do caranguejo letárgico (NAJAFZADEH et al., 2011b; VICENTE et al., 2012)

Enquanto as espécies *F. minima* e *F. erecta* descritas por VICENTE e colaboradores em 2013, foram isoladas de espécimes vegetais procedentes de plantas vivas e são consideradas ambientais, FORNARI et al. realizaram a inoculação da *F. erecta* em camundongos e observou que a espécie era capaz de ser patogênica e ainda, causar uma maior resposta imune que as espécies conhecidamente patogênicas como *F. pedrosoi* e *F. monophora* (FORNARI et al., 2018; VICENTE et al., 2013).

No estudo onde a *F. pugnacius* foi descrita observou-se um caso crônico de cromoblastomicose, que secundariamente causou disseminação cerebral, mesmo com a imunidade intacta do paciente. Entretanto, as células muriformes

foram observadas somente no tecido cutâneo/subcutâneo do hospedeiro, enquanto que no tecido cerebral foi descrito a ocorrência somente de hifas e elementos leveduriformes. Quanto à capacidade invasiva embora a *F. monophora* seja capaz de causar feohifomicose, não existe nenhum relato de infecção subcutânea e sistêmica em um mesmo hospedeiro; isto sugere uma característica de virulência diferenciada entre as duas espécies em questão (DE AZEVEDO et al., 2015).

2.4 ESPÉCIMES VEGETAIS

A cromoblastomicose é denominada de micose de implantação traumática associada principalmente à fragmentos de plantas. VICENTE et al., 2013 demonstraram que agentes causais podem ser isolados de fontes ambientais, tais como plantas vivas e/ou material em decomposição. Entretanto, de acordo com estes estudos, as espécies procedentes de plantas vivas são taxonomicamente distintas das espécies agentes causais da doença e não apresentam o mesmo comportamento quando em hospedeiro animal (QUEIROZ-TELLES et al, 2017; VICENTE et al, 2013).

SALGADO et al., 2004 reportaram o isolamento de *F. pedrosoi* da planta *Mimosa pudica*. No entanto, este isolado foi identificado com base em morfologia e, desta forma, sua identidade não foi confirmada. O fato de ainda não terem sido encontradas espécies clínicas de *Fonsecaea* em plantas vivas, sugere que estas podem estar altamente adaptadas ao hospedeiro animal, e sua baixa frequência de isolamento sugere da mesma forma a existência de microambientes, onde comum sapróbios não coexistem (QUEIROZ-TELLES et al, 2017; SEYEDMOUSAVI et al, 2014; SUN et al, 2012; VICENTE et al, 2013).

O nicho dos fungos negros da família *Herpotrichiellaceae* é de amplo espectro e varia de acordo com a espécie em questão, como em madeira tratada com compostos fenólicos, resíduos de mina ou solo poluído com óleo ou petróleo. Já em ambientes mais naturais os fungos negros podem ser encontrados em pequenas quantidades nas plantas em decomposição, nos espinhos. O fato destes fungos viverem nestes microambientes correlacionando ao fato de fragmentos de material vegetal serem encontrados nas lesões da CBM sugere que a possível rota de infecção pode ser através de lesões causadas por

trauma com material vegetal contendo o fungo (MARQUES et al., 2006; QUEIROZ-TELLES et al., 2017).

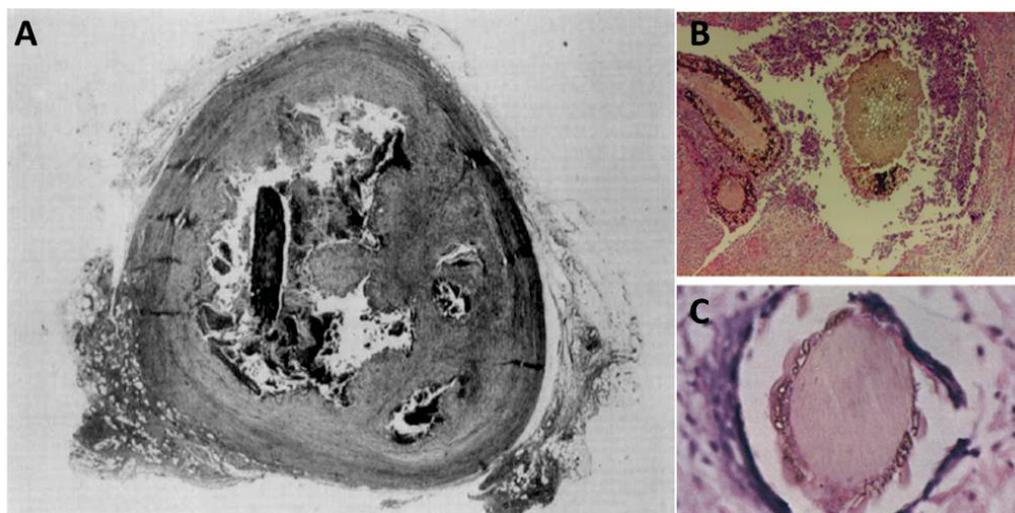
Acredita-se que o principal modo de transmissão majoritário da cromoblastomicose é o trauma com solo ou material vegetal contaminado com as leveduras negras, com frequência são encontrados fragmentos destas plantas nas biopsias dos pacientes, como na FIGURA 04 (DE MONBRISON et al., 2004; RUBIN et al., 1991; TSCHEN et al., 1984; WEEDON; RITCHIE, 1979).

Existem alguns vegetais previamente descritos em literatura com o envolvimento dos agentes da cromoblastomicose como por exemplo, a palmeira coco-babaçu (*Orbignya phalerata*), onde foi relatado o isolamento de *Fonsecaea pedrosoi* e *Cladophialophora sp.* de amostras do coco e de material em decomposição (MARQUES et al., 2006), assim como o relato de *F. pedrosoi* na planta *Mimosa pudica* (SALGADO et al., 2004).

Da mesma forma o cacto, *Stenocereus griseus*, vem sendo associado como fonte de trauma e consequente infecção em regiões semiáridas onde o principal agente é a espécie *C. carrionii* (VICENTE et al., 2013). No entanto, estudos in vitro demonstraram que os isolados procedentes do tecido vegetal isolados de planta viva embora proximamente relacionados aos isolados de *C. carrionii*, de procedência clínica, foram caracterizados molecularmente como uma espécie distinta descrita como *C. yegresii* (DE HOOG et al., 2007).

No Brasil, algumas plantas, como exemplo palmeiras, têm sido correlacionadas como fontes traumáticas de inoculação e associados ao estabelecimento da lesão primária da doença. Da mesma forma estudos de isolamento ambiental nestas áreas vem demonstrando que a maior parte dos isolados obtidos de plantas vivas, pertencem a espécies diferentes dos agentes causais da doença. Sendo assim a elucidação dos mecanismos e das rotas de infecção ainda se faz necessária (FORNARI et al., 2018; VICENTE et al., 2013). O estudo de FORNARI, et al., 2018 foi o primeiro a demonstrar a habilidade das espécies crípticas de *Fonsecaea* agentes de cromoblastomicose de sobreviverem no tecido de plantas vivas.

FIGURA 4 - CORTES HISTOLÓGICOS DE LESÕES DE CROMBLASTOMICOSE COM PARTES VEGETAIS EM SEU INTERIOR



LEGENDA: (A) Lesão da cromblastomicose com um espinho em seu interior, corado com hematoxilina-eosina; (B) Abscesso cístico contendo material fúngico pigmentado ao redor, corado com hematoxilina-eosina; (C) Lasca de madeira presente em lesão rodeada de células fúngicas, corado com hematoxilina-eosina.

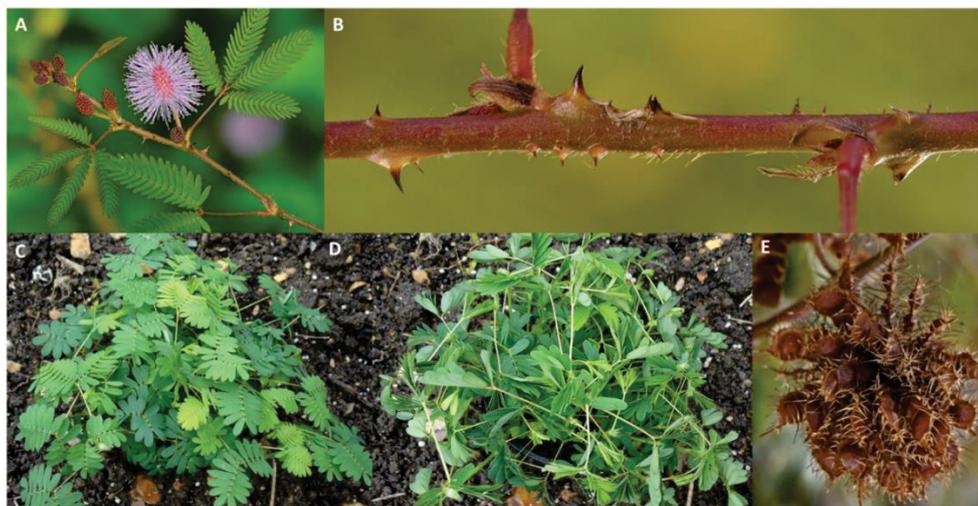
FONTE: adaptado de SHEIKH et al., 2007; TSCHEN et al., 1984; WEEDON et al. 1979.

2.4.1 *Mimosa pudica* (DORMIDEIRA)

Mimosa pudica Linnaeus é o nome científico para a planta popularmente conhecida como dormideira ou não-me-toque, um arbusto perene encontrado na América Tropical, Austrália e Índia (BARNEBY, 1991). Esta planta (FIGURA 05) apresenta diversos espinhos curvados e folhas sensíveis ao toque. Ela é tradicionalmente usada como antimicrobiano, antidepressivo e afrodisíaco (AHMAD et al., 2012). A dormideira apresenta caule cilíndrico com espinhos esparsamente distribuídos, espinhos hígidos e que podem causar lesões em herbívoros que venham devorar a planta (AHMAD et al., 2012; AMADOR-VARGAS et al., 2014).

A dormideira apresenta dois tipos de movimentos, o movimento rápido das folhas quando é estimulado pelo toque ou aquecimento e o movimento lento e periódico, movimento sismonástico e o movimento nictinástico, controlados pelo seu relógio biológico. O movimento rápido tem um custo à planta, há o declínio de 40% de taxas fotossintéticas na área superficial da folha e o custo energético no momento da abertura (AHMAD et al., 2012; BAO; ROY; CAHILL JR, 2018).

FIGURA 5 - ASPECTOS DAS ESTRUTURAS VEGETATIVAS E REPRODUTIVAS DA *Mimosa pudica* L. (DORMIDEIRA)



LEGENDA: (A) imagem mostrando a flor, espinhos e folhas da dormideira; (B) Espinhos em detalhe; (C e D) Imagens da dormideira com as folhas abertas e fechadas após receber um estímulo; (E) Fago com as sementes.

FONTE: AHMAD et al., 2012; BAO; ROY; CAHILL JR, 2018; REIS, 2012.

Esta planta foi associada a traumas e, conseqüentemente, as causas iniciais da cromoblastomicose nas regiões norte e nordeste do Brasil, no estudo de SALGADO et al., 2004, isolaram o agente patogênico *Fonsecaea pedrosoi* dos espinhos de um canteiro indicado pela paciente, onde ela relatou ter caído. Os pesquisadores então além de realizarem o isolamento da lesão, fizeram o isolamento dos espinhos e identificaram macro morfologicamente como *F. pedrosoi*. No entanto, não foi realizada identificação molecular (QUEIROZ-TELLES et al., 2017; SALGADO et al., 2004).

Outros casos de lesão são documentados em equinos, bovinos e ovinos, onde o ambiente de pastagem do animal (piquete) foi invadido totalmente pela dormideira, no caso dos equinos e bovinos as lesões são geralmente nas patas e tornozelos, já nos ovinos as lesões podem ser mais altas alcançando até a barriga dos animais. Quando retirados destes piquetes se recuperam logo das lesões (BARBOSA et al., 2009; REIS, 2012).

A introdução *in vitro* da *M. pudica* é realizada com a germinação de suas sementes em meio com reguladores de crescimento vegetais, o cultivo *in vitro* é utilizado em estudos para descrever seus movimentos foliares (SONG; YEOM; LEE, 2014), estudos de crescimento funcional (MUSAH et al., 2016), diversidade

genética (DALL'AGNOL et al., 2017) e estudos envolvendo a rota de infecção de hospedeiros fúngicos (FORNARI et al., 2018).

2.4.2 ESPÉCIES DE PALMEIRAS

Diversas espécies da família *Arecaceae* foram reconhecidas como micro-habitat das leveduras negras como a palmeira Coco Babaçu (*Orbignya phalerata* Martius). Esta espécie de palmeira encontra-se na Baixada Maranhense, nesta região onde a Amazônia legal está quase completamente desmatada. Neste contexto, um total de 300 mil famílias estão envolvidas na extração das sementes do Coco Babaçu, estes trabalhadores passam o dia sentados no chão ou sob as folhas desta palmeira, resultando em diversos machucados na região dos glúteos e pernas, porta de entrada para os causadores da cromoblastomicose (MARQUES et al., 2006; MATOS et al., 2018; QUEIROZ-TELLES et al., 2017).

A região da Amazônia, maior ocorrência da cromoblastomicose (QUEIROZ-TELLES et al., 2017), é coberta por uma vegetação densa, com clima úmido e fortes chuvas, devido à estas condições a Amazônia abriga diversas espécies frutíferas amplamente conhecidas por moradores e usadas no extrativismo local (MATOS et al., 2018). Os membros da família *Arecaceae* são comumente conhecidas como palmeiras e se adaptam melhor a regiões quentes e úmidas. Esta família conta com 183 gêneros e 2364 espécies (CANTU-JUGLES et al., 2017).

A espécie *Bactris gasipaes* Kunth (FIGURA 06) é encontrada principalmente na região amazônica e é mais conhecida por palmeira pupunha. Desta é extraído o palmito do tipo pupunha utilizado na alimentação e não somente o palmito pode ser consumido, como também seus frutos. Esta palmeira ainda pode ter suas palhas utilizadas na construção de cestas, as flores como temperos exóticos e as amêndoas para a extração do óleo (GAZEL FILHO; LIMA, 2001; MATOS et al., 2018).

A maior dificuldade no manejo da pupunheira é a colheita dos cachos, visto que há a presença de espinhos no estipe (caule lenhoso), nos raques e bainha das folhas. Estes espinhos largos e negros tornam a colheita mais onerosa, pois os trabalhadores precisam podar ou armar proteções sob estes

espinhos para não causar ferimentos (GAZEL FILHO; LIMA, 2001; MATOS et al., 2018).

FIGURA 6 - ASPECTOS DAS ESTRUTURAS VEGETATIVAS E REPRODUTIVAS DA PALMEIRA *Bactris gasipaes* Kunth (PUPUNHA)



LEGENDA: (A) Tronco da pupunha com 8 metros de altura, com ênfase em seus espinhos nos entre nós; (B) Parte apical da palmeira onde há inserção de folhas e inflorescências; (C) Fruto da pupunha; (D) Palmeiral.

FONTE: GAZEL-FILHO; LIMA, 2001.

Existem diversos estudos que utilizam a pupunha *in vitro*, esta apresenta um grande interesse econômico, e a reprodução de genótipo de crescimento rápido, presença de perfilhos se torna essencial para os produtores, também já é descrito na literatura a utilização desta planta *in vitro* como modelo de reprodução de doença (FORNARI et al., 2018), estes estudos usam a pupunha introduzida por meio da técnica de embriogênese somática (STEINMACHER et al., 2011).

Outra espécie da família *Arecaceae* encontrada nesta região é a *Astrocaryum aculeatum* Meyer (FIGURA 07) esta é uma palmeira oleaginosa e monoica, apresenta tipos diferentes de inflorescência dependendo do sexo das plantas. A fruta crua é consumida pela população local, sendo que é uma das mais caras do mercado, justificando a produção *in vitro* de plantas geneticamente iguais e altamente produtoras de fruto (RAMOS et al., 2012). O tronco desta planta é altamente espinhoso incluindo inflorescências cobertas de espinhos (RAMOS et al, 2016; SAGRILLO et al, 2015).

FIGURA 7 - ASPECTOS DAS ESTRUTURAS VEGETATIVAS E REPRODUTIVAS DA PALMEIRA *Astrocaryum aculeatum* MEYER (TUCUMÃ)



LEGENDA: A) Palmeira com mais de 10 metros de altura; (B) Parte apical da palmeira onde há inserção de folhas e inflorescências apresentando diversos espinhos ao redor; (C) Tronco da tucumã com ênfase em seus espinhos que recobrem quase a totalidade de seu caule, seus espinhos são hígidos e chegam a medir 8 cm.

FONTE: adaptado de RAMOS et al., 2016; SAGRILLO et al., 2015.

Enquanto que a palmeira *Butia odorata* Barb. Rodr. Noblick (FIGURA 08) é uma palmeira característica no clima subtropical que ocorre em áreas abertas e na floresta de araucária, cuja fruta e as folhas são utilizadas para fazer alimentos e artesanatos. O butiá também apresenta compostos bioativos. Além disso, o butiá apresenta suas bainhas espinhentas, de modo que a colheita e manuseio devem ser conduzidos de forma cuidadosa (HAUBERT et al., 2018; HOFFMANN et al., 2017).

VICENTE (2000) em estudos de isolamento ambiental obteve isolados da espécie de *F. monophora* a partir da palmeira *Butia capitata*. As plantas *B. capitata* e *Butia odorata* são consideradas espécies irmãs, porém separadas geograficamente (LORENZI et al., 2010), sendo que a espécie *B. odorata* se distribui ao longo do Rio grande Sul, enquanto que *B. capitata* ocorre nos estados Bahia, Goiás e Minas Gerais, (SANTANNA-SANTOS et al., 2015). Pioneiramente estudos realizados na empresa brasileira de pesquisa EMBRAPA/Clima Temperado por FERREIRA et al., 2017 estão desenvolvendo protocolos de introdução *in vitro* para a espécie *B. odorata*, com resultados promissores.

FIGURA 8 – ASPECTOS DAS ESTRUTURAS VEGETATIVAS E REPRODUTIVAS DA PALMEIRA *Butia odorata* Barb. Rodr. (BUTIÁ)



LEGENDA: (A) Palmeira butiá com 2,5 metros; (B) Inserção foliar com espinhos nas raques; (C) Infrutescência; (D) Região de infrutescência.
 FONTE: HAUBERT et al., 2018

2.5 TRANSFORMAÇÃO EM FUNGOS

O conhecimento dos genes ligados aos mecanismos de patogenicidade e virulência é essencial para a elucidação dos mecanismos envolvidos, para isto existem ferramentas capazes de tornar possível este entendimento, como a transformação genética (BERNARDI-WENZEL; QUENCINE; AZEVEDO, 2016).

Na transformação fúngica é utilizada o sistema de mutagênese de inserção aleatória, sem que comprometa a viabilidade das células, sendo que este processo deverá ser eficiente para que a manipulação genética e estudos de genômica. A transformação tem outras utilizações além da mutagênese de inserção, permite a introdução de genes *reporter* e modificações direcionadas aos alvos. Existem diversos métodos para isto, como a eletroporação fúngica, a transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, mediada por PEG (polietilenoglicol – agente químico), mediada por vetores virais (lipossomos ou nanomateriais), bombardeamento de partículas (biobalística) (BERNARDI-WENZEL; QUENCINE; AZEVEDO, 2016; FRANDSEN, 2011; HE et al, 2016; RIVERA et al, 2014).

As metodologias envolvendo eletroporação e PEG utilizam um sistema dependente da modificação das células fúngicas para protoplasto (esferoplasto), que ocorre com a digestão enzimática da parede celular destes fungos. Este tipo de remoção não é permanente porque diversos gêneros tem a capacidade de regenerar a parede celular (FRANDSEN, 2011), enquanto outras técnicas, por

exemplo, a mediada por *A. tumefaciens*, PEG, vetores virais ou biobalística, tem um maior rendimento de organismos transformantes com eventos de inserção simples ou múltipla (FRANSEN, 2011).

2.5.1 TRANSFORMAÇÃO MEDIADA POR *Agrobacterium tumefaciens* (TMAT OU AGROTRANSFORMAÇÃO)

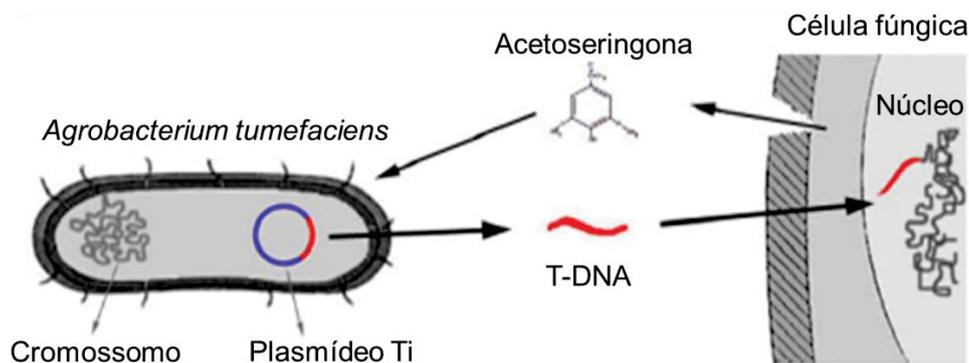
O sistema de transformação que utiliza *Agrobacterium tumefaciens*, bactéria do solo em formato de bacilo e gram-negativa, foi descrito primeiramente para plantas e posteriormente adaptado para os fungos. A transferência de DNA ocorre de modo semelhante, porém a indução dos genes de virulência bacteriana foi modificada de forma que um agente indutor de compostos fenólicos foi acrescentado nas etapas de co-cultivo entre as células. Para a utilização desta bactéria na TMAT foram realizadas modificações em seu plasmídeo Ti, para que os genes tumorais fossem retirados e inserção de genes de interesse e ainda, marcadores de seleção (BERNARDI-WENZEL; QUENCINE; AZEVEDO, 2016; DE OLIVEIRA, 2007; FRANSEN, 2011; MICHIELSE et al., 2005).

A maioria das bactérias pertencentes ao gênero *Agrobacterium* são saprófitas, porém algumas espécies específicas são patógenos vegetais. Estas infecções consistem na transferência de DNA das bactérias infectantes para o hospedeiro via conjugação. A *A. tumefaciens* apresenta o plasmídeo Ti (*Tumor Inducing*; Ti) que contém os codificadores necessários para os genes indutores de tumor e de virulência, parte desse plasmídeo é o tDNA (DNA de transferência) leva o gene que se quer integrar no DNA do hospedeiro. O tDNA também tem genes codificantes para indutores de compostos fenólicos (acetoseringona, ácido-hidroxibenzóico e vanilina) para que possa atravessar as membranas até sua inserção no núcleo do hospedeiro (FIGURA 09) (DE OLIVEIRA, 2007; FRANSEN, 2011).

As regiões mais externas no tDNA são de extrema importância: são duas sequências, denominadas *left border* (borda esquerda - LB) e *right border* (borda direita - RB) reconhecidas como regiões flaqueadoras do gene. Estas regiões de borda apresentam sequências de repetição de 25 pb necessárias para que haja a transferência associados aos mecanismos de inserção e recombinação

da sequência genica. O DNA de interesse é transferido na forma de fita simples a partir da remoção das sequências de borda (*LB* e *RB*) (FRANDSEN, 2011; LACROIX; CITOVSKY, 2013).

FIGURA 9 - ILUSTRAÇÃO SIMPLIFICADA DA TRANSFERÊNCIA DO T-DNA PARA AS CÉLULAS ALVO



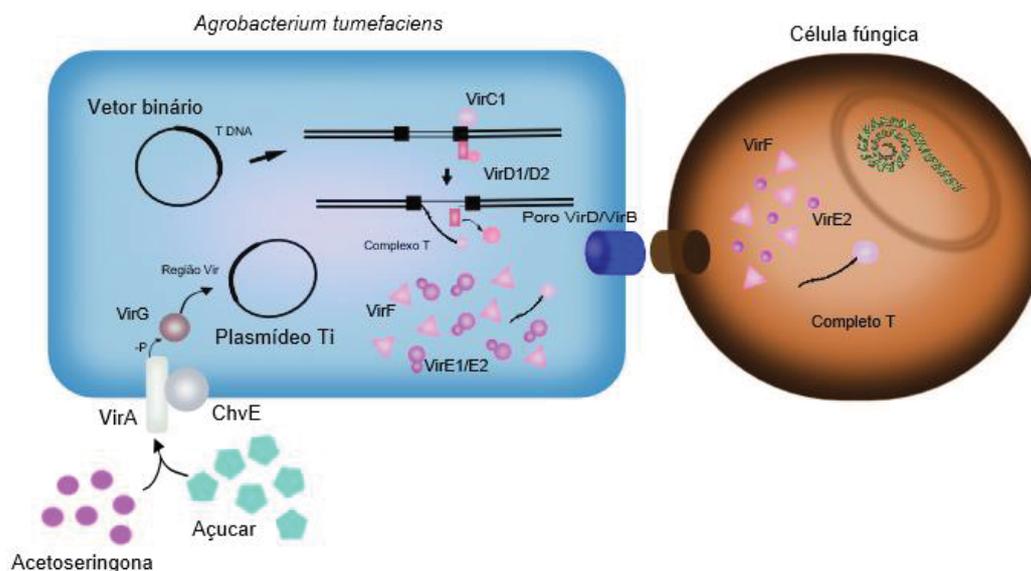
LEGENDA: Resumo da ação molecular da agrotransformação, onde a *Agrobacterium tumefaciens* por meio da ativação do mecanismo de virulência com o reconhecimento da acetoseríngona infecta a célula fúngica com o T-DNA.
 FONTE: adaptado de DE OLIVEIRA et al., 2007.

Ainda em relação aos genes de virulência destaca-se os genes *vir*, divididos em sete *loci* (*virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virF* e *virG*) codificantes, considerados a maior parte dos genes de virulência da bactéria. A tradução destes genes produz a maquinaria necessária para a infecção via *Agrobacterium tumefaciens*. O gene *vir* e as sequências flanqueadoras são ativados quando há o reconhecimento dos compostos fenólicos como a acetoseríngona (DE OLIVEIRA, 2007; LACROIX; CITOVSKY, 2013; MICHIELSE et al, 2005).

Existem oito etapas moleculares da Agrotransformação (FIGURA 10), sendo elas: (1) *Agrobacterium tumefaciens* faz a ligação com a célula; (2) transferência do tDNA e das proteínas efetoras de virulência através da membrana plasmática para dentro da célula; (3) formação de complexos-T e super complexos-T para o carregamento pelo citoplasma; (4) ataque ao núcleo; (5) ligação do super complexo-T à cromatina; (6) remoção do super complexo para que haja a ligação do tDNA com o DNA do hospedeiro; (7) integração do tDNA com o DNA da célula; (8) expressão transgênica (GELVIN, 2010).

A introdução do tDNA apresenta diversos resultados possíveis, como a replicação parcial ou completa do tDNA, replicação autossômica ou integração no genoma (FRANSEN, 2011).

FIGURA 10 - ESQUEMA DE TRANSFERÊNCIA DE DNA DA *A. TUMEFACIENS* PARA O FUNGO



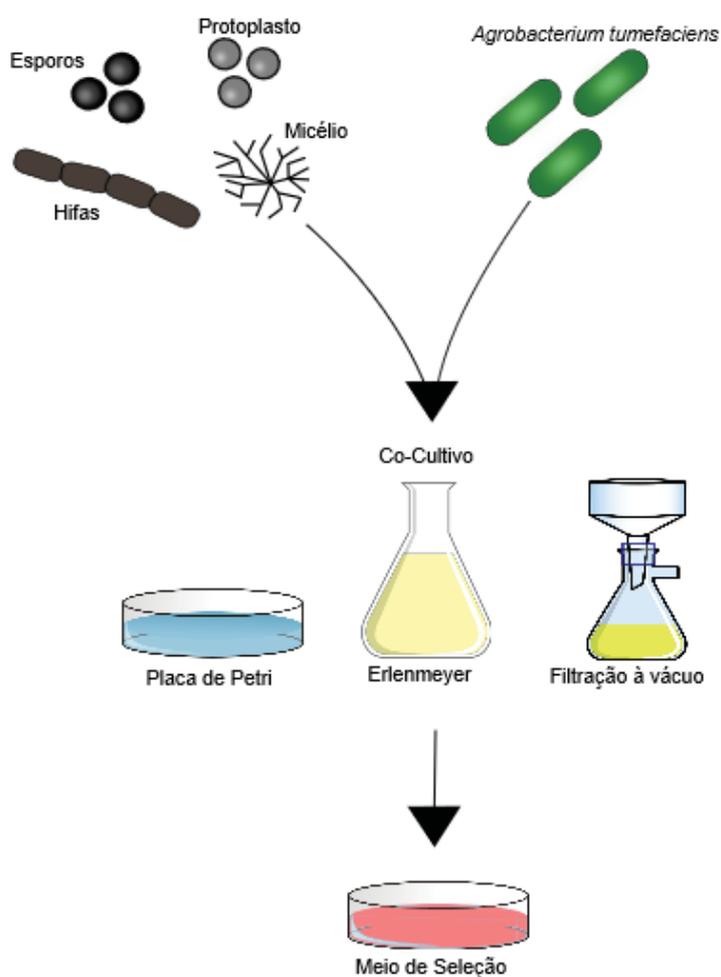
LEGENDA: A acetoseringona induz os genes Vir, codificadores da maquinaria responsável para a transferência de t-DNA. Com o reconhecimento da Acetoseringona, é feita a ativação dos genes de virulência VirA e VirG, a proteína ChvE (síntezada no cromossomo) interage com a VirA para aumentar os níveis de indução dos genes Vir e permitir que haja a entrada na célula bacteriana de acetoseringona e açúcares. A proteína VirA transfere seu grupo fosforilado a VirG, que por sua vez age como ativador transcricional para a fita única de t-DNA e para as proteínas VirC e VirD. A proteína VirD é separada em duas partes, VirD1 e VirD2, ambas se ligam as sequências repetidas e flangeadoras do t-DNA criando a fita T, para a transferência da fita T pela membrana bacteriana e parede celular fúngica é necessário o acoplamento das proteínas VirB1-11 e VirD4. A ativação destas cria uma reação em cadeia onde a proteína VirB forma um poro de transporte, este poro liga-se a VirD4 e faz a transferência para a célula. Além da passagem da fita T também a secreção de VirE2 que protege a sequência de nucleases. O VirD2 encaminha a fita T para o núcleo, uma vez dentro do núcleo há a integração com o DNA genômico. O mecanismo preciso da integração do t-DNA não é conhecido.
 FONTE: adaptado de MICHIELSE et al., 2005.

De um modo geral a agrotransformação consiste em diversos processos como os relatados na FIGURA 11. Esta técnica pode ser utilizada em diversos tipos de células; tais como, protoplastos, conídios, esporos, micélios vegetativos e corpos de frutificação. Concomitantemente, a preparação do inóculo fúngico inicial deve-se preparar a cultura de *A. tumefaciens* que deverá estar em crescimento exponencial para o co-cultivo, o qual consiste em colocar as células fúngicas e bacterianas purificadas para crescerem juntas e permitir que a fase

molecular de transmissão do t-DNA ocorra (ABUODEH et al., 2000; MICHIELSE et al, 2005).

A fase de co-cultivo determina a eficiência da TMAT e os fatores mais relevantes, são a duração do período, temperatura, pH do meio, razão entre fungo:*A. tumefaciens*. Após o período de co-cultivo, o material é transferido para o meio seletivo, onde somente os organismos agrotransformados sobrevivem (ABUODEH et al., 2000; MICHIELSE et al, 2005).

FIGURA 11 - ESQUEMA DA AGROTRANSFORMAÇÃO



LEGENDA: Simplificadamente a agrotransformação consiste na preparação e purificação das células bacterianas e fúngicas, em seu co-cultivo, ou seja, um período onde as duas culturas crescem unidas para que haja a transferência do DNA e a seleção dos transformantes.

FONTE: adaptado MICHIELSE et al., 2005.

A escolha de um parâmetro de seleção é essencial para o sucesso do TMAT. A partir desse parâmetro deverá ser possível eliminar células não transformadas. O parâmetro de seleção mais utilizado é a construção de uma sequência genética, conhecida como cassete, contendo o gene *hygromycin phosphotransferase* (*hph* – Higromicina fosfotransferase) que determina a resistência ao antibiótico higromicina B e assim, adotado como um parâmetro de seleção. O primeiro cassete de resistência construído continha os fatores binários de *Aspergillus nidulans* como o promotor do gene *glyceraldehyde dehydrogenase* (*gpdA*) e a sequência terminal do gene *anthranilate synthase* (*trpC*), este cassete é comprovadamente eficiente nos ascomicetos (FRANDSEN, 2011) e tem sido utilizado na maior parte dos experimentos de transformação em fungos (FRANDSEN, 2011; MICHIELSE et al., 2005).

A técnica apresenta uma alta reprodutibilidade, facilidade na execução e tem a capacidade de integrar o DNA de interesse ao DNA hospedeiro em lugares únicos. Sendo assim os experimentos envolvendo TMAT podem ser divididos em três grupos: i) *Forward genetics* (construção de bibliotecas de mutantes para rastreamento genético quanto aos efeitos fenotípicos); ii) *Reverse genetics* (introduções de mutações específicas e inserção de genes de interesse); iii) *Report genes* (inserção de genes marcadores (*GFP*, *GUS* e *DsRed*)) (BERNARDI-WENZEL; QUENCINE; AZEVEDO, 2016; FRANDSEN, 2011; MICHIELSE et al., 2005).

A inserção de um cassete envolvendo marcação visual (genes de fluorescência ou genes reporter como *GUS*, *GFP* e *DsRed*) no genoma do fungo ocorre de forma aleatória, sendo assim o mesmo pode causar diminuição do crescimento ou até a morte do microrganismo, tornando possível a caracterização fenotípica das colônias que cresceram no meio seletivo (FRANDSEN, 2011).

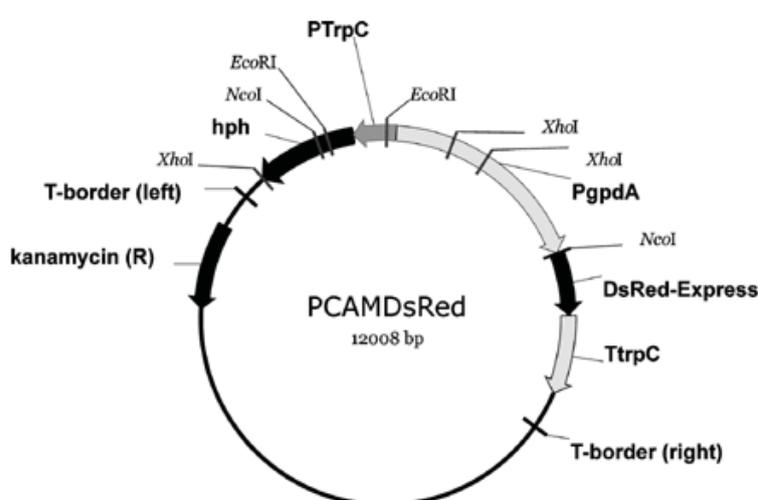
Os genes e as proteínas *reporter* são frequentemente usadas para monitorar o desenvolvimento de organismos ou marcação de células específicas. A proteína mais utilizada nesta técnica é o *GFP* (*Green Fluorescent Protein*) e não é necessário fazer a preparação dos extratos da proteína e ativação enzimática. O *GFP* se tornou mais atrativo por ser uma técnica não invasiva e de detecção não destrutiva das células (DALIO et al., 2016; JACH et al., 2001).

A proteína DsRed é homóloga ao GFP e ocorre naturalmente em recifes de corais. Esta proteína apresenta excitação máxima na faixa de 558 nm e emissão máxima aos 583 nm. O pico da clorofila ocorre aos 553 nm, mostrando assim a sua eficiência ao microscópio confocal e com fluorescência para a identificação de organismos marcados frente às células vegetais (NAHALKOVA; FATEHI, 2003).

A sequência gênica das proteínas reporter encontram-se em um cassete seletivo como mostrado na FIGURA 12, que exemplifica o plasmídeo pCAMDsRed, o qual contém a sequência do gene *DsRed*, o gene de resistência a higromicina (*hph*) e um gene de resistência a kanamicina; sendo o caráter de resistência a kanamicina utilizado para selecionar as bactérias competentes ao processo de agrotransformação (NAHALKOVA; FATEHI, 2003).

Muitas espécies de fungos patogênicos já foram geneticamente transformados utilizando esta técnica (MICHIELSE et al. 2005; LACROIX et al. 2013), tais como *Candida albicans*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Leptosphaeria maculans*, possibilitando assim a elucidação de seus potenciais de virulência, interações com plantas e outros organismos, cujo os resultados podem inferir ferramentas e ou desenvolvimento de métodos de controle de doenças (RODRIGUES, 2010).

FIGURA 12 - MAPA GENÉTICO DO PLASMÍDEO *pCAMDsRed*



LEGENDA: Constituintes do plasmídeo: gene de fluorescência *DsRed*; gene de resistência a higromicina *hph*; bordas flaqueadoras (T-border); genes de transmissão (*PTrpC*, *PgpdA* e *TtrpC*); e regiões codificadoras de enzimas de restrição (*XhoI*, *EcoRI* e *NcoI*).

FONTE: NAHALKOVA; FATEHI, 2003.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Neste estudo foi utilizada a linhagem *Fonsecaea pugnacius* CBS 139214 isolada de tecido cerebral humano e a linhagem transformada de *Fonsecaea erecta* (CMRP 3492) utilizada como controle. As espécies vegetais utilizadas como modelo para o estudo *in vitro* foram a *Mimosa pudica*, cujas sementes foram gentilmente cedidas pela EMBRAPA Amazônia Ocidental de em Manaus por meio da Pesquisadora Katia. Os espécimes de palmeira: *Bactris gasipaes* foram cedidos pela empresa Vivetech Agrociências em colaboração com o pesquisador Douglas Steinmacher e *Butia odorata*, cedida pela EMBRAPA Clima Temperado por meio da parceria com os Pesquisadores Leonardo Ferreira Dutra e Marisa Taniguchi da Universidade Federal de Pelotas. Para a espécie *Astrocaryum aculeatum*, foram utilizadas sementes cedidas pelo RECA (Associação dos Pequenos Agrossilvicultores do Projeto Reça e Cooperativa Agropecuária e Florestal do Projeto RECA) localizada em Porto Velho, Rondônia.

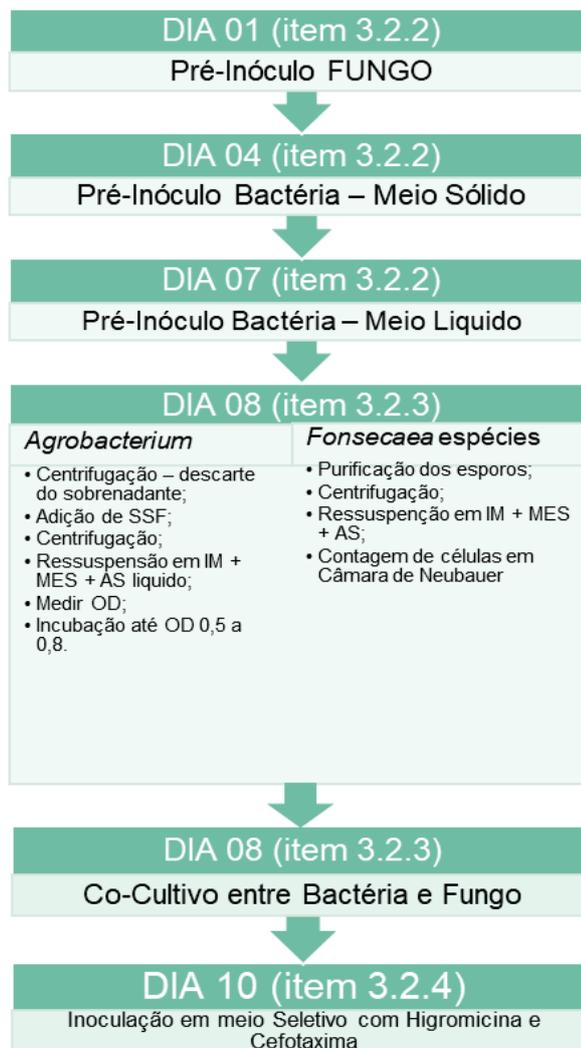
Para a agrotransformação foi utilizada a linhagem EHA105 da *Agrobacterium tumefaciens* com o plasmídeo *pAD1625*, este vetor contendo o gene de resistência à higromicina (gene marcador) e o de resistência à Ampicilina (FLORENCIO et al., 2018) e outra linhagem *A. tumefaciens* EHA105 contendo o plasmídeo *pCAMDsRed* que é composto pelo gene de expressão *DsRed* (gene reporter), gene da higromicina B fosfotransferase (gene marcador) e o gene da canamicina (resistência à canamicina) (DOS SANTOS et al., 2016).

3.2 AGROTRANSFORMAÇÃO DE *Fonsecaea pugnacius*

A metodologia adotada para a Agrotransformação da espécie *F. pugnacius* (CBS 139214) foi baseada na técnica descrita por FLORENCIO et al., 2018, em que os organismos *A. tumefaciens* e *F. pugnacius* foi inicialmente cultivado separadamente em meio líquido, LB e Caldo Batata, respectivamente, e incubados a 28°C por 7 dias em agitação de 200 rpm para a bactéria e 120

rpm para o fungo. Em seguida no item 3.2.3, e posterior crescimento em meio seletivo (item 3.2.4) conforme fluxograma da FIGURA 13.

FIGURA 13 - FLUXOGRAMA DE TRABALHO PARA A AGROTRANSFORMAÇÃO



FONTE: autora

3.2.1 TESTE DE SENSIBILIDADE À HIGROMICINA

O teste foi dividido em duas etapas. A primeira etapa consistiu no teste de sensibilidade da linhagem selvagem do fungo de interesse para o antibiótico Higromicina B, a fim de selecionar os organismos agrotransformados os quais eram re-inoculados em meio contendo higromicina para a confirmação do perfil de resistência obtido.

Para este ensaio, os fungos eram inoculados por meio de ponto único no Meio Agar Sabouraud acrescido de diferentes concentrações de Higromicina (25, 50, 75, 100 e 150 µL/mg), utilizando como controle negativo meio de cultura sem o antibiótico Higromicina B. Este ensaio foi realizado em duplicata e o material incubado à 28°C por 21 dias. A avaliação da inibição do crescimento foi realizada em 3, 7, 14 e 21 dias após a inoculação (FLORENCIO, et al., 2017; RODRIGUES, 2010).

3.2.2 PRODUÇÃO DO INÓCULO E CRESCIMENTO DA *Agrobacterium tumefaciens*

Para a produção dos inóculos, os fungos eram cultivados em Caldo Batata Dextrose (apêndice) e incubados por 7 dias, a 28°C e 200 rpm de agitação. Após o crescimento, os conídios eram purificados em lã de vidro e lavados com solução salina e o material resultante colocado em meio líquido de indução (apêndice). Após crescimento por 7 dias foi realizada a contagem dos esporos em *Câmara de Neubauer*. A concentração esperada de esporos foi de 10⁸ esporos/mL, para que a transformação fosse realizada em sua eficiência máxima.

Após o crescimento da bactéria *A. tumefaciens* em meio LB sólido foi realizado o inóculo em meio LB líquido (apêndice) com os respectivos antibióticos para a seleção dos plasmídeos inseridos na concentração de 50 µg/mL (pAD: ampicilina; pCAM: canamicina). Estas culturas foram incubadas *overnight*, a 28°C sob agitação. Após o crescimento, era realizada centrifugação por 5 minutos e o sobrenadante retirado. As células do *pellet* foram ressuspensas em 2 mL de meio de indução líquido (apêndice). A solução foi colocada em agitação a 28°C e 200 rpm, e o tempo nesta etapa foi definido pela quantidade de células existentes no meio, determinada por espectrofotometria UV-vis, onde o valor da absorbância deveria estar entre 0,5 e 0,8 para que a transformação ocorresse com maior eficiência.

3.2.3 CO-CULTIVO ENTRE AS LINHAGENS FÚNGICAS E DE *A. tumefaciens*

Para a realização do co-cultivo foram testadas 3 concentrações para o fungo e a bactéria, a fim de padronizar a condição ideal para a

agrotransformação. As concentrações testadas de bactéria:fungo foram de 1:1, 10:1 e 100:1, inoculados em 200 µL de meio de indução líquido (apêndice1). Após esta etapa, o co-cultivo foi transferido para o meio de indução sólido (apêndice) e incubado a 25 °C por 3 dias no escuro.

3.2.4 SELEÇÃO DOS FUNGOS AGROTRANSFORMADOS

Após os 3 dias do co-cultivo era realizada a raspagem da placa após a adição de um volume de 2 mL de solução salina, e o material transferido por meio de plaqueamento para o meio Agar Sabouraud (apêndice) contendo dois antibióticos: Cefotaxima (200 µM) e Higromicina B (50 µg/mL). A cefatoxima é o antibiótico seletivo para as linhagens de *Agrobacterium tumefaciens* contendo os plasmídeos. Estas placas foram incubadas no escuro a 25°C até o aparecimento de colônias fúngicas.

3.2.5 TESTE DE FLUORESCÊNCIA DAS LINHAGENS TRANSFORMADAS

O teste de fluorescência foi realizado de acordo BERNARDI-WENZEL; QUENCINE; AZEVEDO (2016), por meio da preparação de uma lâmina à fresco da linhagem em câmara escura e resguardada da luz por papel esta era visualizada no microscópio Olympus BX51 acoplado à Câmera DP72 com o filtro fluorescente a 545 nm.

3.2.6 ESTABILIDADE MITÓTICA DAS LINHAGENS TRANSFORMADAS

A estabilidade mitótica das linhagens transformadas foi realizada de acordo com Rodrigues (2010). As linhagens transformadas foram repicadas em meio *Sabouraud* não seletivo, ou seja, sem a Higromicina B, seguido de quatro repiques consecutivos em *Ágar Sabouraud*, em intervalo de tempo de 15 dias, sendo que o último repique era realizado em *Ágar Sabouraud* contendo Higromicina para a verificação da estabilidade mitótica.

3.2.7 ANÁLISE DAS LINHAGENS TRANSFORMADAS

Os protocolos foram realizados conforme Rodrigues, (2010). A comprovação da inserção do gene da Higromicina + *dsRED* foi feita ao microscópio ótico pela visualização da fluorescência e PCR específica, utilizando com os iniciadores flanqueadores do gene da Higromicina.

O protocolo de extração de DNA foi realizado de acordo com o VICENTE et al., 2013 tanto para *F. pugnacius* selvagem e linhagens agrotransformadas. De acordo com este protocolo, transferiu-se 1cm² de cultura de 14 a 21 dias para microtubos tipo Eppendorf® de volume 1,5 mL contendo a mistura sílica:celite (2:1) em 300 µL de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB). O conteúdo foi macerado com bastão de vidro por aproximadamente 5 minutos, seguido de adição de 200 µL de CTAB com posterior banho-maria a 65°C por 10 minutos. Em seguida, foi adicionado um volume de 500 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (CIA, 24:1), centrifugado à 16.000 g por 7 minutos e o sobrenadante transferido para novos microtubos. Este processo de precipitação foi repetido por duas vezes. Após a segunda centrifugação foram adicionados 800 µL de etanol 96% gelado e mantido por duas horas e/ou *overnight* à temperatura de -20°C. Na sequência, foi realizado uma centrifugação à 16.000 g por 7 minutos, o sobrenadante descartado e ao precipitado foi adicionado 500 µL de etanol 70% gelado e nova centrifugação à 16.000 g por 7 minutos e descarte do sobrenadante.

O precipitado foi desidratado e o DNA ressuspendido em um volume de 100 µL de água ultrapura. O microtubo contendo o DNA foi mantido em temperatura ambiente por 24 horas para completa hidratação. Após 24 horas, era realizada a quantificação e qualificação do DNA em Espectrofotômetro NanoDrop™ 2000/2000c e por meio da visualização em gel de agarose 1%.

Para a confirmação das linhagens transformadas foi realizada a PCR de acordo com o protocolo estabelecido por MALONEK, MEINHARDT (2001), utilizando os oligonucleotídeos iniciadores hp1 (5'-TTCGATGTAGGAGGGCGTGGAT-3') e hph2 (5'-CGCGTCTGCTGCTCCATACAAG-3') (MALONEK, MEINHARDT 2001), os quais flanqueiam o fragmento da sequência do gene do antibiótico higromicina presente no vetor de transformação. A reação de PCR foi realizada no

termociclador seguindo as seguintes condições: 95°C por 4 minutos, 94°C por 45 segundos, 60°C por 1 minuto, 72°C por 90 segundos, 72°C por 7 minutos, por 35 ciclos no termociclador da Applied Biosystems.

Os produtos de amplificação foram submetidos a uma corrida eletroforética em gel de agarose à 1,6%. O fragmento amplificado esperado era de 600pb e o marcador de peso molecular utilizado foi o Ladder Invitrogen 100 pb.

3.3 CULTIVO *in vitro* DOS ESPÉCIMES VEGETAIS

3.3.1 CULTIVO *in vitro* DA PLANTA *Mimosa pudica*

Inicialmente foram realizados os protocolos de assepsia e quebra de dormência das sementes da espécie *Mimosa pudica* de acordo com o previamente estabelecido na literatura (FORNARI et al., 2018; PAIVA, ALOUFA, 2009; SOUZA FILHO et al, 2001).

O processo de assepsia consistiu em três etapas. Na primeira etapa as sementes foram mantidas em fluxo de água autoclavada por 30 minutos. A segunda etapa consistiu da assepsia das sementes em etanol 70% durante 1 minuto sob a atmosfera de fluxo laminar. Em seguida, as sementes foram imersas em hipoclorito de sódio 5% (NaOCl) durante 10 minutos, seguidos de três lavagens em água destilada autoclavada.

Para a quebra de dormência das sementes assépticas da planta *M. pudica* foi utilizada a solução de Ácido Sulfúrico concentrado por 15 minutos sob agitação, e depois as sementes foram lavadas 5 vezes em água destilada autoclavada.

Após o processo de quebra da dormência, as sementes foram cultivadas em meio MS (MURASHIGE, SKOOG; 1962) modificado para a germinação de acordo com o protocolo estabelecido por FORNARI et al. 2018 (Apêndice). As plantas foram mantidas por 7 dias em sala de cultivo mantida a 28°C sob fotoperíodo artificial de 16 horas de luz e 8 horas no escuro. Após o período de germinação, as plântulas foram transferidas para o meio de cultivo Brasuz, este meio sólido utiliza as mesmas soluções do meio MS modificado (Apêndice). As plântulas foram mantidas a 23°C com foto período de 16/8 horas, transferidas para novo meio de cultivo a cada 60 dias.

3.3.2 CULTIVO *in vitro* DAS PALMEIRAS: *Astrocaryum aculeatum* (TUCUMÃ), *Bactris gasipaes* (PUPUNHA) E *Butia odorata* (BUTIÁ)

O cultivo *in vitro* da plantula pupunha foi realizado através da indução da embriogênese somática pela empresa Vivetech, por meio da utilização de tecidos não sexuais (caule, folha e raiz) visando induzir a formação de pseudo embriões zigóticos por meios específicos de indução, maturação e germinação e posterior produção de plântulas e plantas adultas (STEINMACHER et al., 2011). Após a introdução *in vitro*, era realizada a micropropagação destas plântulas em meio MS modificado (apêndice).

No caso da palmeira Butiá (*B. Odorata*), as plantas foram introduzidas *in vitro* via meristemal, cujos protocolos utilizados ainda não foram disponibilizados pela EMBRAPA para publicação, pois ainda se encontram em fase de desenvolvimento (comunicação pessoal com Leonardo Ferreira Dutra)¹

Além disso, foi testada a introdução *in vitro* da palmeira Tucumã (*A. aculeatum*) via germinação das sementes utilizando meio específico contendo reguladores vegetais, micro e macronutrientes (FORNARI et al., 2017).

Após a introdução *in vitro*, para a manutenção das plantas germinadas, as plântulas passaram do meio de transporte (FERREIRA et al., 2017) para o meio de cultura Brasuz (FORNARI et al., 2018) conforme apresentado no apêndice, mantido a 28°C com fotoperíodo de 14/8 horas e os meios eram trocados a cada 90 dias.

3.4 TESTES DE INFECÇÃO EM TECIDO VEGETAL

As linhagens agrotransformadas foram inoculadas nas plantas produzidas *in vitro*, conforme a adaptação do protocolo previamente estabelecido por FORNARI et al., 2018, em que foi preparada uma solução de esporos contendo 10^7 cels/mL de fungo e então realizada uma injúria no caule, próximo às áreas progenitoras de espinhos e injetado um volume de 10 µL da solução de inóculo.

¹ Protocolo gentilmente cedido e desenvolvido pelos pesquisadores Leonardo Ferreira Dutra e Marisa Taniguchi Satro cujo dados não estão disponíveis para publicação.

Para a visualização em microscópio de fluorescência foram adaptados os protocolos de Bernardi-Wenzel, Quencine, Azevedo (2016) e Coelho (2002), em que foram feitos cortes delgados no caule, para perfeita visualização em microscópio de fluorescência. Os fragmentos foram montados em lamínas de microscopia com a adição de lamínulas.

3.5 TESTES DE INFECÇÃO EM HOSPEDEIROS ANIMAIS

Os ensaios com hospedeiros animais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade federal do Paraná (CEUA-UFPR), e registrado sob o número 1179 e conduzidos com os critérios e normatização vigentes.

Um total de 15 camundongos machos da linhagem BALB/c com 8 a 12 semanas de vida, obtidos do Instituto Carlos Chagas (ICC), foram mantidos em ambiente livre de patógenos específicos (SPF) e alimentados com ração comercial irradiada. Os animais foram divididos em quatro grupos: Grupo I de controle de inoculação, sendo o controle negativo caracterizado pela injeção de 10 μ L da solução PBS e o controle positivo por uma solução de conídios a 10^7 cels/mL da linhagem selvagem de *F. pugnacius*, inoculados por meio da injeção no tecido previamente injuriado por meio de um corte com 3 milímetros de profundidade. Os grupos II, III e IV são diferenciados pelas espécies vegetais utilizadas na experimentação, conforme TABELA 01, em que os fragmentos vegetais (espinhos e porções do caule) foram inoculados nas regiões injuriadas por meio de uma pinça cirúrgica esterilizada. Para cada grupo (II, III e IV) foi causado o trauma com o espinho de planta sem a inoculação de *F. pugnacius* (tabela 1).

Após a infecção foram feitas análises visuais da lesão nos intervalos de 3, 7, 14 e 21 dias. Os animais foram sacrificados de acordo com critérios aprovados pela CEUA e as biopsias nos tecidos infeccionados ocorreram nos intervalos de 7, 14 e 21 dias.

A metodologia para a visualização das biopsias foi a estabelecida por FORNARI et al., 2018, em que as amostras foram fixadas em solução ALFAC contendo 80% de etanol, 40% de formalina e ácido acético glacial por 16 horas. Em seguida, as amostras passaram por uma sequência de desidratação,

imersão em parafina e posterior realização de cortes para a divisão do material em 5 fragmentos, os quais foram corados com hematoxilina-eosina e montados em lâminas de vidro contendo Entellan.

Em seguida, foi realizada observação ao microscópio ótico Olympus BX51 em aumento de 100x.

QUADRO 1 - GRUPOS EXPERIMENTAIS DO TESTE DE INFECÇÃO NO MODELO ANIMAL CAMUNDONGOS BALB/c

Animais - Grupo 1 (Controles de inoculação)	Animais - Grupo 2 (<i>Mimosa pudica</i>)
Controle Negativo - (solução de PBS) Controle positivo: A - Inóculo de 10 µL da solução de conídios a 10 ⁷ cel/mL da linhagem selvagem de <i>F. pugnacius</i> CBS 139214; B - Inóculo de 10 µL da solução de conídios a 10 ⁷ cel/mL da linhagem transformada de <i>F. pugnacius</i>	Animal 1 - infecção traumática com fragmentos do espinho da planta <i>Mimosa pudica</i> cultivada sem inóculo; Animais 2, 3 e 4: Infecção traumática com fragmentos de espinhos inoculados durante o cultivo da planta <i>in vitro</i> com inóculo*
Animais - Grupo 3 (<i>Bactris gasipaes</i>)	Animais - Grupo 4 (<i>Butia odorata</i>)
Animal 1 - infecção traumática com fragmentos do espinho da planta <i>Bactris gasipaes</i> cultivada sem inóculo; Animais 2, 3 e 4: Infecção traumática com fragmentos de espinhos inoculados durante o cultivo da planta <i>in vitro</i> com inóculo*	Animal 1 - infecção traumática com fragmentos do espinho da planta <i>Butia odorata</i> cultivada sem inóculo; Animais 2, 3 e 4: Infecção traumática com fragmentos do caule inoculados durante o cultivo da planta <i>in vitro</i> com inóculo*

LEGENDA: * 10 µL da solução de conídios a 10⁷cel/mL da linhagem transformada de *F. pugnacius*

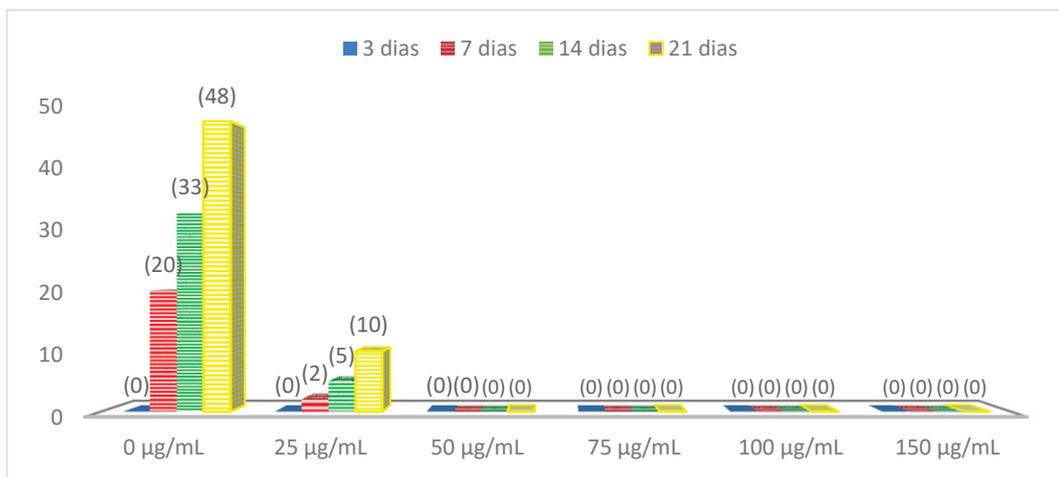
FONTE: autora.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AGROTRANSFORMAÇÃO DE *F. pugnacius* COM O GENE DE FLUORESCÊNCIA *DSRED*

Inicialmente foram realizados testes de sensibilidade à Higromicina da linhagem selvagem *Fonsecaea pugnacius* CBS 139214, a qual foi sensível à todas as concentrações testadas (25, 50, 75, 100 e 150 µg/mL) do antibiótico Higromicina B, marca seletiva do plasmídeo *pCAMDsRed* utilizado, sendo que a concentração inibitória mínima foi de 25 µg/mL (Gráfico 1). Este resultado corroborou estudos realizados anteriormente (FLORENCIO et al., 2018; VILLENA, 2018) para espécies de leveduras negras proximante relacionadas, tais como, *F. erecta*, *F. pedrosoi* e *F. monophora*, em que de acordo com os autores, a concentração de 25 µg/mL foi o suficiente para diminuir o crescimento destas espécies pela metade, enquanto que a concentração de 50 µg/mL promovia total inibição.

GRÁFICO 1 - PERFIL DE SENSIBILIDADE DA LINHAGEM 139214 DE *Fonsecaea pugnacius* À HIGROMICINA



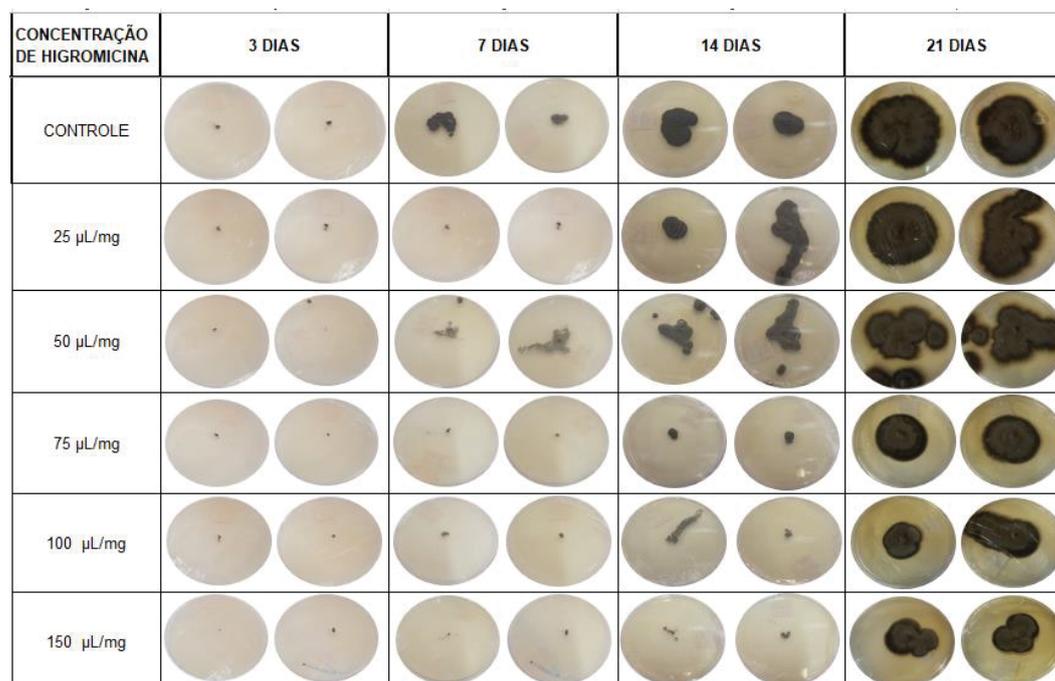
LEGENDA: As barras representam o crescimento da linhagem selvagem de *Fonsecaea pugnacius* frente as quatro concentrações de higromicina B testadas (0, 25, 50, 75, 100 e 150 µL/mg) (eixo x). Barras em azul - médias de crescimento no intervalo de 3 dias; Barras em vermelho - média do crescimento em 7 dias; Barras em verde – médias de crescimento no intervalo de 14 dias; Barras em amarelo – crescimento médio após 21 dias. Valor numérico das medidas em mm entre parênteses sob as barras (eixo y).

FONTE: autora.

A linhagem comprovadamente sensível à higromicina foi submetida ao processo de agrotransformação. Na etapa de co-cultivo foram testadas 3 concentrações de inóculo: 1:1, 10:1 e 100:1, sendo que na última concentração foram recuperadas 22 colônias. Um total de 7 colônias foram recuperadas na concentração de 1:1 e 14 colônias na concentração 10:1 bacteria:fungo. Estas concentrações foram estipuladas por FLORENCIO et al., 2018, e mostram a capacidade de infecção da *A. tumefaciens*. As colônias obtidas foram repicadas em meio ágar Sabouraud contendo o antibiótico Higromicina B em diversas concentrações, onde era visualizar somente o crescimento das colônias agrotransformadas (FIGURA 14).

A frequência de colônias sobreviventes no meio seletivo foi de 93,47%, ou seja, somente três colônias recuperadas das placas de co-cultivo não apresentaram crescimento no meio seletivo. De acordo com a literatura (DE OLIVEIRA, 2007; FLORENCIO, 2017; VILLENA, 2018) a frequência média de recuperação tem sido de 80% quando utilizados fungos similares, tais como as espécies de *Fonsecaea*, *Candida* spp. e *Fusarium* sp.

FIGURA 14 - TESTE DE SENSIBILIDADE À HIGROMICINA COM *F. pugnacius* MUTANTE



LEGENDA: Imagem comparativa da linhagem mutante de *F. pugnacius* nas concentrações de pré-estipuladas do antibiótico Higromicina B.
 FONTE: autora.

Na FIGURA 14 pode-se observar o perfil de resistência dos mutantes de *F. pugnacius* após a transformação com o plasmídeo *pAD1625* e plasmídeo *pCAMDsRed*. A partir dos resultados verificou-se um total de 43 colônias contendo o plasmídeo *pAD1625* e apenas 3 com o plasmídeo *pCAMDsRed*, as quais demonstraram crescimento até 150 µg/mL. Esta concentração tem sido relatada como a concentração ideal para a demonstração do crescimento de outros organismos transformados pelo mesmo método, tais como, *Candida* sp., *Fusarium* sp. e *F. pedrosoi* (FLORENCIO et al., 2018).

A maior eficiência de transformação da *F. pugnacius* usando o plasmídeo *pAD1625* pode estar associada ao fato do plasmídeo apresentar duas áreas promotoras (ABUODEH, et al., 2000): uma contendo a sequência dos genes *vir* (*virGN54D*), auxiliando na maquinaria da *A. tumefaciens* para a internalização do T-DNA na célula alvo, e ainda, o replicon *75Δ2* o qual promove alto número de cópias do plasmídeo em *A. tumefaciens*.

O número de transformantes foi baixo, quando comparado aos estudos de Florencio, (2017) e De Oliveira (2007), que obtiveram média de 200 e 500 transformantes respectivamente para *F. pedrosoi*. A baixa recuperação de transformantes pode ser explicada pela temperatura do co-cultivo, uma vez que essa pode variar entre 22°C a 25°C (MICHIELSE et al., 2005). A temperatura de 28°C, estabelecida por Villena, (2018) na transformação de *F. erecta*, porém também apresentou número inferior de transformantes comparados aos resultados de Florencio, (2017) e De Oliveira (2007) que utilizaram temperaturas de 24°C e 25°C respectivamente e obtiveram a média de 300 transformantes para as espécies de *F. pedrosoi* e *Fusarium* sp. e *Candida* sp.

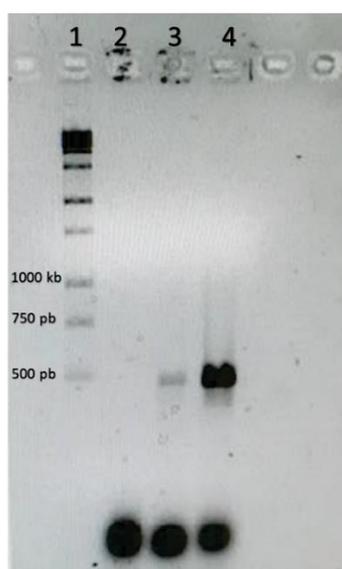
Outra hipótese para o baixo número de transformantes de *F. pugnacius* pode estar relacionada a técnica de co-cultivo, em que a linhagem bacteriana pode não ser capaz de formar o par conjugativo com as células fúngicas (DE OLIVEIRA, 2007; DUARTE et al., 2007 e LIMA et al., 2006.). Fato este, que pode ser explicado pela espessura e complexidade da parede celular melanizada do fungo, que pode interferir na formação do poro de transferência na célula alvo, dificultando a agrotransformação.

Ainda existe a possibilidade de que o baixo número de transformantes estar relacionado intimamente entre a estirpe da bactéria, pois a *A. tumefaciens* EHA105 não é a estirpe mais infectante, e ainda ao plasmídeo escolhido. A junção destes fatores

pode não ser completamente eficaz para a agrotransformação na espécie *Fonsecaea pugnacius*.

O teste de fluorescência das colônias transformadas com o plasmídeo *pCAMDsRed*, evidenciou que as mesmas demonstravam fluorescência logo após a transformação, porém após o teste de estabilidade mitótica as colônias deixaram de emitir fluorescência. De acordo com a literatura (ABOUL-SOUD et al., 2004) genes de fluorescência como o *DsRed* e o *GFP* expressam proteínas no citoplasma e ainda, estão ausentes nos núcleos dos fungos transformados, e além disso, a expressão da proteína fluorescente é variável entre os transformantes da mesma espécie. Uma das desvantagens da expressão com o *DsRed* é que a proteína sofre degradação pela luz. No entanto, em estudos utilizando *F. erecta* (VILLENA, 2018) foi observada fluorescência, mesmo após a estabilidade mitótica. FLORENCIO, 2017 obteve transformados para o gene *GFP* que não apresentaram fluorescência, porém quando analisados pela técnica de *Southern blot* apresentavam expressão da proteína *hph*, que tornava o organismo resistente à Higromicina B. Da mesma forma os mutantes obtidos no presente estudo demonstraram resistência à higromicina, com amplificação do gene *hph* por PCR-primer específico (FIGURA 15), mas não apresentaram fluorescência.

FIGURA 15 - PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO DO DNA TOTAL DAS CÉLULAS TRANSFORMADAS



LEGENDA: Eletroforese em gel de agarose 0,8% da PCR de confirmação dos transformantes resistentes à Higromicina B. Os números 3 e 4 correspondem aos transformantes 2 e 3 do plasmídeo *pCAMDsRed*, positivos para a resistência e estáveis mitoticamente. O 2 é o branco, controle negativo CBS 139214, organismo não transformado e nº1 o marcador molecular de 1 kb.
FONTE: autora.

Os testes de estabilidade mitótica revelaram que os 43 mutantes eram estáveis e resistentes à higromicina, diferentemente da linhagem selvagem. O crescimento em meio seletivo das linhagens transformadas foi mais rápido que a linhagem selvagem, corroborando com o estudo de DE OLIVEIRA, (2007) em que foi observada a diminuição de dias no desenvolvimento das linhagens.

A confirmação molecular para o genótipo de resistência foi observada através da amplificação do fragmento de 600 pb correspondente ao gene *hph* em todos os transformantes analisados (FIGURA 15), confirmando assim, a presença do T-DNA (cassete da Higromicina) no genoma das células fúngica transformadas utilizando o plasmídeo *pAD1625* e o plasmídeo *pCAMDsRed*.

Desta forma, foram selecionados aleatoriamente para o teste de virulência em plantas e hospedeiros animais duas linhagens transformadas contendo a marcação seletiva do plasmídeo *pAD1625* e duas linhagens transformadas contendo o gene de fluorescência do plasmídeo *pCAMDsRed*.

4.2 TESTES DE VIRULÊNCIA EM PLANTAS, UTILIZANDO COMO HOSPEDEIROS *Mimosa pudica* E AS ESPÉCIES DE PALMEIRAS PUPUNHA (*Bactris gasipaes*) E BUTIÁ (*Butia odorata*)

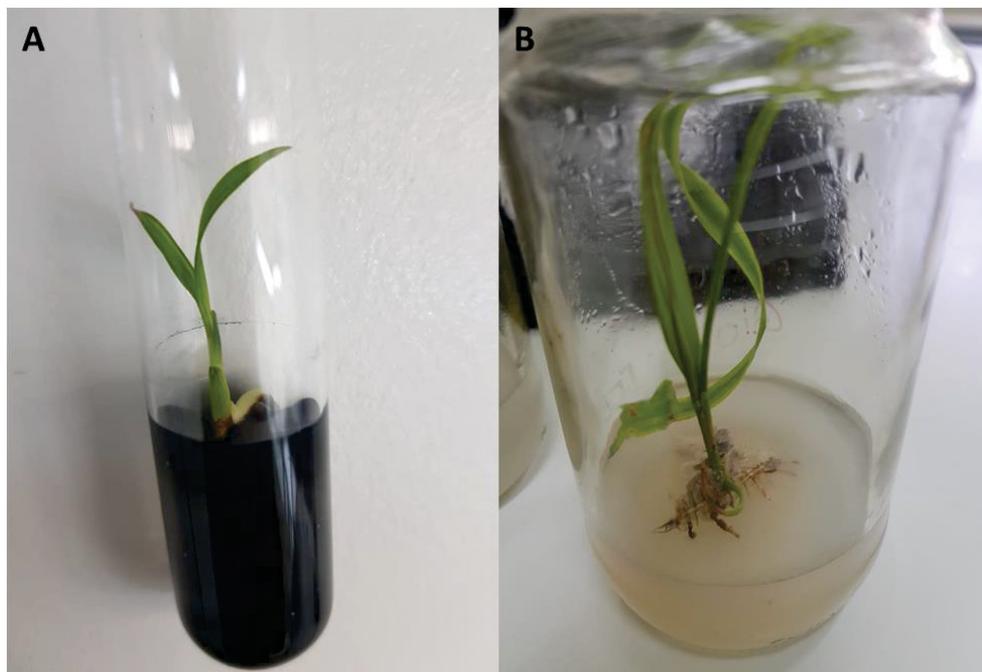
Para este estudo foram inicialmente testadas três palmeiras da Família *Arecaceae* (palmeiras) utilizando como critério inicial os aspectos epidemiológicos da doença. Os espécimes de plantas selecionados para este trabalho foram *Astrocaryum aculeatum*, *Bactris gasipaes*, *Butia odorata* e *Mimosa pudica*.

Estudos epidemiológicos demonstraram que plantas com espinhos tem sido fortemente associada como fontes de trauma e infecção (QUEIROZ-TELLES et al., 2017; SALGADO et al., 2004; SILVA et al., 1995). A espécie de palmeira (*Arecaceae*), *A. aculeatum* (Tucumã) foi selecionada a fim de reproduzir um hospedeiro vegetal associado à ecoepidemiologia da doença (DE HOOG et al., 2007; VICENTE et al., 2013). As sementes (enviadas de Rondônia) apresentavam extensa contaminação por fungos hialinos, possivelmente devido ao tempo de transporte. Raspagens do mesocarpo da semente foram realizadas e em seguida de descontaminação com ácido clorídrico, entretanto nenhuma das 30 sementes permaneceram viáveis.

A escolha inicial da palmeira tucumã foi feita com base na sua distribuição em áreas endêmicas da doença e por esta possuir alta densidade de espinhos em seu caule e estirpe (SAGRILLO et al, 2015). Devido a inviabilidade das sementes, optou-se por outro modelo vegetal de características morfológicas similares ao tucumã, *B. odorata* (Butiá).

A palmeira *B. odorata* é popularmente conhecida por Butiá e apresenta boa climatização e é de ocorrência da regional sul do Brasil (HAUBERT et al., 2018). Os espécimes de butiá (FIGURA 16) foram recebidos pela EMBRAPA-Florestas nos estágios iniciais da cultura *in vitro*, e assim, foram necessários cerca de 90 dias para que a plântula tivesse porte para a inoculação. O parâmetro para o início da inoculação adotados nas outras espécies, ou seja, o aparecimento dos espinhos, não puderam ser utilizados pois a mesma não apresentou espículas visíveis durante o período de cultura *in vitro*. De acordo com o estudo de FIOR, 2011 e FERREIRA et al., 2017, quando introduzido *in vitro* o butiá apresenta somente folhas primárias, o que justifica o não aparecimento de espículas e espinhos, os quais somente aparecem na raque das folhas definitivas (FIOR, 2011).

FIGURA 16 – ASPECTOS DA PALMEIRA *Butia odorata* INTRODUZIDA *IN VITRO*

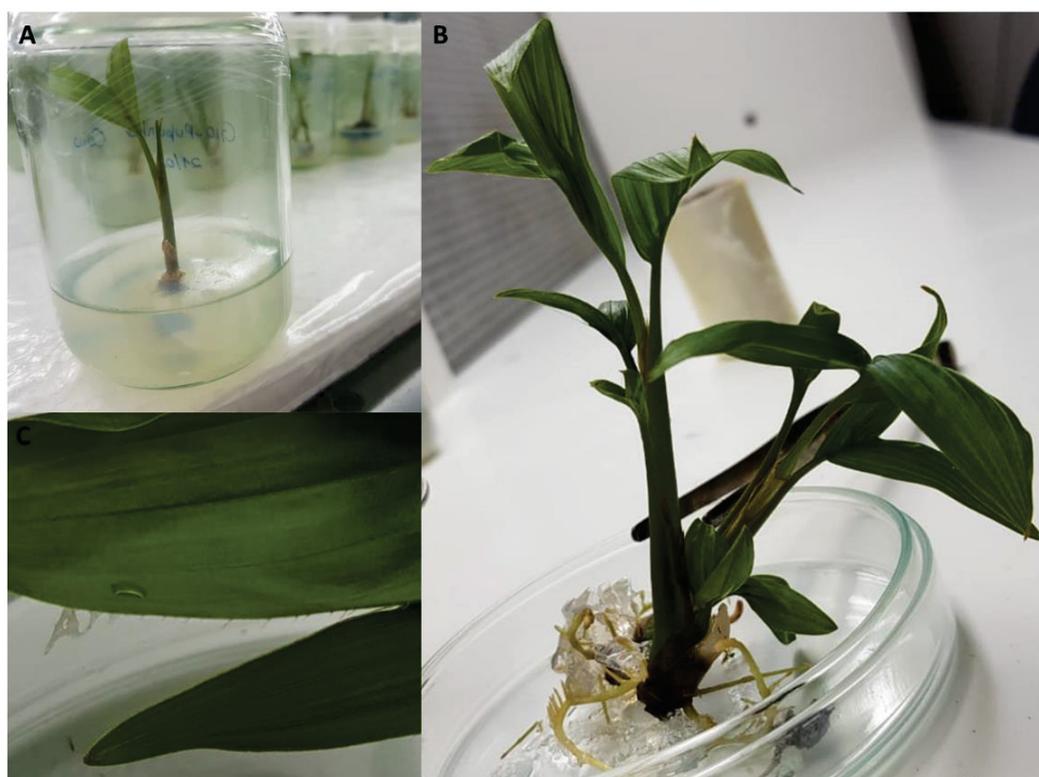


LEGENDA: Imagem A corresponde as plântulas como foram enviadas da EMBRAPA Clima temperado e a imagem B as plântulas com 45 dias
FONTE: autora.

A palmeira *B. gasipaes* (pupunha) (FIGURA 17) foi a terceira espécie testada, a qual é considerada a melhor palmeira desta família para a introdução *in vitro* (MATOS et al., 2018). Estudos anteriores de infecção em plantas com leveduras negras reportaram resultados positivos quanto a introdução *in vitro* (STEIMACHER et al., 2011) e infecção (FORNARI et al., 2018).

Com cerca de 90 dias de cultivo na EMBRAPA Florestas, foi observado a presença de espículas nas folhas FIGURA 17C, e de acordo com HERINGER (2013), o seu aparecimento prematuro dos espinhos indica que as plântulas já apresentavam defesas aos predadores enquanto jovens. Esta característica foi utilizada como critério para iniciar a inoculação nos espécimes.

FIGURA 17 - ASPECTOS DA PALMEIRA *Bactris gasipaes* INTRODUZIDA *IN VITRO*



LEGENDA: (A) pupunha *in vitro* com cerca de 7 cm; (B) plântula com cerca de 90 dias onde é possível visualizar as pequenas espículas (C).

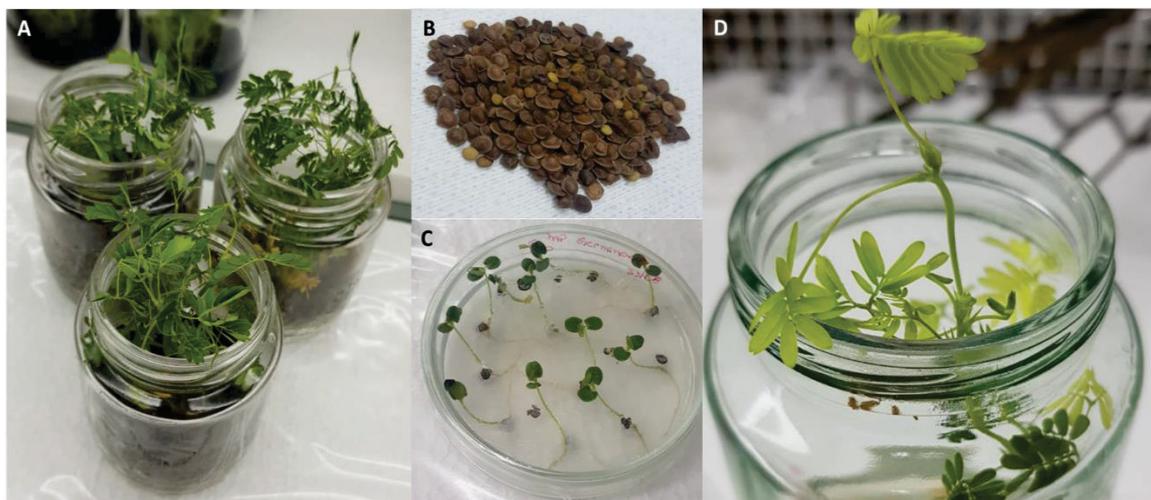
FONTE: A, B e C: autora.

Em relação à planta *Mimosa pudica* (Dormideira) (FIGURA 18) foi realizada a introdução *in vitro*, obtendo cerca de 98% de germinação. Após 120 dias notou-se que a eficiência da germinação foi reduzida a 50%, considerado esperado pelo

envelhecimento e morte das sementes. Estudos de introdução *in vitro* da planta (BIANCHETTI et al., 2017) mostram que a taxa germinativa desta espécie diminui conforme o tempo de colheita, devido a possíveis contaminações e/ou diminuição da oferta de nutrientes.

Por ser tratar de uma erva-daninha de rápido crescimento, foi notado que em 21 dias a plântula formada apresentava espículas aparentes enquanto que na planta pupunha, as espículas somente eram visíveis aos 90 dias de crescimento FIGURA 18D.

FIGURA 18 – ASPECTOS DA PLANTA *Mimosa pudica* INTRODUZIDA *IN VITRO*



LEGENDA: (A) Dormideira adulta, desenvolvida e capaz de realizar os movimentos foliares; (B) Sementes; (C) Germinados em meio específico com 3 dias; (D) Dormideira com 21 dias, espículas formadas das regiões de formação de novos caules.

FONTE: autora.

Com base nos dados obtidos neste estudo as palmeiras e a dormideira se mostraram modelos adequados para estudar os mecanismos de infecção dos agentes causais de micoses de implantação. Estas plantas mostraram-se estáveis *in vitro*, de fácil manutenção e com protocolos de introdução previamente desenvolvidos. A dormideira e a pupunha apresentam espículas, progenitores dos espinhos na cultura *in vitro*, critério este adotado para a inoculação fúngica. A palmeira butiá, não apresentou o desenvolvimento de espículas, mas conforme estudos de morfologia da família *Arecaceae* e gênero *Butia* foi possível identificar onde possivelmente se formariam as espículas e assim, realizar a inoculação nestes locais.

Os testes de inoculação nas plantas revelaram que a linhagem *F. pugnacius* transformada foi capaz de se desenvolver nos três espécimes vegetais testados (FIGURA 18A), em que foi possível visualizar o crescimento nos tecidos próximos a cutícula, como demonstrado anteriormente por FORNARI et al., 2018 e VILLENA, 2018. As espécies do gênero *Fonsecaea* associadas à infecção em hospedeiros humanos se desenvolviam no interior do tecido das plantas, porém em regiões mais externas, próximos a cutícula, quando comparado com fungos endofíticos destas plantas. Além disso, foi observada pelos autores a formação de hifas e liberação de esporos próximo ao local de inoculação demonstrando a habilidade destes agentes em se desenvolver dentro do vegetal (FORNARI et al., 2018). Quando estes fungos eram inoculados através do meio de cultura *in vitro* das plantas, as referidas espécies cresciam nos espaços intercelulares apenas, sem demonstrar crescimento em tecidos vasculares. Com base nestes estudos FORNARI et al., 2018 propuseram como modelo hipotético que as espécies clínicas de *Fonsecaea* permanecem na derme, tecido responsável pela formação dos espinhos, justificando a relação entre os espécimes vegetais e a inoculação traumática dos agentes causais de cromoblastomicose.

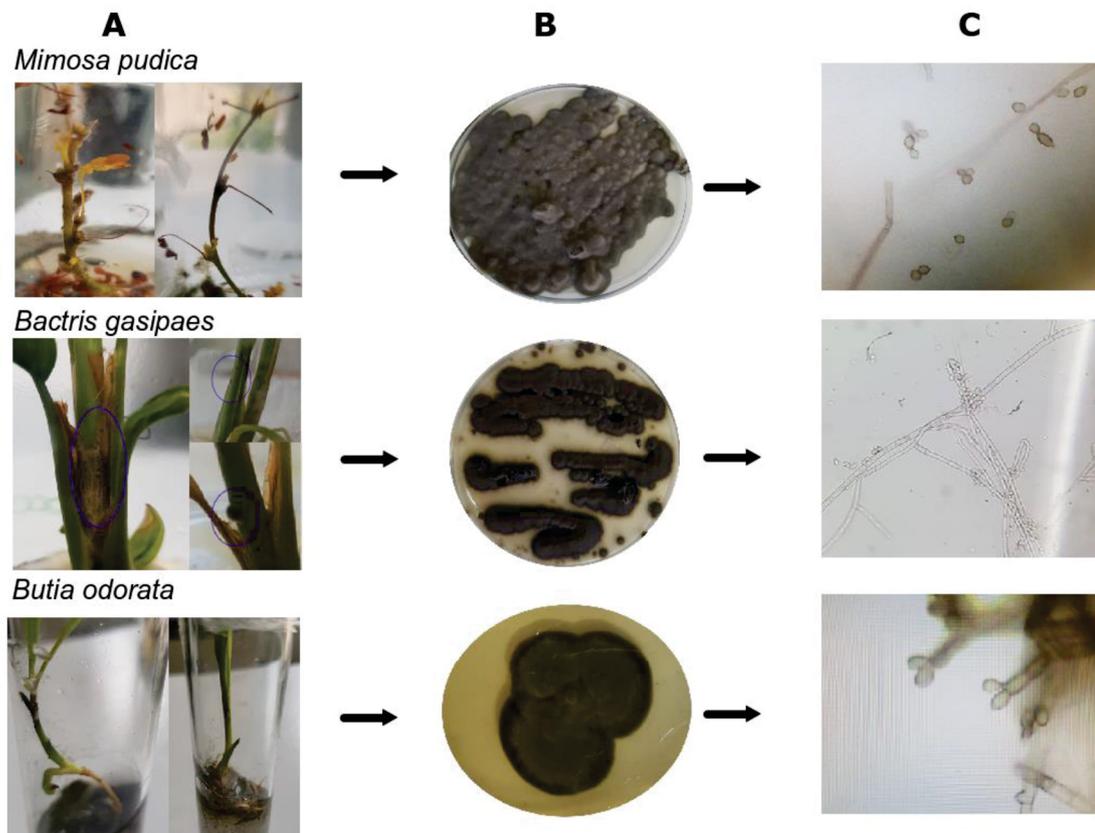
As linhagens transformadas inoculadas nas três diferentes espécies vegetais apresentaram desenvolvimento muito semelhante, mostrando que a presença do fragmento T-DNA não interfere na expressão dos fatores de virulência e adaptação de *F. pugnacius* ao material vegetal. Em todos os espécimes vegetais inoculados com as linhagens transformadas foi possível observar a recuperação do patógeno, por meio de cultivo em ágar Sabouraud dos cortes (FIGURA 19).

O crescimento de colônias negras nos tecidos de caules das três espécies de vegetais foi observado a olho nu (FIGURA 19A), confirmado posteriormente, pelo crescimento de colônias negras em ágar Sabouraud, proveniente do inóculo dos espinhos e caule (19B). Após o isolamento utilizando meio seletivo (Agar Sabouraud contendo Higromicina – apêndice) pôde-se observar um crescimento lento da linhagem transformada em relação ao seu desenvolvimento em meios de cultura. Entretanto, este resultado demonstra que a linhagem transformada com o plasmídeo *DsRed*, apresenta a capacidade de crescimento em hospedeiros vegetais e pode ser utilizada em estudos de monitoramento.

As colônias isoladas das plantas inoculadas eram purificadas e caracterizadas com base nas características morfológicas (macro e micro morfologia) e identificação

molecular, através do sequenciamento do gene ITS e PCR *primer* específico para o gene *hph* recomendados para a confirmação da espécie *F. pugnacius*.

FIGURA 19 – MODELOS DE INFECÇÃO DE *F. pugnacius* EM TECIDOS VEGETAIS



LEGENDA: A- espécimes vegetais inoculados pelas linhagens transformadas de *Fonsecaea pugnacius* indicando sinais de crescimento fungico; B- colônias isoladas caules das plantas infectadas através do meio seletivo agar *Sabouraud* contendo Higromicina; C estruturas de frutificação característicos de *F. pugnacius* identificadas por meio de microscopia (Microscópio Optico 100x).

FONTE: autora.

Os espinhos da planta *M. pudica* infectada pela linhagem transformada de *F. pugnacius* foram extraídos e inoculados em meio seletivo com higromicina B. Do total de 20 espinhos, *F. pugnacius* foi recuperada em apenas 3 amostras, sendo estes selecionados para realização do teste em modelo animal. No entanto, todas nas amostras de caule apresentaram crescimento de colônias negras identificadas como *F. pugnacius*, indicando que o avanço do inóculo para as regiões de folhas e espículas pode ocorrer após um longo período de tempo.

Nos espécimes da planta pupunha (*B. gasipaes*) foi observada morte precoce das folhas após a injúria e infecção (FIGURA 19). Este material foi fracionado e

utilizado para infecção no modelo animal. Em relação à palmeira *Butia odorata*, o fungo se estabeleceu nos tecidos externos de revestimento de caule (FIGURA 19), que foram removidos e selecionados para a inoculação nos modelos animais.

Os resultados mostraram que a espécie *F. pugnacius* foi capaz de se adaptar e sobreviver nos tecidos vegetais, apesar de ser considerada um patógeno humano restrito, mesmo após a inserção de genes externos por agrotransformação. A referida adaptação vegetal está relacionada à ancestralidade da espécie, uma vez que por serem considerados organismos extremófilos, utilizam de mecanismos de sobrevivência em diferentes tecidos hospedeiros, como algumas espécies do gênero *Fonsecaea*, *F. minima* e *F. erecta*, que ainda não foram encontradas em hospedeiros animais (QUEIROZ-TELLES et al., 2017; VICENTE et al., 2013;2018).

4.3 TESTES DE INFECÇÃO EM HOSPEDEIROS ANIMAIS

Dados epidemiológicos da doença cromoblastomicose sustentam a hipótese de inoculação traumática por espinhos ou partes vegetais afiadas, causando uma lesão na pele, porta de entrada para as leveduras negras (SALGADO et al., 2004; SILVA et al., 1995; VICENTE et al., 2008; 2013). Estudos envolvendo cortes histológicos das lesões dos pacientes (SHEIKH et al., 2007; TSCHEN et al., 1984; WEEDON et al., 1979) mostram partes vegetais em seu interior, provando a rigidez dos espinhos e afirmando que na grande maioria das lesões que ocorrem com material vegetal, partes do espinho ficam na derme do paciente.

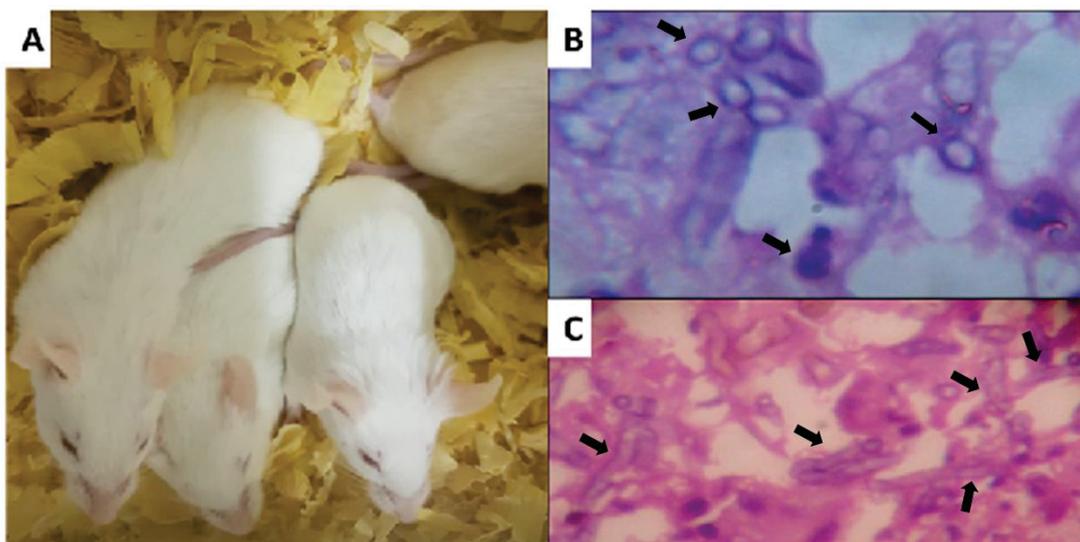
Neste estudo, observou-se que os espinhos procedentes de plantas cultivadas *in vitro* não eram rígidos o suficiente para gerar inoculação profunda no tecido do hospedeiro. Tal fato justifica a injúria prévia realizada à implantação das espículas no tecido do hospedeiro animal.

Os testes de inoculação em camundongos da linhagem BALB/c, ainda em andamento, demonstraram reações teciduais de hiperemia independente da amostra inoculada, provavelmente provocados pelo processo inflamatório da injúria tecidual. A maioria das amostras de tecido coletado por meio de biópsia no intervalo de dias 3 e 7 após a infecção, não apresentavam fungos no exame direto e nem na cultura. No entanto, um dos animais inoculados com fragmento da palmeira pupunha inoculado com a linhagem transformada contendo o gene *DsRed*, apresentou reação inflamatória seguida de agravamento da lesão, a qual apresentava sinais ulcerativos e de crescimento diferenciado a partir do terceiro dia da inoculação, com progressão

de gravidade a partir do sétimo dia. Os testes de infecção em modelo animal ainda estão em andamento e assim não foi possível inferir a respeito do potencial de virulência das diferentes linhagens transformadas em comparação com a linhagem selvagem.

Nas imagens da biopsia realizada no animal com inoculação do espinho de *B. gasipaes* infectado com *F. pugnacius* contendo o gene de fluorescência *DsRed*, foi possível a visualização de pequenos esporos negros em meio ao tecido do hospedeiro animal (FIGURA 20). Este resultado, ainda em estágio preliminar, se mostrou promissor, visto que a biopsia realizada com apenas sete dias de infecção possibilitou a visualização de estruturas fúngicas. FORNARI et al., 2018, também realizaram testes de virulência para espécies do gênero *Fonsecaea*, por meio da inoculação via peritônio. Nos cortes histológicos com 30 dias de inoculação os autores observaram crescimento avançado das estruturas fúngicas e formação de estruturas septadas acastanhadas similares aos corpos muriformes observados em humanos.

FIGURA 20 - VISUALIZAÇÃO DA BIOPSIA DO CAMUNDONGO BALB/c



LEGENDA: (A) Camundongos BALB/c machos; (B e C) Imagens da biopsia coradas com hematoxilina-eosina, células escurecidas não pigmentadas estão presentes no tecido
FONTE: autora.

Resultados como os apresentados na figura 20B e 20C corroboram com as hipóteses de que a rota de infecção da cromoblastomicose pode ocorrer via trauma causado com materiais vegetais (FORNARI et al., 2018; SALGADO et al., 2004; VICENTE et al., 2013). Esta hipótese é fortalecida por estudos onde há o isolamento

de leveduras negras de fontes ambientais (COSTA et al., no prelo; SALGADO et al., 2004; VICENTE et al., 2013; DE HOOG, et al., 2007)

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir deste estudo foi possível estabelecer novas ferramentas para avaliar a interação de agentes de cromoblastomicose com hospedeiros vegetais e animais, fornecendo subsídios para elucidação dos nichos ambientais e conseqüentemente rotas de infecção. Para isto, foi estabelecido um modelo de agrotransformação baseado em FLORENCIO et al., 2018 da espécie *F. pugnacius*, recentemente descrita por DE AZEVEDO et al. 2015, como agente causal da doença a qual foi relacionada a uma evolução clínica diferenciada, quando comparado com outras espécies agentes causais da doença, sendo associada à um caso de disseminação cerebral.

Os ensaios de inoculação de linhagens transformada em tecidos vegetais utilizando como modelo plantas epidemiologicamente associadas a infecção traumática da doença mostraram a habilidade dos mutantes analisados de sobreviver dentro dos tecidos vegetais. Resultados preliminares mostram que fragmentos vegetais vindos de da palmeira *Bactris gasipaes* promoveram infecção traumática indicando assim um caminho para a elucidação do processo de lesão de implantação. No entanto devido não evolução clínica das lesões novos ensaios deverão ser realizados.

Existem uma série de hipótese quanto ao caminho evolutivo para a adaptação destes agentes em hospedeiros animais. Neste contexto, FORNARI et al., 2018 demonstrou que as espécies do gênero *Fonsecaea* são oportunistas e não patógenos primários, sugerindo que estes organismos modificam seu metabolismo de acordo com as condições ambientais que são expostas. FLORENCIO et al., 2018 foi um dos primeiros trabalhos a demonstrar a transformação no gênero entretanto, este trabalho foi o primeiro a avaliar a capacidade adaptativa das linhagens transformadas.

DE HOOG et al., 2018 descreve modelos de oportunismo na infecção ambiental, de modo que fungos ambientais se desenvolvem em hospedeiros animais porque apresentam algum tipo de mecanismo de sobrevivência que também é necessário para se tornarem patógenos, ou seja, apresentam um mecanismo de virulência capaz de se adaptar aos diferentes ambientes. Fungos estritamente patógenos, como a *F. pugnacius*, também podem se adaptar a sobrevivência ambiental. Este trabalho representa uma ferramenta promissora para testar tal hipótese.

Quanto às perspectivas futuras deste trabalho são continuar desenvolvendo estudos para a *Fonsecaea pugnacius*, a fim de entender seu potencial de virulência e ecologia, utilizando linhagens marcadas, ou seja, organismos transformados, estes, representam um potencial para os estudos de rota de infecção.

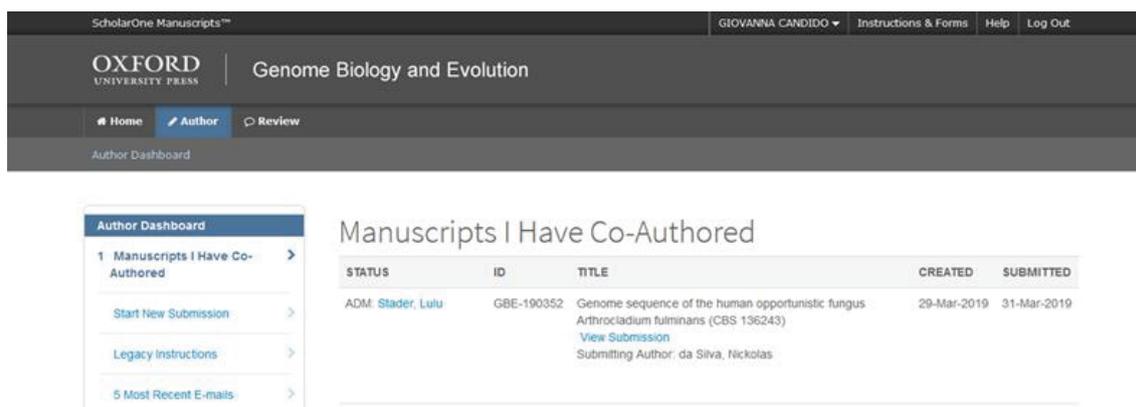
ARTIGOS SUBMETIDOS

Durante os dois anos de mestrado foram feitas diversas parcerias e produções como o artigo submetido à revista *Genome biology e Evolution*:

Genome sequence of the human opportunistic fungus *Arthrocladium fulminans* (CBS 136243)

Leandro Ferreira Moreno^{1, 2,3†}, Nickolas Menezes da Silva^{4†}, Raphael L. C. dos Santos⁸, Flavia de Fátima Costa⁴, Vania Aparecida Vicente^{3,4*}, Renata R. Gomes³, Benjamin Stielow¹, Giovanna Z. Candido³, Juliana V. Bittencourt⁶, Luciano Medina Macedo^{6,4}, Emanuel M. Souza⁷, Valter Baura⁷, Eduardo Balsanelli⁷, Sybren de Hoog^{1,2,3,5*}

Com a comprovação de submissão a seguir:



ScholarOne Manuscripts™ GIOVANNA CANDIDO ▾ Instructions & Forms Help Log Out

OXFORD UNIVERSITY PRESS | Genome Biology and Evolution

Home Author Review

Author Dashboard

Author Dashboard

1 Manuscripts I Have Co-Authored

- Start New Submission
- Legacy Instructions
- 5 Most Recent E-mails

Manuscripts I Have Co-Authored

STATUS	ID	TITLE	CREATED	SUBMITTED
ADM: Stader, Lulu	GBE-190352	Genome sequence of the human opportunistic fungus <i>Arthrocladium fulminans</i> (CBS 136243) View Submission Submitting Author: da Silva, Nickolas	29-Mar-2019	31-Mar-2019

E ainda, três artigos em fase de finalização da escrita:

Environmental occurrence of pathogenic fungi based on metagenomic of the cropped soils from the Cerrado biome in Brazil

Flávia de Fátima Costa¹, Renata Carolini de Souza², Morgana Ferreira Voidaleski³, Amanda Bombassaro³, Giovanna Zuzarte Candido³, Nickolas Menezes da Silva¹, Diogo Robl⁴, Leandro Ferreira Moreno¹, Roberto Tadeu Raittz⁵, Mauro Antonio Alves de Castro⁵, Renata Rodrigues Gomes³, Luciano Medina Macedo⁶, Juliana Vitória Messias Bittencourt⁶, Sybren de Hoog^{3,7,8}, Mariangela Hungria², Vania Aparecida Vicente^{1,3*}

Sugarcane as a source of Chaetothyriales fungi

Flávia de Fátima Costa¹, Morgana Ferreira Voidaleski², Giovanna Zuzarte Candido², Rafael Soares Correa de Souza³, Paulo Arruda^{3,4}, Derlene Attili Angelis⁵, Bruna Jocomel Favoreto de Souza Lima², Jade Mariane Barbosa Soares⁶, Leandro Ferreira Moreno^{2,7,8}, Amanda Bombassaro², Nickolas Menezes da Silva¹, Renata Rodrigues Gomes², Flávio Queiroz-Telles^{2,9}, Roberto Tadeu Raittz¹⁰, Mauro Antonio Alves de Castro¹⁰, Sybren De Hoog^{2,7,8}, Vania Aparecida Vicente^{1,2*}

Environmental isolation of *Fonsecaea pedrosoi* and pathogenic potential analysis using two animal models

Bruna Jacomel Favoreto de Souza Lima¹, Morgana Ferreira Voidaleski¹, Renata Rodrigues Gomes¹, Gheniffer Fornari², Jade Mariane Soares Barbosa³, Amanda Bombassaro¹, Gabriela Xavier¹, Bruna Soley⁴, Giovanna Zuzarte Candido¹, Conceição de Maria Pedrozo e Silva de Azevedo⁵, Cristiano Menezes⁶, Leandro Ferreira Moreno⁷, Débora do Rocio Klisiowicz¹, Sybren de Hoog^{7,8}, Vânia Aparecida Vicente¹

REFERÊNCIAS

- ABOUD-SOUD, M. A.; YUN, B-W.; HARRIER, L. A.; LOAKE, G. J. Transformation of *Fusarium oxysporum* by particle bombardment and characterisation of the resulting transformants expressing a GFP transgene. **Mycopathologia**. 158(4):475-82, 2004.
- ABUODEH, R. O.; ORBACH, M. J.; MANDEL, M. A.; DAS, A.; GALGANI, J. N. Genetic Transformation of *Coccidioides immitis* Facilitated by *Agrobacterium tumefaciens*. **The Journal of Infection Diseases**, 181: 2106-10, 2000.
- AHMAD, H.; SEHGAL, S.; MISHRA, A.; GUPTA, R. *Mimosa pudica* L. (Laajvanti): An overview. **Phcog Rev**;6:115-124, 2012.
- AHMED, S. A.; DESBOIS, N.; QUIST, D.; MIOSSEC, C.; ATOCHE, C.; BONIFAZ, A. DE HOOG, G. S. Phaeohyphomycosis Caused by a Novel Species, *Pseudochaetosphaeronema martinelli*. **Journal of Clinical Microbiology**, Volume 53 Number 9, September 2015.
- AJELLO, L. The black yeasts as disease agents: historical perspective. **Bull Pan Am Health Organ** E(4), 1978.
- AMADOR-VARGAS, S.; DOMINGUEZ, M.; LEÓN, G.; MALDONADO, B.; MURILLO, J.; VIDES, G. L. Leaf-folding response of a sensitive plant shows context-dependent behavioral plasticity. **Plant Ecology**. 2014.

BADALI, H.; GUEIDAN, C.; NAJAFZADEH, M. J.; BONIFAZ, A.; VAN DEN ENDE, A. H. G. G.; DE HOOG, G. S. Biodiversity of the genus *Cladophialophora*. **Studies in Mycology**. v. 175–191, 2008.

BAO, T.; ROY, G.; CAHILL JR., J. F. Photosynthetic opportunity cost and energetic cost of a rapid leaf closure behavior in *Mimosa pudica*. **American Journal of Botany** 105(9): 1491–1498, 2018.

BARBOSA, J. D.; DA SILVEIRA, J. A. S.; ALBERNAZ, T. T.; SILVA E SILVA, N.; REIS, A. dos S. B.; OLIVEIRA, C. M. C.; RIET-CORREA, G.; DUARTE, M. D. Lesões de pele causadas pelos espinhos de *Mimosa pudica* (Leg. *Mimosoideae*) nos membros de bovinos e ovinos no estado do Pará. **Pesq. Vet. Bras.** 29(5):435-438, maio 2009,.

BARNEBY, R. C. *Sensitivae censitae*: A description of the genus *Mimosa* Linnaeus (*Mimosaceae*) in the new World . **The New York Botanical Garden**. 27 november 1991.

BERNARDI-WENZEL, J; QUECINE, M. C.; AZEVEDO, J. L. *et al.* *Agrobacterium-mediated* transformation of *Fusarium proliferatum*. **Genetics and Molecular Research** 15 (2): gmr.15027944. 2016.

BIANCHETTI, R. E.; DE RESENDE, C. F.; PACHECO, V. S.; DORNELLAS, F. F.; DE OLIVEIRA, A. M. S.; FREITAS, J. C. E.; PEIXOTO, P. H. P. An improved protocol for in vitro propagation of the medicinal plant *Mimosa pudica* L. **African Journal of Biotechnology**. Vol. 16(9), pp. 418-428, 1 March, 2017

CANTU-JUNGLES, T. C.; IACOMINI, M.; CIPRIANI, T. R.; CORDEIRO, L. M. C. Structural diversity of alkali-soluble polysaccharides from the fruit cell walls of tucumã (*Astrocaryum aculeatum*), a commelinid monocotyledon from the family *Arecaceae*. **Plant Physiology and Biochemistry**. 2017.

COELHO, N. M. A. Plantas transgênicas: Transformação de *Nicotiana tabacum* L. utilizando GFP; Análise da transgenia de *Nicotiana tabacum* L. transformada com cDNA da cardosina A. **Universidade do Porto**. Tese de Mestrado, 2002.

DA SILVA, M. B.; DA SILVA, J. P.; YAMANO, S. S. P.; SALGADO, U. I.; DINIZ, J. A. P.; SALGADO, C. G. Development of Natural Culture Media for Rapid Induction of *Fonsecaea pedrosoi* Sclerotic Cells In Vitro. **JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY**, p. 3839–3841, Nov. 2008.

DALIO, R. J. D.; DOS SANTOS, P. J. C.; MAXIMO, H. J.; KAWAKAMI, P. A.; GOULIN, E.; MACHADO, M. A. Agrotransformation of *Phytophthora nicotianae*: a simplified and optimized method. **Summa Phytopathol.**, Botucatu, v. 42, n. 3, p. 254-256, 2016.

DALL'AGNOL, R. F.; BOURNAUD, C.; DE FARIA, S. M.; BÉNA, G.; MOULIN, L.; HUNGRIA, M. Genetic diversity of symbiotic *Paraburkholderia* species isolated from nodules of *Mimosa pudica* (L.) and *Phaseolus vulgaris* (L.) grown in soils of the Brazilian Atlantic Forest (Mata Atlântica). **FEMS Microbiology Ecology**, Vol. 93, No. 4, 2017

DE AZEVEDO, C. M. P. de; GOMES, R. R.; VICENTE, V. A.; SANTOS, D. W. C. L.; MARQUES, S. G.; NASCIMENTO, M. M. F. do; ANDRADE, C. E. W.; SILVA, R. R.; QUEIROZ-TELLES, F.; DE HOOG, G. S. *Fonsecaea pugnacius*, a Novel Agent of Disseminated Chromoblastomycosis. **Journal of Clinical Microbiology** August, Volume 53 Number 8, 2015.

DE HOOG, G. S. de. Evolution of black yeast: possible adaptation to the human host. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 63, p. 105-109, 1993.

DE HOOG, G. S. de; ATTILI-ANGELIS, D.; VICENTE, V. A.; VAN DEN ENDE, A. H. G.; QUEIROS-TELLES, F. Molecular ecology and pathogenic potential of *Fonsecaea* species. **Medical Mycology**; 42(5): 405-16. 2004.

DE HOOG, G. S. de; BOWMAN, B.; GRASER, Y.; HAASE, G.; ELFARI, M.; GARRITS VAN DEN ENDE, A. H. G.; MELZER-KRICK, B.; UNTEREINER, W. A. Molecular phygeny and taxonomy of medically important fungi. **Medical Mycology**, v.36, p.52-56, 1998.

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

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

DE HOOG, G. S.; MCGINNIS, M. R. Ascomycetous black yeasts, p. 187–199. In: **The expanding realm of yeast-like fungi**. Elsevier, Amsterdam, 1987.

DE MONBRISON, F.; PIENS, M. A.; AMPLE, B.; EUVRARD, S.; COCHAT, P.; PICOT, S. Two cases of subcutaneous phaeohyphomycosis due to *Exophiala jeanselmei*, in cardiac transplant and renal transplant patients. **British Journal of Dermatology**. 150. 596-624. 2004.

DE OLIVERA, M. T. Transformação genética de *Candida* spp via *Agrobacterium tumefaciens*. 94f. **Dissertação (Mestrado em Microbiologia)** - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

DIXON, D. M.; POLAK-WISS, A. The medically important dematiaceous fungi and their identification, **Mycoses**, v.34, p.1-18, 1991.

DONG, B.; LI, D.; LI, R.; CHEN, S. C.-A.; LIU, W.; LIU, W.; CHEN, L.; CHEN, Y.; ZHANG, X.; TONG, Z.; XIA, Y.; XIA, P.; WANG, Y.; DUAN, Y. A Chitin-Like Component on Sclerotic Cells of *Fonsecaea pedrosoi* Inhibits Dectin-1-Mediated Murine Th17 Development by Masking β -Glucans. **Plos ONE**. 9(12): e114113, 2014.

DONG, B.; TONG, Z.; LI, R.; CHEN, S. C.-A.; LIU, W.; LIU, W.; CHEN, Y.; ZHANG, X.; DUAN, Y.; LI, D.; CHEN, L. Transformation of *Fonsecaea pedrosoi* into sclerotic cells links to the refractoriness of experimental chromoblastomycosis in BALB/c mice via a mechanism involving a chitin induced impairment of IFN- γ production. **PLoS Negl Trop Dis** 12(2):e0006237. 2018.

DOS REIS, M. C., FUNGARO, M. H. P., DUARTE, R. T. D., FURLANETO, L., FURLANETO, M. C. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 58 (2), p. 197-202, 2004.

DOS SANTOS, P. J. P.; SAVI, D. C.; GOMES, R. R.; GOULIN, E. H.; SENKIV, C. D. C.; OSSAMU, F. A.; RODRIGUES, A. M.; GALLI-TERASAWA, L.; KAVA, V.; GLIENKE, C. *Diaporthe endophytica* and *D. terebinthifolii* from medicinal plants for

biological control of *Phyllosticta citricarpa*. **Microbiological Research**. v. 186, p. 153-160, 2016.

DUARTE, R.T.D.; STAATS, C.C.; FUNGARO, M.H.P.; SCHRANK, A.; VAINSTEN, M.H.; FURLANETO-MAIA, L.; NAKAMURA, C.V.; DE SOUZA, W.; FURLANETO M.C. Development of a simple and rapid *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system for the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44 (3), p. 248–254, 2007.

ELKAN, E.; PHILPOT, C. M. Mycotic infections in frogs due to a *Philophora*-like fungus. **Sabouraudia**. 11: 99-105, 1973.

FERREIRA, M. Z.; SARTO, M. T.; ESLABÃO, M. P.; HEIDEN, G.; FERNANDO, J. A.; DUTRA, L. F. Germinação *in vitro* de embriões de *Butia odorata* (Arecaceae). XXVI Congresso de Iniciação Científica. **Universidade de pelotas**, 2017.

FIOR, C. S.; Propagação de *Butia odorata* (Barb. Rodr.) Noblick & Lorenzi. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.

FLORENCIO, C. S.; BRANDÃO, F. A. S.; TEIXEIRA, M. de M.; BOCCA, A. L.; FELIPE, M. S. S.; VICENTE, V. A.; FERNANDES, L. Genetic manipulation of *Fonsecaea pedrosoi* using particles bombardment and *Agrobacterium* mediated transformation. **Microbiological Research** 207, 269–279, 2018.

FORNARI, G.; GOMES, R. R.; DEGENHARDT-GOLDBACH, J.; LIMA, B. J. S.; VOIDALESKI, M; F.; SANTOS, S. S.; ALMEIDA, S. R.; MURO, M. D.; BONNA, C.; SCOLA, R. H.; TRINDADE, E.; BINI, I. H.; MABA, L.; KESTRING, D.; NASCIMENTO, M. M. F.; STEINMACHER, D. A.; SOLEY, B.; DENG, S.; DA SILVA, M. B.; SALGADO, C. G.; BOCCA, A. L.; AZEVEDO, C. M. P. S.; VICENTE, V. A.; DE HOOG, S. A Model for Trans-Kingdom Pathogenicity in *Fonsecaea* Agents of Human Chromoblastomycosis. **Frontiers Microbiology**, 2018

FRANSEN, R. J. N. A guide to binary vectors and strategies for targeted genome modification in fungi using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation / **Journal of Microbiological Methods** 87, 247–262, 2011.

GAZEL FILHO, A. B.; LIMA, J. A. de S. Cultivo da Pupunheira (*Bactris gasipaes* H.B.K.) para Produção de Fruto no Amapá. **MAPA Circular Técnica 14**. Embrapa, 2001.

GELVIN, S. B. Plant Proteins Involved in *Agrobacterium*-Mediated Genetic Transformation. **Annu. Rev. Phytopathol.** 48:45–68, 2010.

GONZÁLEZ, G. M.; ROJAS, C. O.; BOCANEGRA-GARCÍA, V.; GONZÁLEZ, J. G.; GARZA-GONZÁLEZ. Molecular diversity of *Cladophialophora carrionii* in patients with chromoblastomycosis in Venezuela. **Medical Mycology**, 51, 170–177, 2013.

GUNDE-CIMERMAN, N.; HOOG, G. S. de; GRUBE, M. The emerging potential of melanized fungi: black yeast between beauty and the beast. **Fungal Biology** 11 5. 935e936, 2011.

HAUBERT, L.; ZEHETMEYR, M. L.; PEREIRA, Y. M. N.; KRONING, I. S.; MAIA, D. S. V.; SEHN, C. P.; LOPES, G. V.; DE LIMA, A. S.; DA SILVA, W. P. Tolerance to benzalkonium chloride and antimicrobial activity of *Butia odorata* Barb. Rodr. extract in *Salmonella* spp. isolates from food and food environments. **Food Research International**, 2018

HE, L.; FENG, J.; LU, S.; CHEN, Z.; CHEN, C.; HE, Y.; YI, X.; XI, L. Genetic transformation in *Fungi*. **Int. J. Dev. Biol.** 2016.

HERINGER, A. S. Embriogênese somática e criopreservação de embriões somáticos em pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth). **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal de Santa Catarina. 2013.

HOFFMANN, J. F.; ZANDONA, G. P.; DOS SANTOS, P. S.; DALLMANN, C. M.; MADRUGA, F. B.; ROMBALDI, C. V.; CHAVES, F. C. Stability of bioactive compounds in butiá (*Butia odorata*) fruit pulp and nectar, **Food Chemistry**, 2017

JACH, G.; BINOT, E.; FRINGS, S.; LUXA, K.; SCHELL, J. Use of red fluorescent protein from *Discosoma sp.* (dsRED) as a reporter for plant gene expression. **The Plant Journal** 28(4), 483-491, 2001.

LACROIX, B.; CITOVSKY, V. The roles of bacterial and host plant factors in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. **Int. J. Dev. Biol.** 57: 467-481, 2013.

LIMA, I.G.P.; DUARTE, R.T.D.; FURLANETO, L.; BARONI, C.H.; FUNGARO, M.H.P.; FURLANETO M.C. Transformation of the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus* with *Agrobacterium tumefaciens*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 42 (6), p. 631–636, 2006.

MALONEK, S.; MEINHARDT, F. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of the phytopathogenic ascomycete *Calonectria morgani*. **Curr Genet.** 40: 152 -155. 2001

MARQUES, S. G.; PEDROSO SILVA, C. M.; SALDANHA, P. C.; REZENDE, M. A.; VICENTE, V. A.; QUEIROZ-TELLES, F.; COSTA, J. M. L. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from the shell of the babaçu coconut (*Orbignya phalerata* Martius) in the Amazon region, Maranhão, Brazil. **Japanese Journal of Medical Mycology**, v. 47, p. 305–311, 2006.

MARTINS, Renata Corrêa. A família Arecaceae (Palmae) no estado de Goiás: florística e etnobotânica. 2012. 297 f., il. **Tese (Doutorado em Botânica) — Universidade de Brasília**, Brasília, 2012.

MATOS, K.A.N.; PRAIA LIMA, D.; BARBOSA, A.P.P.; MERCADANTE, A.Z.; CHISTÉ, R.C. Peels of tucumã (*Astrocaryum vulgare*) and peach palm (*Bactris gasipaes*) are by-products classified as very high carotenoid sources, **Food Chemistry** 2018.

MCGAHA, S. M.; CHAMPNEY, W. S. Hygromycin B Inhibition of Protein Synthesis and Ribosome Biogenesis in *Escherichia coli*. **Antimicrobialagents and Chemotherapy**, p. 591–59 Feb. 2007.

MICHIELSE, C. B.; HOOYKAAS, P. J. J.; VAN DEN HONDEL, C. A. M. J. J.; RAM, A. F. J. *Agrobacterium* -mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. **Curr Genet** 48: 1–17, 2005

MILLER, E. A.; MONTALI, R. J.; RAMSAY, E. C.; RIDEOUT, B. A. Disseminated Chromoblastomycosis In A Colony Of Ornate-Horned Frogs (*Ceratophrys ornata*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine** 23(4): 433-438, 1992.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. **Psysiologia Plantarum**. Vol, 15, 1962.

MUSAH, R. A.; LESIAK, A. D.; MARON, M. J.; CODY, R. B.; EDWARDS, D.; FOWBLE, K. L.; DANE, A. J.; LONG, M. C. Mechanosensitivity below Ground: Touch-Sensitive

Smell-Producing Roots in the Shy Plant *Mimosa pudica*. **Plant Physiology**. 170, pp. 1075–1089, February 2016.

NAHALKOVA, J.; FATEHI, J. Red Fluorescent protein (DsRed2) as a novel reporter in *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. **FEMS Microbiology Letters** 225, 305-309, 2003.

NAJAFZADEH, M. J., J. SUN, V. A. VICENTE, CORNE H.W. KLAASSEN, ALEXANDRO BONIFAZ, A.H.G. GERRITS VAN DEN ENDE, STEPH B.J. MENKEN, AND G. SYBREN DE HOOG. Molecular Epidemiology of *Fonsecaea* species. **EID Journal**, v.17, p. 464-9, 2011a.

NAJAFZADEH, M. J.; VICENTE, V. C.; SUN, J.; DE HOOG, G. S. *Fonsecaea multimorphosa* sp. nov, a new species of *Chaetothyriales* isolated from feline cerebral abscess. **Fungal Biology**, v. 115, p. 1066-76, 2011b.

NAJAFZADEH, M. J.; REZUSTA, A.; CAMEOS, M. I.; ZUBIRI, M. L.; YUS, M. C.; BADAL, H.; REVILLO, M. J.; DE HOOG, G. S. Successful treatment of chromoblastomycosis of 36 years duration caused by *Fonsecaea monophora*. **Medical Mycology**, 48, 390–393, March 2010b.

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

NIMRICHTER, L.; CERQUEIRA, M. D.; LEITÃO, E. A.; MIRANDA, K.; NAKAYASU, E. S.; ALMEIDA, S. R.; ALMEIDA, I. C.; ALVIANO, C. S.; BARRETO-BERGTER, E.; RODRIGUES, M. L. Structure, Cellular Distribution, Antigenicity, and Biological Functions of *Fonsecaea pedrosoi* Ceramide Monoheptosides. **Infection and Immunity**, p. 7860–7868, Dec. 2005.

PAIVA, A. M. S.; ALOUFA, M. A. I. Estabelecimento in vitro de aroeira da praia (*Schinus terebinthifolius Raddi*) em diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, p. 300-304, 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. **Medical Mycology February** 47 (Special Issue), 315, 2009.

QUEIROZ-TELLES, F.; HOOG, S. de; SANTOS, D. W. C. L.; SALGADO, C. G.; VICENTE, V. A.; BONIFAZ, A.; ROILIDES, E.; XI, L.; AZEVEDO, C. de M. P. e S.; SILVA, M. B. da; PANA, Z. D.; COLOMBO, A. L.; WALSH, T. J. Chromoblastomycosis. **Clin Microbiol Rev** 30: 233–276. 2017.

RAMOS, S. L. F.; DE MACEDO, J. L. V.; LOPES, M. T. G.; BATISTA, J. S.; FORMIGA, K. M.; DA SILVA, P. P.; SAULO-MACHADO, A. C.; VEASEY, E. A. Microsatellite loci for tucumã of amazonas (*Astrocaryum aculeatum*) and amplification in other *Arecaceae*. **American Journal of Botany**: e508–e510. 2012.

RAMOS, S. L. F.; RAMOS, S. L. F.; DEQUIGIOVANNI, G.; SEBBENN, A. M.; LOPES, M. T. G.; KAGEYAMA, P. Y.; MACEDO, J. L. V. de; KIRST, M.; VEASEY, E. A. Spatial genetic structure, genetic diversity and pollen dispersal in a harvested population of *Astrocaryum aculeatum* in the Brazilian Amazon. **BMC Genetics**, 17:63, 2016

REIS, A. dos S. B.; Lesões traumáticas na pele causadas pelos espinhos de *Mimosa pudica* e *Mimosa debilis* em equídeos. Universidade Federal do Pará. **Dissertação de Mestrado**. 2012.

RIVERA, A. L.; MAGAÑA-ORTÍZ, D.; GÓMEZ-LIM, M.; FERNANDEZ, F.; LOSKE, A. M. Physical methods for genetic transformation of fungi and yeast. **Phys Life Ver**. 2014.

RODRIGUES, M. B. C. Transformação genética e patogenicidade de *Guignardia citricarpa*. **USP**, tese de Doutorado 2010.

RUBIN, H.A.; BRUCE, S.; ROSEN, T.; MCBRIDE, M.E. Evidence for percutaneous inoculation as the mode of transmission for chromoblastomycosis. **J Am Acad Dermatol** 25:951–954. 1991.

SAGRILLO, M. R.; GARCIA, L. F. M.; SOUZA FILHO, O. C. de; DUARTE, M. M.; RIBEIRO, E. E.; CANDONÁ, F. C.; CRUZ, I. B. M.; Tucumã fruit extracts (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) decrease cytotoxic effects of hydrogen peroxide on human lymphocytes. **Food Chemistry** 173, 741–748, 2015.

SALGADO, C. G.; SILVA, J. P. da, DINIZ, J. A. P.; SILVA, M. B. da; COSTA, P. F. da; TEIXEIRA, C. SALGADO, U. I. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from thorns of *Mimosa pudica*, a probable natural source of chromoblastomycosis. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo** 46(1):33-36, 2004.

SANTOS, A. L. S.; PALMEIRA, V. F.; ROZENTAL, S. KNEIPP, L. F.; NIMRICHTER, L.; ALIANO, D. S.; RODRIGUES, M. L.; ALVIANO, C. S. Biology and pathogenesis of *Fonsecaea pedrosoi*, the major etiologic agent of chromoblastomycosis. **FEMS Microbiol Rev** 31, 570–591, 2007.

SATOW, M.M; ATILLI-ANGELLIS; HOOG G.S.; VICENTE, V.A. Selective factors in oil flotation isolation of black yeasts from the environment. **Studies in Mycology**, v.61, p. 157–163, 2008.

SEVERO, C. B.; OLIVEIRA, F. de M.; PILAR, E. F. S.; SEVERO, L. C. Phaeohyphomycosis: a clinical-epidemiological and diagnostic study of eighteen cases in Rio Grande do Sul, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 107(7): 854-858, November 2012.

SEYEDMOUSAVI, S.; NETEA, M. G.; MOUTON, J. W.; MELCHERS, W. J. G.; VERWEIJ, P. E.; DE HOOG, G. S. Black Yeasts and their Filamentous Relatives: Principles of Pathogenesis and Host Defense. **Clinical Microbiology Reviews** p. 527–542, Vol 27, n 3. 2014.

SHEIKH, S. S.; AMR, S. S. Mycotic cysts: report of 21 cases including eight pheomycotic cysts from Saudi Arabia. **International Journal of Micology**, 368-392, 2007.

SILVA, C. M.; ROCHA, R. M. da; MORENO, J. S.; BRANCO, M. dos R. F. C.; SILVA, R. R.; MARQUES, S. G.; COSTA, J. M. L. The coconut babaçu (*Orbignya phalerata martins*) as a probable risk of human infection by the agent of chromoblastomycosis in the State of Maranhão, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop** 28:49–52. 1995.

SONG, K.; YEOM, E.; LEE, A. J.; Real-time imaging of pulvinus bending in *Mimosa pudica*. **Scientific Reports**, 4:6466, 2014

SOUZA FILHO, A. P. S.; ALVES, S. M.; FIGUEIREDO, F. J. C.; DUTRA, S. Germinação de Sementes de Plantas Daninhas de Pastagens Cultivadas: *Mimosa pudica* e *Ipomoea asarifolia*. **Planta Daninha**, v. 19, p. 23-31, 2001.

STEINMACHER, D. A.; GUERRA, M. P.; SAARE-SURMINSKI, K.; LIEBEREI, R. A temporary immersion system improves in vitro regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis. **Ann Bot.**, v. 108, p. 1463–1475, 2011.

STERFLINGER, K.; LOPANDIC, K.; BLASI, B.; POYNTER, C.; DE HOOG, S.; TAFER, H. Draft Genome of *Cladophialophora immunda*, a Black Yeast and Efficient Degrader of Polyaromatic Hydrocarbons. **Genome Announcements**. Volume 3 Issue 1. 2015.

SUN, J.; NAJAFZADEH, M. J.; VAN DEN ENDE, A. H. G.; VICENTE, V. A.; FENG, P.; XI, L.; DE HOOG, G. S. Molecular Characterization of Pathogenic Members of the Genus *Fonsecaea* Using Multilocus Analysis. **Plos ONE**. August , Volume 7 | Issue 8 | e41512, 2012.

TORRES-GUERRERO, E.; ISA-ISA, R.; ISA, M.; ARENAS, R. Chromoblastomycosis. **Clinics in Dermatology**, 30, 403–408, 2012.

TSCHEN, J.A.; KNOX, J.M.; MCGRAVAN, M.H.; DUNCAN, W.C. The association of fungal elements and wood splinters. **Arch Dermatol** 120:107–108. 1984.

UTERMARK, J.; KARLOVSKY, P. Genetic transformation of filamentous fungi by *Agrobacterium tumefaciens*. **Protocol Exchange**. 2008.

VAN DE SANDE, W. W. J.; MAGHOUB, E. S.; FAHAL, A. H.; GOODFELLOW, M.; WELSH, O.; ZIJLSTRA, E. The Mycetoma Knowledge Gap: Identification of Research Priorities. **PLOS Neglected Tropical Diseases** Volume 8 | Issue 3, 2014.

VICENTE, V. A. Isolamento e caracterização de fungos da cromoblastomicose. ESAL-USP, **Tese de Doutorado**, 2000.

VICENTE, V. A.; ANGELIIS D. A.; QUEIRÓZ-TELLES F. F.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A. Isolation of Herpotrichiellaceous fungi from the environment. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p.47-51, 2001.

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

VICENTE, V. A.; NAJAFZADEH, M. J.; SUN, J.; GOMES, R. R.; ROBL, D.; MARQUES, S. G.; AZEVEDO, C. M. P. S.; DE HOOG, G. S. Environmental siblings of black agents of human chromoblastomycosis. **Fungal Diversity**, v. 65, n. 1, p. 47–63, 2013.

VICENTE, V. A.; ORÉLIS-RIBEIRO, R.; NAJAFZADEH, M. J.; SUN, J.; GUERRA, R. S.; MIESCH, S.; OSTRENKY, A.; MEIS, J. F; KLAASSEN, C. H.; DE HOOG, G. S.; BOEGER, W. A. Black yeast-like fungi associated with Lethargic Crab Disease (LCD) in the mangrove-land crab, *Ucides cordatus* (Ocypodidae). **Veterinary Microbiology**.v.158, p.109–122, 2012.

VILLENA, C. I. F. Transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* de *Fonsecaea monophora* e *Fonsecaea erecta* para modelo de estudo clínico. **Dissertação de Mestrado**. 2018.

WEEDON, D.; RITCHIE, G. Cystic chromomycosis of the skin. **Pathology**. 11, pp. 389-92, 1979.

APÊNDICE

MEIOS DE CULTURA E REAGENTES UTILIZADOS

Agar Sabouraud Dextrose

REAGENTES	PESO (g)
Glicose	20g
Peptona	5g
Agar	7,5g
Volume final	500 mL

Ágar Batata

REAGENTES	PESO (g)
Batatas Cruas	200g
Dextrose	20g
Ágar	20g
Volume final de água	1000 mL

As batatas devem ser cozidas com água destilada, depois peneiradas e seu volume ajustado até o volume de 1L. Após acertar o volume é colocado a Dextrose e o ágar. Autoclavar o meio.

Meio LB

REAGENTES	PESO (g)
Triptona	1g
Extrato de Levedura	0,5g
NaCl	1g
Volume final	100 mL

Preparo do MES

REAGENTES (SAIS)	QUANTIDADE
MES	19,52g
H ₂ O*	100mL
Volume final	100 mL

*Após a adição de água para a diluição realizar o ajuste de pH para 5,3; Ajuste de pH deve ser realizado com KOH 5M. Após ajuste deve ser adicionado água até o volume de 100 mL. Esta solução deve ser filtrada com filtro 0,45µm e estocada a -20°C envolto em papel alumínio.

Meio MS adaptado

SOLUÇÃO	REAGENTES	VOLUME (g/L)
A (10 mL/L)	NH ₄ NO ₃	165
B (20 mL/L)	KNO ₃	95
C (10 mL/L)	CaCl ₂ .2 H ₂ O	44
	KI	0,083
	CoCl ₂ . 2 H ₂ O	0,0025
D (10 mL/L)	KH ₂ PO ₄	17
	H ₃ BO ₃	0,62
	Na ₂ MoO ₄ .2 H ₂ O	0,025
E (10 mL/L)	MnSO ₄ .H ₂ O	1,69
	MgSO ₄ .7H ₂ O	37
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,0025
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,86
F (10 mL/L)	Na ₂ EDTA.2 H ₂ O	3,73
	FeSO ₄ .7 H ₂ O	2,78
G (10 mL/L)	Tiamina HCl	0,1
	Glicina	0,2
	Ácido Nicotínico	0,05
	Piridoxina HCl	0,05
	Total	1 Litro

Soluções preparadas previamente e armazenadas na geladeira.

Complemento para o Meio MS

REAGENTES	PESO (g/L)
Sacarose	30
Agar*	7
Volume final	1 Litro

pH: entre 5,5 a 6. *Adicionado somente após a medição do pH

Complemento para o Meio Brasuz

REAGENTES	PESO (g/L)
Sacarose	30
Inositol	0,1
PvP	0,5
Agar*	7
BAP (10 mM)**	0,2 mg/L
ANA (1 mM)**	0,01 mg/L
Volume final	1 Litro

pH: entre 5,7 a 6. *Adicionado somente após a medição do pH. **
Hormônios vegetais

Sais para o Meio de Indução

REAGENTES (SAIS)	PESO (g)
KH ₂ PO ₄ (monobásico)	6,5
K ₂ HPO ₄ (dibásico)	8,7
NaCl	2,9
MgSO ₄ .7 H ₂ O	12,3
CaCl ₂ .2 H ₂ O	3,67
FeSO ₄ .7 H ₂ O	0,13
(NH ₄).2 SO ₄	6,6
Volume final	50 mL

Preparo da Acetoseríngona 0,2 M

REAGENTES (SAIS)	QUANTIDADE
Acetoseríngona	0,19g
H ₂ O*	100mL
Volume final	5 mL

*Após a adição de água para a diluição realizar o ajuste de pH para 8; Ajuste de pH deve ser realizado com KOH 5M. Após ajuste deve ser adicionado água até o volume de 5 mL. Esta solução deve ser filtrada com filtro 0,25µm e estocada a -20°C envolto em papel alumínio.

Meio de Indução Líquido

REAGENTES	QUANTIDADE
Sais do meio de Indução	200mL
Glicose (10mM)	0,9g
Glicerol (0,5%)	2,5mL
H ₂ O	Completar até 475mL
Autoclavar e resfriar a 50°C	
1M MES*	20mL
Acetoseríngona*	500µL
Volume final	500 mL

*Após adição dos reagentes, guardar solução em geladeira

Meio de Indução Sólido

REAGENTES	QUANTIDADE
Sais do meio de Indução	200mL
Glicose (5 mM)	0,45g
Glicerol (0,5%)	2,5mL
Ágar	10g
H ₂ O	Completar 475 mL
Autoclavar e resfriar a 50°C	
1M MES*	20mL
Acetoseríngona*	500µL
Volume final	500 mL

*Após adição dos reagentes, guardar solução em geladeira