UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

IZADORA CERVELIN FLÔR

DIFERENCIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE Fonsecaea monophora EM MODELO PARASITÁRIO UTILIZANDO A TÉCNICA DE qPCR



IZADORA CERVELIN FLÔR

DIFERENCIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE *Fonsecaea monophora* EM MODELO PARASITÁRIO UTILIZANDO A TÉCNICA DE qPCR

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

Orientadora: Profa. Dra. Vânia Aparecida Vicente

Coorientadores: Profa. Dra. Renata Rodrigues Gomes e Dr. Ricardo Belmonte-Lopes

CURITIBA 2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Flôr, Izadora Cervelin

Diferenciação da expressão gênica de Fonsecaea monophora em modelo parasitário utilizando a técnica de qPCR / Izadora Cervelin Flôr. – Curitiba, 2022.

1 recurso on-line : PDF.

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

Orientadora: Profa. Dra. Vånia Aparecida Vicente.

Coorientadores: Profa. Dra. Renata Rodrigues Gomes e Dr. Ricardo Belmonte-Lopes.

1. Leveduras. 2. Cromoblastomicose. 3. Expressão gênica. I. Vicente, Vânia Aparecida. II. Gomes, Renata Rodrigues, 1981-. III. Belmonte-Lopes, Ricardo. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia. V. Título.

Bibliotecária: Giana Mara Seniski Silva. CRB-9/1406



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

ATA Nº222

ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE MESTRADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRA EM MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA

No dia trinta de junho de dois mil e vinte e dois às 09 horas, na sala 129, Departamento Patologia Básica, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de dissertação da mestranda IZADORA CERVELIN FLÔR, intitulada: DIFERENCIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE Fonsecaea monophora EM MODELO PARASITÁRIO UTILIZANDO A TÉCNICA DE qPCR, sob orientação da Profa. Dra. VANIA APARECIDA VICENTE. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: VANIA APARECIDA VICENTE (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), TEREZINHA I. SVIDZINSKI (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÀ), VANESSA MERLO KAVA (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela APROVAÇÃO. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa. A outorga de título de mestra está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, VANIA APARECIDA VICENTE, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

CURITIBA, 30 de Junho de 2022.

Assinatura Eletrônica 11/07/2022 22:56:33.0 VANIA APARECIDA VICENTE Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica 08/07/2022 16:18:34.0 TEREZINHA I. SVIDZINSKI Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ)

Assinatura Eletrônica 30/06/2022 11:49:57.0 VANESSA MERLO KAVA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Centro Politécnico - CURITIBA - Paraná - Brasil CEP 81531-990 - Tel: (41) 3361-1695 - E-mail: posmpp@ufpr.br Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015. Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 200782 Para autenticar este documento/assinatura, acesse https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp e insira o codigo 200782



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO 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 MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de IZADORA CERVELIN FLÔR intitulada: DIFERENCIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE Fonsecaea monophora EM MODELO PARASITÁRIO UTILIZANDO A TÉCNICA DE qPCR, sob orientação da Profa. Dra. VANIA APARECIDA VICENTE, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra 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, 30 de Junho de 2022.

Assinatura Eletrônica 11/07/2022 22:56:33.0 VANIA APARECIDA VICENTE Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica 08/07/2022 16:18:34.0 TEREZINHA I. SVIDZINSKI Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÅ)

Assinatura Eletrônica 30/06/2022 11:49:57.0 VANESSA MERLO KAVA Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÅ)

Centro Politécnico - CURITIBA - Paraná - Brasil CEP 81531-990 - Tel: (41) 3361-1695 - E-mail: posmpp@ufpr.br Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015. Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 200782 Para autenticar este documento/assinatura, acesse https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp e insira o codigo 200782

Esta dissertação é dedicada à minha família, que não mediu esforços para me ajudar a conquistar este objetivo.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ivanice Cervelin e Izidoro da Silva Flôr, pilares da minha formação como ser humano;

A toda minha família e pessoas queridas pelo incentivo, orgulho e apoio incondicional;

A Profa. Dra. Vania Aparecida Vicente pela orientação e oportunidade;

Ao meu coorientador Dr. Ricardo Belmonte-Lopes pela paciência, colaboração e importante apoio durante os experimentos;

A minha coorientadora Profa. Dra. Renata Rodrigues Gomes pela colaboração e apoio científico dedicado ao trabalho;

Ao Prof. Dr. Vinícius Almir Weiss pela orientação durante a fase inicial do projeto;

Aos amigos do LabMicro pela amizade, carinho, momentos de descontração e auxílio nos experimentos. Vocês foram muito importantes neste período;

Ao Eduardo Castan por estar sempre disposto a responder minhas dúvidas e pelas excelentes aulas de biologia molecular voltadas à análise de expressão gênica que foram imprescindíveis para a execução da minha pesquisa;

A todos os professores que já tive na vida, sem vocês não teria chegado até aqui;

Aos professores, a Universidade Federal do Paraná e ao programa de Pósgraduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia pela formação e conhecimento;

A CAPES pelo apoio financeiro;

Como muita alegria deixo aqui os meus agradecimentos!

"A dúvida é o princípio da sabedoria."

Aristóteles

RESUMO

Entre as espécies de leveduras negras reunidas no gênero Fonsecaea estão os agentes causais da cromoblastomicose, uma infecção cutânea-subcutânea, reconhecida como uma micose de implantação associada a lesões traumáticas causadas por fontes ambientais. A doença é caracterizada por aspectos crônicos de evolução progressiva e de difícil tratamento, acometendo principalmente trabalhadores rurais imunocompetentes, sendo reconhecida pela OMS como uma doença negligenciada. Neste contexto, o estudo de expressão gênica pode fornecer dados que permitam compreender melhor os genes envolvidos nos mecanismos de patogenicidade destes agentes. Tendo em vista que ainda há muitos aspectos da infecção por este gênero que não estão completamente elucidados, este trabalho visou avaliar, através da metodologia de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR), a diferenciação da expressão gênica em Fonsecaea monophora CBS 269.37, um dos principais agentes etiológicos da cromoblastomicose, sob diferentes condições de crescimento in vitro e por meio do modelo parasitário utilizando a larva Tenebrio molitor. Com base em dados não publicados do transcriptoma da espécie, foram selecionados para avaliação da expressão sete genes envolvidos em diferentes processos biológicos ou funções moleculares: AYO21 09850 (NADPH-citocromo P450 redutase), (Peroxidase), AYO21 02611 AYO21 11301 (Formato desidrogenase). duas lacases/multicobre oxidases diferentes (AYO21 05450 е AYO21 07092), desidrogenase) e AYO21 01590 (homocisteína AYO21 01584 (álcool Smetiltransferase). Com base na bibliografia, outros genes foram selecionados como (gama actina). De acordo com os resultados, verificou-se que os genes β -tubulina, AYO21 07350 actina), AYO21 05450 (Lacase), (gama AYO21 01590 (homocisteína S-metiltransferase), AYO21 1584 (álcool desidrogenase) е AYO21 02611 (Formato desidrogenase) apresentaram níveis de expressão gênica diminuídos nas larvas inoculadas em relação ao desenvolvimento in vitro da linhagem em estudo. Em contrapartida, os genes AYO21 09850 (NADPH-citocromo P450 redutase). AYO21 07092 (Lacase) е AYO21 11301 (Peroxidase) apresentaram expressão aumentada em larvas infectadas, o que sugere que esses genes podem estar relacionados aos fatores de virulência do fungo. Os genes RPL27a, Rpb2 e Rps9 que inicialmente eram candidatos a normalizadores da reação também apresentaram expressão diferencial elevada em larvas inoculadas e isso pode ser explicado pelo fato de que alguns genes que codificam proteínas ribossomais podem estar associados à expressão de virulência do patógeno.

Palavras-chave: Leveduras negras. qPCR. Cromoblastomicose. Patogenicidade.

ABSTRACT

Among the black yeast species gathered in the Fonsecaea genus are the causal agents of chromoblastomycosis, a cutaneous-subcutaneous infection recognized as an implantation mycosis associated with traumatic injuries caused by environmental sources. The disease is characterized by chronic aspects of progressive evolution and difficult to treat, affecting mainly immunocompetent rural workers, being recognized by the OMS as a neglected disease. In this context, the study of gene expression can provide data that allow a better understanding of the genes involved in the pathogenic mechanisms of these agents. Considering that there are still many aspects of infection by this genus that are not completely elucidated, this work aimed to evaluate, through the methodology real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-qPCR), the differentiation of gene expression in Fonsecaea monophora CBS 269.37, one of the main etiological agents of chromoblastomycosis, under different *in vitro* growth conditions and through a parasitic model using the larvae Tenebrio molitor. Based on unpublished data from the transcriptome of the species, seven genes involved in different biological processes or molecular functions were selected for expression evaluation: AYO21 09850 (NADPHcytochrome P450 reductase), AYO21 11301 (Peroxidase), AYO21 02611 (Formate dehydrogenase), two different laccases/multicopper oxidases (AYO21 05450 and AYO21 07092), AYO21 01584 (alcohol dehydrogenase) and AYO21 01590 (homocysteine S-methyltransferase). Based on the bibliography, other genes were selected as candidates for endogenous genes: β-tubulin, RPL27a, Rpb2, Rps9 and AYO21 07350 (gamma actin). According to the results, it was verified that the genes β-tubulin, AYO21 07350 (gamma actin), AYO21 05450 (Laccase), AYO21 01590 (homocysteine S-methyltransferase), AYO21 1584 (alcohol dehydrogenase) and AYO21 02611 (Formate dehydrogenase) showed decreased levels of gene expression in the inoculated larvae in relation to the *in vitro* development of the strain under study. In contrast, the genes AYO21 09850 (NADPH-cytochrome P450 reductase), AYO21 07092 (Laccase) and AYO21 11301 (Peroxidase) showed increased expression in infected larvae, suggesting that these genes may be related to fungal virulence factors. The genes RPL27a, Rpb2 and Rps9 which were initially candidates for normalizing the reaction, also showed high differential expression in inoculated larvae and this can be explained by the fact that some genes that encode ribosomal proteins may be associated with the expression of the pathogen's virulence.

Keywords: Black yeasts. qPCR. Chromoblastomycosis. Pathogenicity.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – CORPOS MURIFORMES ASSOCIADOS À FORMA PARASITÁRIA DA
CROMOBLASTOMICOSE
FIGURA 2 – ANÁLISE DA CURVA DE DISSOCIAÇÃO A PARTIR DE UM ENSAIO
DE PCR EM TEMPO REAL
FIGURA 3 – LARVA, PUPA E BESOURO DE <i>Tenebrio molitor</i>
FIGURA 4 – CULTURA DA HEMOLINFA DE LARVAS DE Tenebrio molitor
INFECTADAS APÓS 10 DIAS DA DATA DE INOCULAÇÃO40
FIGURA 5 – CULTURA DA HEMOLINFA DE LARVAS DE Tenebrio molitor
(CONTROLE)41
FIGURA 6 – COMPARAÇÃO DOS PERFIS DE RNA TOTAL OBTIDOS A PARTIR
DAS AMOSTRAS DAS LARVAS DE Tenebrio molitor MACERADAS
COM ADIÇÃO IMEDIATA E TARDIA DE NITROGÊNIO LÍQUIDO NA
AMOSTRA42
FIGURA 7 – ANÁLISE DE ESTABILIDADE DOS GENES ENDÓGENOS
CANDIDATOS A NORMALIZADORES43
FIGURA 8 – NÍVEIS DE EXPRESSÃO GÊNICA DOS GENES ALVO45
FIGURA 9 – NÍVEIS DE EXPRESSÃO GÊNICA DOS GENES SELECIONADOS
PARA CANDIDATOS A NORMALIZADORES47
FIGURA 10 – EXEMPLO DE CURVA DE DISSOCIAÇÃO (MELTING) FORA DO
PADRÃO ESPERADO48

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – CONDIÇÕES PARA AS REAÇÕES DE PCR EM TEMPO REAL39 TABELA 2 – $2^{-\Delta\Delta CT}$ LARVA INOCULADA VS FUNGO CONTROLE45

LISTA DE QUADROS

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1 – LINHAGENS DE REFERÊNCIA UTILIZADAS PARA A CONFECÇÃO
DA ÁRVORE FILOGENÉTICA DE Fonsecaea monophora61
ANEXO 2 – ANÁLISE FILOGENÉTICA PARA <i>Fonsecaea monophora</i> ISOLADA A
PARTIR DE LARVA DE Tenebrio molitor INOCULADA63
ANEXO 3 – CURVA DE DISSOCIAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS65

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

- DNA ou RNA produto de reações de amplificação ou replicação
- Austrália
- Brasil
- Canadá
- DNA complementar
- Camarões
- China
- Colômbia
- Cycle Threshold
- Alemanha
- Dietil Pirocarbonato
- Dinamarca
- Ácido desoxirribonucleico
- Doenças Tropicais Negligenciadas
- França
- Auto anelamento
- Israel
- Internal Transcribed Spacer
- Japão
- Sri Lanka
- Miligrama
- Mililitro
- RNA mensageiro
- Holanda
- Nanomolar
- Organização Mundial de Saúde
- Pares de base
- Reação em Cadeia da Polimerase
- Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
- Ácido ribonucleico
- Transcrição reversa

RT-qPCR - Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real

SE - Suécia

SYBR Green - Corante fluorescente que se liga a fita de DNA

- US Estados Unidos da América
- μL Microlitro
- UY Uruguai
- VE Venezuela

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20 20
3 REVISÃO DE LITERATURA	21
 3.1 MICOSES SUBCUTÂNEAS 3.2 AGENTES CAUSAIS DA CROMOBLASTOMICOSE 3.3 DIFERENCIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA UTILIZANDO A METODOLO DE qPCR	21 22 GIA .25 29
4 METODOLOGIA	32
 4.1 LINHAGENS 4.2 INOCULAÇÃO DE LINHAGENS DE Fonsecaea monophora EM LARVAS Tenebrio molitor E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE INFECÇÃO E VIABILIDA DO FUNGO NO TECIDO ANIMAL	32 DE ADE .32 33 34 34
infectadas 4.3.3 Tratamento do RNA com DNase	35 . 35
 4.3.4 Reação de transcriptase reversa para obtenção do cDNA 4.4 DESENHO E VALIDAÇÃO IN SILICO DE PRIMERS	36 .36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
REFERÊNCIAS	51
ANEXOS	60

1 INTRODUÇÃO

A cromoblastomicose é uma micose cutânea-subcutânea causada por espécies da família Herpotrichiellaceae da ordem Chaetothyriales, através da inoculação traumática desses agentes. Do ponto de vista clínico. а cromoblastomicose possui sintomatologia variada, apresentando-se desde formas brandas até casos graves de aspecto crônico e mutilante. De difícil tratamento, a doença se dissemina de forma subcutânea para várias regiões, sendo caracterizada pela presença de estruturas septadas e acastanhadas no tecido do hospedeiro, denominadas de corpos muriformes. Em alguns casos a infecção pode ter uma evolução sistêmica, afetando o sistema nervoso central, se apresentando clinicamente como feohifomicose, como o caso clínico recentemente relatado associado ao agente Fonsecaea pugnacius (TEIXEIRA et al., 2017; AZEVEDO et al. 2015; QUEIROZ-TELLES, 2015).

Além disso, quanto à etiologia da doença, as espécies do gênero *Fonsecaea* são consideradas os principais agentes (CORREIA et al., 2010). Habitualmente encontradas em detritos de solo e plantas, as espécies do gênero acometem principalmente indivíduos de baixa renda que residem em ambientes rurais, onde os patógenos foram ocasionalmente isolados (VICENTE et al., 2017). Dentro do gênero existem espécies tais como *F. pedrosoi* e *F. nubica* que são exclusivamente associadas à infecção subcutânea e consequentemente formando corpos muriformes como a forma parasitária no tecido do hospedeiro, enquanto as espécies *F. monophora e F. pugnacius* podem expressar corpos muriformes e eventualmente promover lesões em outros órgãos ou tecidos através da disseminação de estruturas filamentosas e/ou propágulos no tecido do hospedeiro, caracterizando o quadro clínico conhecido como feohifomicose. No entanto, a espécie *F. monophora* pode causar tanto cromoblastomicose quanto feohifomicose, enquanto *F. pugnacius* foi reportada causando no mesmo indivíduo as duas formas de infecção: cromoblastomicose e feohifomicose (GOMES et al. 2016; AZEVEDO et al. 2015)

A cromoblastomicose é mais comum em países de clima tropical e subtropical, e apesar de causar grande impacto na saúde pública, ainda não consta na lista prioritária dos sistemas públicos de saúde, tendo sido recentemente reconhecida pela OMS como uma doença negligenciada (MORENO; VICENTE; HOOG, 2018; QUEIROZ-TELLES et al., 2017). Grande parte das micoses

permanece ignorada pelos agentes governamentais e tomadores de decisão e apesar da cromoblastomicose fazer parte do grupo de Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) da Organização Mundial de Saúde (OMS), ainda não há muito investimento para estudos da doença quando comparado com outras patologias infecciosas com gravidade semelhante. Dessa forma, soluções inovadoras dentro do complexo cenário relacionado a doenças fúngicas são necessárias (RODRIGUES, 2019).

Diante disto, modelos adequados de infecção em hospedeiros animais são necessários para entender os mecanismos envolvidos nestas patogêneses (FORNARI et al. 2018; MORENO; VICENTE; HOOG, 2018). Fornari et al. (2018) utilizaram larvas de *Tenebrio molitor* como modelo experimental para avaliar a virulência de espécies encontradas em amostras clínicas (*F. pedrosoi e F. monophora*) e ambientais (*F. erecta*), e observaram que essas espécies foram capazes de sobreviver dentro do hospedeiro animal, com produção de células leveduriformes e hifas. Especificamente para *F. pedrosoi* foram observadas a presença de células escuras esféricas ou ovoides, semelhante às células muriformes, considerada a forma parasitária característica da cromoblastomicose (FORNARI et al. 2018).

Sendo assim, a partir do modelo parasitário utilizando larvas de *T. molitor* objetivou-se avaliar a expressão gênica previamente relacionada à virulência de *F. monophora* em condições de cultivo e a partir larvas de infectadas, visando fornecer dados sobre os mecanismos envolvidos na expressão diferencial de genes associados à virulência do agente.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Utilizar o modelo parasitário *Tenebrio molitor* para avaliar expressão gênica de *Fonsecaea monophora* utilizando a técnica de qPCR e analisar a existência de padrões de expressão relacionados a virulência.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a capacidade de infecção e permanência do fungo *F. monophora* em larvas de *T. molitor*;

- Padronizar a técnica para extração de RNA em amostras de culturas de fungo e a partir de amostras de larvas de *T. molitor* infectadas;

- Desenvolver marcadores de qPCR para os genes alvo;

- Avaliar a expressão de genes relacionados à virulência de *F. monophora* em modelo experimental *T. molitor*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 MICOSES SUBCUTÂNEAS

As micoses subcutâneas são doenças causadas por um grupo diversificado de fungos. Também chamadas de micoses de implantação, se desenvolvem no local de um trauma transcutâneo (QUEIROZ-TELLES et al., 2011). Ocorrem com maior frequência em países de clima tropical e subtropical e acometem principalmente indivíduos em ambientes rurais, uma vez que os organismos causadores dessas doenças são frequentemente encontrados em detritos do solo e plantas (LUPI; TYRING; MCGINNIS, 2005). Na maioria dos casos sua sintomatologia é branda, podendo começar em forma de pápulas subcutâneas indolores, progredindo para formação de fístulas e placas verrucosas, respectivamente. Dificilmente micoses subcutâneas se manifestam de forma invasiva ou disseminada, entretanto ocasionam grande impacto na saúde pública, sendo difíceis de tratar e muitas vezes gerando recidivas (ELDRIDGE et al., 2014; QUEIROZ-TELLES et al., 2011). As principais infecções fúngicas subcutâneas incluem а esporotricose, а cromoblastomicose, micetoma, lobomicose, rinosporidiose, zigomicose subcutânea e feohifomicose subcutânea (LUPI; TYRING; MCGINNIS, 2005).

A cromoblastomicose é uma infecção cutânea-subcutânea crônica, que causa lesões com resposta imune granulomatosa e formação de células muriformes dentro do tecido subcutâneo, padrão específico dessa doença, chamado de característica patognomônica (MORENO; VICENTE; HOOG, 2018; QUEIROZ-TELLES et al., 2017). As lesões cutâneas-subcutâneas características da cromoblastomicose são clinicamente polimórficas, sendo frequentemente diagnosticadas erroneamente como várias outras doenças infecciosas e não infecciosas. Em casos avançados, a doença pode causar incapacidade de trabalho devido a sequelas fibróticas e uma série de complicações clínicas e se não for diagnosticada corretamente durante sua fase inicial, pode tornar-se refratária ao tratamento (QUEIROZ-TELLES et al., 2017).

O diagnóstico da doença pode ser realizado através da microscopia direta, por cultura, exame histopatológico e análise molecular (QUEIROZ-TELLES et al., 2017; ANDRADE et al., 2007). Apesar de ser uma das principais micoses subcutâneas, pacientes que apresentam formas clínicas moderadas a graves desta doença são até então um verdadeiro desafio terapêutico para os médicos (QUEIROZ-TELLES et al., 2009). As lesões são recalcitrantes e difíceis de tratar, muitas vezes há a recorrência da doença, sendo necessária administração de antifúngicos sistêmicos, requerendo por vezes a retirada cirúrgica do tecido afetado, termoterapia, quimioterapia ou a combinação destes (QUEIROZ-TELLES et al., 2017; QUEIROZ-TELLES, 2015; BONIFAZ; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ; PERUSQUÍA-ORTIZ, 2010).

3.2 AGENTES CAUSAIS DA CROMOBLASTOMICOSE

Ainda há aspectos pouco compreendidos em relação aos agentes causais da cromoblastomicose, principalmente em relação aos mecanismos de patogenicidade e fatores de virulência, ou seja, os genes de virulência envolvidos, sua expressão e função dentro do tecido infectado. Essas informações são necessárias para desenvolver medidas eficazes de prevenção, diagnóstico e tratamento da doença (QUEIROZ-TELLES; SANTOS, 2013; BOMBASSARO, 2020). Entre os grupos de fungos considerados agentes causais da cromobastomicose destacam-se as leveduras negras da família Herpotrichiellaceae da ordem Chaetothyriales (VICENTE et al., 2017). As leveduras negras da ordem Chaetothyriales são caracterizadas por apresentarem crescimento lento, formado colônias de coloração escura em meios de cultivo devido à presença de melanina nas suas células vegetativas e reprodutivas (TEIXEIRA et al., 2017). Grande parte das espécies de leveduras negras se reproduz de maneira assexuada com conídios gerados por uma porém membros do gênero Exophiala exibem brotações fase filamentosa, semelhantes а sendo ocasionalmente observado leveduras, crescimento meristemático (HOOG et al., 2011).

Esses agentes encontram-se no ambiente como sapróbios em habitats como solo, madeira, plantas em decomposição e em resíduos tóxicos e poluentes diversos (VICENTE et al., 2017). Dentre eles destacam-se espécies patogênicas, associadas a infecções subcutâneas e profundas em hospedeiros humanos e animais. As espécies não patogênicas são consistentemente distintas daquelas reportadas como agentes causais de doença. As leveduras negras encontram-se distribuídas ao longo do mundo e os indivíduos estão expostos a elas presumivelmente por trauma cutâneo (TEIXEIRA et al., 2017; SEYEDMOUSAVI et al., 2014; REVANKAR, 2007).

A família Herpotrichiellaceae abrange a maioria das espécies clinicamente relevantes, pertencentes aos gêneros Fonsecaea, Cladophialophora, Exophiala e Rinocladiella (TEIXEIRA et al., 2017; SEYEDMOUSAVI et al., 2014; BADALI et al. 2008; SANTOS et al. 2007). Dentre as espécies causadoras da cromoblastomicose, as mais prevalentes são F. pedrosoi, F. monophora e Cladophialophora carrionii (MORENO; VICENTE; HOOG, 2018). As espécies do gênero Fonsecaea são mais comumente reportadas como causa da doença em regiões tropicais, sendo F. pedrosoi mais comum nas áreas endêmicas brasileiras enquanto F. monophora na China (XI et al., 2009) enquanto C. carrioni tem sido reportada em áreas de clima árido e semiárido (HOOG et al., 2007). Estas espécies estão normalmente associadas a fontes ambientais, com lesões traumáticas servindo como porta de entrada para os microrganismos causadores da doença, que se multiplicam dentro do tecido causando lesões com resposta imune granulomatosa e formação de células muriformes, que representam as formas parasitárias e adaptativas às condições adversas do tecido do hospedeiro (MORENO; VICENTE; HOOG, 2018; QUEIROZ-TELLES et al., 2017). Fonsecaea pedrosoi e F. nubica estão preponderantemente associadas à cromoblastomicose e formação de células muriformes, enquanto F. monophora e F. pugnacius também podem estar envolvidas na feohifomicose disseminada do cérebro e de outros órgãos, com presença de hifas nos tecidos. F. monophora apresenta neurotropismo acentuado e com aspecto clínico variável. A rota da infecção neuroinvasiva por *F. monophora* não é clara e ocorre em indivíduos com sistema imunológico aparentemente normal (AZEVEDO et al., 2015).



FIGURA 1 – CORPOS MURIFORMES ASSOCIADOS À FORMA PARASITÁRIA DA CROMOBLASTOMICOSE

FONTE: Adaptado de Salgado et al. (2004).

De acordo com Selbmann et al., (2005) os fungos dematiáceos relatados como agentes causais da cromoblastomicose apresentam diversas características que os capacitam a sobreviver em ambientes variados, incluindo os hostis. De acordo com Moreno, Vicente e Hoog et al. (2018), tal tolerância a habitats pode ser explicada pela sua capacidade intrínseca de sobreviver sob condições ácidas, alcalinas, tóxicas, em altas temperaturas, ou de baixa disponibilidade de nutrientes e estresse mecânico e osmótico. A parede celular melanizada destes agentes confere proteção contra uma ampla gama de estressores ambientais, incluindo resistência à irradiação UV, lise enzimática e, em alguns casos, extremos de temperaturas (MORENO; VICENTE; HOOG et al., 2018). Além da termotolerância outros fatores como o dimorfismo celular e a produção de melanina são amplamente descritos como principais fatores de virulência relacionados ao estabelecimento da doença (FRANZEN et al. 2008).

A melanina presente nas células desses microrganismos é derivada de dihidroxinaftaleno (DHN), um composto hidrofóbico de carga negativa com alto peso molecular, produzido por polimerização oxidativa fenólica e/ou indólica (HOOG et al., 2007). Outras proteínas relacionadas com a biossíntese de melanina são largamente encontradas entre espécies do gênero *Fonsecaea*, como Policetídeo sintase, tipo III, Policetídeo ciclase/desidrose e Citalona desidratase com um papel na via de DHN-melanina; Domínio de ligação ao cobre da tirosinase relacionadas com DOPA-melanina percurso e Homogentisado 1,2-dioxigenase, Glutationa S-transferase, classe Zeta e 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase relacionados com a via de degradação da L-tirosina. Há também algumas enzimas-chave envolvidas na biossíntese de melanina, incluindo a família das oxidases multicobre (MCOs) (Multicopper oxidase - C-terminal, Multicopper oxidase - N-terminal e Multicopper oxidase, bilirrubina oxidases e ascorbato oxidases (HOEGGER et al., 2006).

O estudo Xie et al. (2011) revelou expressão diferencial do gene do ciclo de divisões celulares 42 (Cdc42) em *F. monophora*. Esse gene desempenha papéis importantes durante o crescimento e desenvolvimento do fungo e apresentou maior expressão no estágio de corpos escleróticos em comparação com os estágios de micélio e conídio, o que indicou que o Cdc42 pode estar envolvido na formação de corpos escleróticos de *F. monophora*.

A melanização tem sido apontada como um fator importante de virulência em *Fonsecaea* spp. Assim, Li et al. (2016), através de um estudo de sequenciamento de transcriptoma juntamente com auxílio da RT-qPCR, detectaram um total de 2.283 genes diferencialmente expressos entre dois genótipos de *F. monophora*, um isolado de lesão humana e outro do seu mutante albino. Nesse estudo, identificaram a maioria dos genes que codificam as principais enzimas envolvidas nas vias de biossíntese da melanina, incluindo policetídeo sintase (pks), multicobre oxidase (mco), lacase, tirosinase e homogentisato 1,2-dioxigenase (hmgA).

3.3 DIFERENCIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA UTILIZANDO A METODOLOGIA DE qPCR

Os estudos de expressão gênica fornecem dados que permitem compreender genes envolvidos nos mecanismos de patogenicidade melhor os dos microrganismos e seus processos metabólicos tendo em vista que o perfil de expressão do mRNA reflete a atividade dos genes individuais e caracteriza os processos que ocorrem dentro do tecido infectado (TRUKHACHEV et al., 2016). Segundo Ladeira, Isaac e Ferreira (2011) a qPCR (reação em cadeia da polimerase em tempo real) é um dos métodos de mensurar expressão gênica mais difundidos e confiáveis utilizados atualmente. O processo inicia-se pela extração do RNA presente nas células para poder realizar a fase RT (transcrição reversa) no qual a enzima transcriptase reversa sintetiza o cDNA correspondente de cada fita de RNA. Em seguida inicia-se a qPCR, que possui essa sigla por fornecer resultados quantitativos, diferentemente dos qualitativos da PCR convencional. Essa etapa caracteriza-se pela amplificação de um alvo específico no conjunto de cDNA, que ocorre, resumidamente, por meio do uso de uma DNA polimerase DNA-dependente termoestável (Taq polimerase), dois oligômeros específicos para servirem de iniciadores para a polimerase (primers) e um fluoróforo de DNA (SYBR Green I, por exemplo). Conforme as cópias do alvo vão sendo sintetizadas, o fluoróforo se liga a elas e, após ser excitado, emite luz proporcionalmente ao número de fragmentos. Através de análise gráfica pode-se quantificar a amostra inicial de cDNA que, não havendo erros, é proporcional a de mRNA (THERMOFISHER, 2022).

O sistema de análise através do SYBR Green I permite a ligação desse corante fluorescente a qualquer molécula de fita dupla, fazendo com que esse

agente intercalante detecte tanto alvos específicos como não específicos (NAVARRO et al., 2015). Por isso é necessário o desenvolvimento da curva de dissociação (também chamada de "Curva de Melting") logo após a amplificação do DNA. Nesse processo as moléculas passam por aumento de temperatura (por exemplo, de 60 a 90 graus) e a emissão de fluorescência é monitorada durante essa análise (NAVARRO et al., 2015). No momento em que as moléculas atingem a temperatura de melting (Tm) metade dos produtos do PCR encontram-se unidos e a outra metade dissociada, depois desse ponto o sinal de fluorescência decai em virtude da dissociação do corante. Esse ponto de melting (Tm) é dependente do tamanho do produto e/ou composição de nucleotídeos, apresentam picos distintos no gráfico da derivada de fluorescência versus a temperatura de acordo com cada produto de amplificação (NAVARRO et al., 2015; VALASEK; REPA, 2005). Por meio da Curva de Melting pode-se visualizar se há apenas um produto de amplificação através da observação de apenas um pico na curva de dissociação. Se houver outros produtos de amplificação não específicos ou dímeros de primers verifica-se a presença de dois ou mais picos, que geralmente aparecem antes do pico do produto específico devido à desnaturação ocorrer em temperaturas mais baixas (NAVARRO et al., 2015; VALASEK; REPA, 2005).

Conforme cita Prada-Arismendy e Castellanos (2011), a linha pontilhada mostra a fluorescência durante o processo de aquecimento; em baixas temperaturas o DNA está na forma de fita dupla e tem 100% de fluorescência (eixo direito). À medida que aquecem, os fios desnaturados produzem menos sinal. Após o processamento matemático de tais dados (decorrente de mudanças de fluorescência *versus* derivada da temperatura, dF/dT), obtem-se os dados de fluorescência específicos, Rn (eixo esquerdo). Assim, há dois picos, o pico inferior à esquerda, 72°C, correspondendo à curva de dissociação dos dímeros de *primers* que podem ser formados durante a reação. Os picos à direita a 81,5°C que apresentam maior intensidade, correspondendo à curva de dissociação de dois produtos de amplificação específicos obtidos (FIGURA 2).

Análises de diferenciação da expressão gênica podem ser realizadas através quantificação absoluta ou relativa. Na quantificação absoluta, o número total de cópias do produto da qPCR é obtido através da comparação com uma curva padrão. Enquanto na quantificação relativa, o sinal da sequência de interesse é comparado com o de um controle, sendo o método de *Ct* Comparativo o tipo de análise mais

utilizada, o qual consiste em utilizar o cálculo de Delta-Delta ct ($\Delta\Delta$ Ct e 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}) confome anteriormente publicado (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; APPLIED BIOSYSTEMS, 2022). Para este método mede-se o valor de *Ct* ("*Cycle Threshold*") em relação ao controle, com baixos valores de *Ct*, indicando maiores níveis de expressão, pois são necessários menos ciclos de amplificação para atingir o limiar. Entretanto, maiores valores de *Ct* indicam menores níveis de expressão (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; RAO et al., 2013).

FIGURA 2 – ANÁLISE DA CURVA DE DISSOCIAÇÃO A PARTIR DE UM ENSAIO DE PCR EM TEMPO REAL



FONTE: Adaptado de Prada-Arismendy; Castellanos (2011).

As diferenças quantitativas no mRNA produzido durante um ensaio de qPCR não dependem apenas da atividade do gene – elas também dependem das condições experimentais, particularmente da quantidade inicial de cDNA. Para obter um resultado válido, é necessário começar exatamente com a mesma quantidade de cDNA nas amostras tratadas e não tratadas, e isso é difícil de conseguir (THERMOFISHER, 2022).

A solução desse problema está em incluir um segundo gene conhecido por não ser afetado pelo tratamento em cada amostra, onde qualquer diferença no mRNA detectado será o resultado de alterações na concentração inicial de cDNA. Para isso, é realizada uma comparação com os padrões de expressão gênica entre o segundo gene e o gene de interesse para descobrir o valor "verdadeiro". Este segundo gene pode ser denominado como "controle endógeno", mas também é conhecido como "normalizador", "gene de referência" ou "gene de controle interno" (THERMOFISHER, 2022).

De acordo com Livak e Schmittgen (2001) e com os guias disponíveis sobre o *software* de análise da expressão gênica da Applied Biosystems (2010) é necessário medir os valores de *Ct* do gene-alvo e do gene de expressão endógena. Os valores de *Ct* devem ser medidos em condições de tratamento e de controle.

Segundo Livak e Schimittgen (2001) a equação para quantificação por 2^{-∆∆Ct} é:

quantidade relativa =
$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$
 (1)

Sendo que:

$$-\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{tratamento} - \Delta Ct_{controle}$$
(2)

$$\Delta Ct = Ct_{gene \ de \ interesse} - Ct_{gene \ endógeno} \tag{3}$$

A quantidade relativa $2^{-\Delta\Delta Ct}$, corresponde ao valor da razão dos níveis de expressão entre determinada condição em relação ao controle. Um valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ igual a 1 indica níveis de expressão semelhantes, valores maiores que 1 indicam expressão aumentada no tratamento, e valores abaixo de 1 indicam expressão gênica diminuída no tratamento (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Por exemplo, se a amostra alvo produz duas vezes mais mRNA que a amostra controle, o resultado é um valor de 2 (THERMOFISHER, 2022). Os genes endógenos utilizados como referência devem ser expressos em todas as condições e para serem considerados válidos, os níveis de expressão não devem variar entre as amostras (THERMOFISHER, 2022).

Existem diversos exemplos da utilização da qPCR que demonstram sua eficácia para avaliar as diferenças na expressão gênica em diversas situações, como em músculos de ovinos (TRUKHACHEV et al., 2016), em aqueles associados ao declínio das frutas cítricas (ABREU et al., 2015) ou mesmo aqueles expressos durante a fagocitose de fungos *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* (GOULART,

2009). A avaliação da expressão gênica utilizando modelos experimentais tem sido amplamente utilizada, pois possibilita avaliar fatores relacionados à progressão de doenças e resposta imune do hospedeiro de maneira rápida e com baixo custo (KINSHOKU et al., 2012; ALCAROZ et al., 2019).

3.4 MODELO PARASITÁRIO

Organismos modelo são ferramentas importantes para a investigação científica, pois fornecem dados biológicos que possibilitam a validação de procedimentos. Os modelos parasitários são selecionados de acordo com a sua capacidade de reproduzir a doença ou a resposta imune que se objetiva analisar (MONTEIRO et al., 2009). Animais pequenos têm grande vantagem devido seu baixo custo de manutenção e rápida reprodução, não necessitando de grandes estruturas para cultivá-los em laboratórios (MONTEIRO et al., 2009). Exemplos de animais amplamente utilizados como modelos experimentais, inclusive para estudos genéticos, inclui dípteros como a mosca Drosophila melanogaster (POTTER et al., 2000; LEONI, 2012) e o peixe Danio rerio (SOUSA et al., 2017; CASTRO et al., 2022). No caso de modelos para reprodução de doenças infecciosas causadas por fungos, tais como a cromoblastomicoses, diversos modelos tem sido utilizados entre eles, modelos murinos (VICENTE et al., 2017; FORNARI et al., 2018) e larvas de artrópodes como Galleria mellonella (Arthropoda: Lepidoptera) (VICENTE et al., 2017) e Tenebrio molitor da classe Arthropoda, ordem Coleoptera (TAKIGUCHI et al., 1992; JOHNSTON; MAKAROVA; ROLFF, 2014; ZHU; WU; ZHANG, 2014; YANG et al., 2017; FORNARI et al., 2018).

Segundo o publicado no boletim EMBRAPA (2007), a larva-da-farinha (*T. molitor*) é um inseto que infesta grãos armazenados, possui tamanho avantajado e têm distribuição cosmopolita e por isso suas larvas são bastante usadas como referência de laboratório para testes com agentes biológicos. Conforme cita EMBRAPA (2007), estes insetos não voam e têm preferência por ambientes secos e escuros, são holometabólicos passando por quatro fases distintas: ovo, larva, pupa e adultos. Esta espécie é de fácil manutenção em laboratório, pois ocupam pouco espaço e tem baixo custo de manutenção, sendo assim um animal muito usado para modelos experimentais (FIGURA 3).



FIGURA 3 – ASPECTOS MORFOLÓGICOS DE Tenebrio molitor

FONTE: Adaptado de AgroLink (2022). A: Larva; B: Pupa; C: Besouro.

As larvas de *T. molitor* demonstram ser eficazes como modelo de infecção para diversos experimentos. Entre eles é possível citar o trabalho de Tavares e Moura (2022) que avaliou a eficiência como modelo experimental de infecção por bactérias patogênicas humanas, assim como a pesquisa de Naliato (2022) que as utilizou para avaliar a virulência de espécies clínicas e ambientais de fungos patogênicos do gênero *Sporothrix*, sendo que ambos os estudos obtiveram resultados que indicam eficiência de *T. molitor* como modelo experimental.

O estudo realizado por Fornari et al., (2018) demonstrou o potencial de virulência da espécie sapróbia *F. erecta* no modelo animal, confirmando dados anteriores publicados por Vicente et al. (2017), utilizando como modelo *Galleria mellonella*. No entanto, *T. molitor* utilizado por Fornari et al. (2018) representou um modelo mais adequado para reproduzir a doença, pois as larvas dessa espécie têm um ciclo de vida mais longo que as de *G. mellonella*, podendo viver por até 1 ano, enquanto *G. mellonella* vive cerca de 6 semanas. Além disso, em

T. molitor os autores observaram pela primeira vez estruturas semelhantes às células muriformes produzidas durante a infecção do tecido humano. Os resultados desse estudo confirmam o papel das células muriformes como uma adaptação patogênica em tecidos animais.

Diante desses fatos, a larva de *T. molitor* tem sido objeto de estudo para fins modelos parasitário e pode então ser utilizada para estudos envolvendo análise de expressão gênica, favorecendo a elucidação da expressão de alguns genes de virulência em cultura e biópsia, visando correlacionar com genes previamente associados à infecção em humanos.

4 METODOLOGIA

4.1 LINHAGENS

Para este estudo foi utilizada a linhagem tipo CBS 269.37 de *Fonsecaea monophora* isolada de lesões de cromoblastomicose humana, a qual possui dados de transcriptoma gerados pelo grupo de pesquisa do curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia da Universidade Federal do Paraná (UFPR). A linhagem está devidamente depositada no acervo do Centro de Coleções Microbiológicas da Rede Paranaense Taxonline - CMRP/Taxonline (http://taxonline.bio.br/index.php). As culturas foram mantidas em ágar e caldo Sabouraud Dextrose (FORNARI et al., 2018) à 28 °C.

4.2 INOCULAÇÃO DE LINHAGENS DE Fonsecaea monophora EM LARVAS DE Tenebrio molitor E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE INFECÇÃO E VIABILIDADE DO FUNGO NO TECIDO ANIMAL

As primeiras larvas de *T. molitor* foram compradas em casa de produtos de pesca. Essas larvas matrizes foram cultivadas no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia Básica da UFPR e a partir da sua reprodução foram obtidas as demais larvas utilizadas nesta pesquisa.

Os experimentos foram realizados com inóculos frescos. Cada inóculo foi preparado a partir de raspados de culturas de *F. monophora* que foram adicionados a um microtubo contendo um volume de 1 mL de solução PBS previamente esterilizada e homogeneizados em agitador tipo vórtex. Em seguida 10 µL da suspensão eram colocadas em câmara de Neubauer para contagem de esporos. Para verificar a viabilidade dos esporos em solução esta foi diluída em alíquotas de 1:100 e 1:1000 a fim de verificar a quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC) na suspensão que posteriormente seria inoculada nas larvas, com 10 µL da suspensão de esporos sendo adicionados sobre uma placa de ágar Sabouraud Dextrose e espalhada com o auxílio de uma alça de Drigalski previamente esterilizado para avaliar possíveis contaminações da solução. As culturas foram mantidas a 28 °C e avaliadas após 10 dias.

O procedimento de inoculação das larvas com a solução de esporos fúngicos foi realizado com base no método utilizado por Fornari et al. (2018), utilizando larvas de T. molitor de aproximadamente 100-200 mg. Um volume de aproximadamente 1 × 10⁶ células/mL suspenso em solução tampão fosfato-salino (PBS) esterilizada foi utilizado como inóculo e injetado na porção ventral da hemocele do animal, no segundo ou terceiro esternito visível acima das pernas, em alíquotas de 5 µL, utilizando uma seringa Ultra-fine 8 mm. Os controles negativos foram compostos por larvas inoculadas com um volume de 5 µL de PBS. As larvas foram colocadas em placas de Petri esterilizadas e mantidas no escuro a temperatura de 37 °C. Os experimentos foram realizados de forma quadruplicada com grupos de dez animais, somando um total de 20 larvas por ensaio. Após inoculação e 10 dias de incubação, amostras das larvas sobreviventes eram coletadas. Ao final de cada etapa também foi realizada a cultura microbiológica da hemolinfa das larvas infectadas com a suspensão de esporos que sobreviveram após 10 dias da inoculação para verificar a viabilidade dos esporos fúngicos. Para tal avaliação, a hemolinfa das larvas selecionadas foi espalhada sobre uma placa de ágar Sabouraud Dextrose com o auxílio de uma alça de inoculação. As culturas foram mantidas a 28 °C e avaliadas após 10 dias.

4.2.1 Confirmação da presença de Fonsecaea monophora nas larvas infectadas

Com o objetivo de identificar e confirmar a presença de *F. monophora* no tecido das larvas de *T. molitor infectadas* foi realizada cultura monospórica da levedura negra isolada na cultura da hemolinfa de uma das larvas inoculadas com a suspensão de esporos (vide 4.2). Como controle negativo foram realizadas culturas da hemolinfa de *T. molitor* inoculadas apenas com solução PBS.

A identificação preliminar foi realizada segundo Hoog et al. (2014) com base em características macro e microscópicas das colônias após a cultura em ágar Sabouraud Dextrose incubadas a 28 °C. A partir destas culturas monospórica, foi realizada a extração do DNA utilizando o protocolo descrito por Vicente et al., (2008). A confirmação de que a linhagem inoculada foi a mesma re-isolada da larva após 10 dias de inoculação foi verificada através do sequenciamento da região ITS, obtido a partir de uma das amostras de levedura negra isolada da larva. A suspensão de DNA foi amplificada e sequenciada a região ITS1-5.8S rDNA-ITS2, usando os *primers* universais ITS1 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG3' e ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (WHITE et al., 1990; O'DONNELL,1992) de acordo com protocolo descrito por Vicente et al. (2008). O sequenciamento foi realizado em sequenciador ABI3500XL (Applied Biosystems[™]). As sequências *forward* e *reverse* obtidas foram alinhadas utilizando *software* Mega7 e a sequência consenso obtida a partir delas foi comparada com o banco de dados Blast do GenBank (NCBI) para verificar se o fragmento amplificado se equiparava com sequências de linhagens *F. monophora* disponíveis no banco de dados. Em seguida, um total de 70 linhagens de referência foram incluídas no estudo filogenético a fim de estabelecer as relações filogenéticas por análise de Máxima Verossimilhança em *software* Mega7 (ANEXO 1).

4.3 EXTRAÇÃO DE RNA

4.3.1 Extração de RNA das linhagens de Fonsecaea monophora em cultura

A extração do RNA das colônias fúngicas foi realizada por meio dos seguintes passos: (I) As colônias foram maceradas utilizando gral e pistilo previamente esterilizados e refrigerados com nitrogênio líquido. (II) Em seguida foram adicionados 1.000 µL de TRIzol[™] seguido da adição de nitrogênio líquido, congelando a mistura. (III) Aguardou-se cerca de 2 minutos para que a amostra ficasse líquida novamente e então a solução foi transferida para um microtubo de 2 mL. (IV) Foram acrescentadas pérolas de vidro e a amostra foi colocada no agitador tipo vórtex por 30 segundos e incubadas por 10 minutos a 65 °C. (V) Na sequência foram adicionados 200 µL de clorofórmio e agitado no vórtex por 15 segundos. (VI) Foi incubado em temperatura ambiente por 3 minutos e depois (VII) centrifugado a 13.775 x g por 5 minutos. (VIII) Um volume de 500 µL da fase aquosa foi transferido para um novo microtubo, seguido da adição do volume de 300 µL de isopropanol, realizando a homogeneização por meio da inversão manual e cautelosa do tubo por três vezes, (IX) seguido da incubação em temperatura ambiente por 10 minutos. (X) Em seguida a mistura foi centrifugada a 13.775 x g por 15 minutos. (XI) O sobrenadante foi descartado e em seguida foi adicionado um volume de 500 µL de etanol 70% e (XII) centrifugado a 13.775 x g por 15 minutos e o sobrenadante descartado. Na sequência, (XIII) adicionou-se novamente 500 μ L de etanol 70% ea amostra foi centrifugada a 13.775 x g por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e (XIV) o microtubo foi colocado de tampa aberta para secar em temperatura ambiente, dentro da capela de fluxo laminar. (XV) Após a secagem o RNA foi ressuspendido em um volume de 20 μ L de água DEPC, quantificado em um espectrofotômetro NanoDrop® e avaliado quanto a qualidade em gel de agarose a 1%.

4.3.2 Extração de RNA de larvas de *Tenebrio molitor* dos grupos controles e infectadas

O protocolo de extração de RNA das larvas de *T. molitor* foi semelhante ao processo realizado para o fungo em cultura, apenas se diferenciando no começo do procedimento, onde as larvas foram maceradas individualmente utilizando gral e pistilo previamente esterilizados e refrigerados com nitrogênio líquido. Em seguida foram adicionados 1.000 μ L TRIzolTM e nesse momento o nitrogênio líquido foi adicionado diretamente na mistura que prontamente fica congelada. E então foi seguido o passo a passo descrito no item 4.3.1 (sem necessidade de acrescentar pérolas de vidro).

Após a secagem o RNA foi ressuspendido em um volume de 20 µL de água DEPC, quantificado em um espectrofotômetro NanoDrop® e avaliado quanto a qualidade em gel de agarose a 1%.

4.3.3 Tratamento do RNA com DNase

Com o intuito de remover o DNA extraído juntamente com o RNA, foi realizado o tratamento de todas as amostras de RNA com a enzima DNase. Em um microtubo de volume 0,5 mL acrescentou-se 1 µg da amostra de RNA, 1 µL DNase I Reaction Buffer (10X), 1 µL DNase I, Grau Amp, 1 U/µL do fornecedor Invitrogen™ e água tratada com DEPC para 10 µL. Em seguida foi realizado o protocolo de acordo com o fabricante.

4.3.4 Reação de transcriptase reversa para obtenção do cDNA

Para a obtenção do DNA complementar (cDNA) foi utilizado 2 µg de RNA total para um volume final de 20 µL por reação. Em seguida foi aliquotada 2 µL da mistura de reação High-Capacity RNA-to-cDNA[™] Kit da Applied Biosystems[™] em cada tubo.

Os tubos foram centrifuguados rapidamente concentrar o conteúdo e eliminar quaisquer bolhas de ar. Incubou-se a reação a 37 °C durante 60 minutos. Em seguida a reação foi aquecida a 95 °C por 5 minutos para paralisar a reação. Para a reação foi utilizado o *primer* oligo(dT) o qual possui uma cauda poli(A) que se liga à cauda poli(T) do mRNA então o cDNA é sintetizado a partir do mRNA, que reflete a atividade dos genes que estavam sendo expressos no momento da extração.

O cDNA obtido foi armazenado em freezer entre -25 °C e -15 °C para o uso posterior nas reações de PCR em tempo real. Com o intuito de padronizar as reações, as amostras de cDNA foram diluídas para ficarem na concentração de 10 ng/ μ L.

4.4 DESENHO E VALIDAÇÃO IN SILICO DE PRIMERS

Alguns genes foram selecionados para serem utilizados neste experimento segundo informações prévias disponíveis na literatura a respeito da sua ação dentro das células (MORENO et al., 2017; HUANG et al., 2015; BAZITO, 2012; OVERKAMP et al., 2002) e por meio dos estudos prévios de expressão diferencial realizado por (GOMES & VICENTE et al., dados não publicados).

Desta forma, os oligonucleotideos iniciadores "*primers*" foram desenvolvidos para genes identificados com expressão diferencial em transcriptoma de biopsia tecidual de corpo muriforme em relação a linhagem em condições de cultura (GOMES & VICENTE et al., dados não publicados). Os *primers* foram desenhados utilizando o *software* Primer3Plus (UNTERGASSER et al., 2012), tendo como base os genes alvo, com tamanho de cerca de 20 nucleotídeos cada, temperatura de anelamento em 60 °C. A quantidade de guanina e citosina foram mantidas em 50% para evitar a elevação da temperatura de anelamento e dissociação. As regiões com

muitas adeninas e timinas também foram evitadas para não ocasionar a diminuição da temperatura de anelamento. O tamanho do fragmento alvo foi estabelecido entre 50 a 150 pb.

A validação *in silico* foi realizada através de comparação com as sequências de nucleotídeos depositadas no banco do NCBI utilizando a ferramenta primer-blast e pelo programa NetPrimer, onde foi verificada a possível formação de estruturas indesejadas, como *self* dímeros, hétero-dímeros e *hairpin*. Para evitar a formação de dímeros, os *primers* não poderiam apresentar variação da energia livre de Gibbs (Delta G) abaixo de -9 kcal/mole⁻¹ ou muitas bases complementares. Na análise de *hairpin*, além dos valores de Delta G, foi verificada a temperatura de *melting* (Tm), procurando manter os valores inferiores a 60°C para evitar auto anelamento. A Tm foi selecionada estimando-se que os valores entre cada par de *primers* fossem próximos, visando posteriormente estabelecer uma média na padronização da qPCR. As temperaturas divergentes, devido à alta variação, foram excluídas ou então, acrescentado bases adicionais na sequência do *primer* até se adequar à temperatura dos demais *primers*.

Os *primers* desenhados foram testados em reações de PCR e qPCR em concentrações de 100 nM, 300 nM e 600 nM com o intuito de verificar em qual dessas concentrações a reação foi mais eficiente.

Os genes selecionados foram: AYO21_09850 (NADPH-citocromo P450 redutase) pelo papel na oxidação de substâncias químicas xenobióticas estruturalmente diversas e endobióticos (GUENGERICH et al., 2009; HUANG et al., 2015); o gene AYO21_11301 (Peroxidase) que possui ação junto à resposta ao estresse oxidativo (CAVERZAN, 2008; BAZITO, 2012) e o gene AYO21_02611 (Formato desidrogenase) que está envolvido na oxidação do metanol e que possui ação na desintoxicação (VAN DEN BERG; STEENSMA, 1997; OVERKAMP et al., 2002). Também foram selecionados os genes denominados lacases/multicobre oxidases AYO21_05450 e AYO21_07092, que segundo Moreno et al. (2017) são genes que supostamente codificam para lacases. E por último foram selecionados os genes denominados AYO21_01584 (álcool desidrogenase) e AYO21_01590 (homocisteína S-metiltransferase) com base no relatado por Gomes & Vicente et al. (dados não publicados) que verificaram que estes estão diferencialmente mais expressos em biópsia de tecido humano infectado com *F. monophora* do que quando comparado com o mesmo fungo cultivado em meio de cultura.

No QUADRO 1 estão descritos os genes selecionados e as sequências de *primers* desenhadas para cada um deles.

Apoiado em estudos prévios de análise de expressão gênica em fungos (LI et al., 2016; CHAE et al., 2012; JACOB et al., 2012; NÓBREGA, 2011; XIE et al., 2011) foram selecionados genes candidatos a normalizadores da reação de qPCR. Os genes foram selecionados de acordo com sua estabilidade nas condições do experimento, servindo como padrão interno para normalizar os níveis de mRNA entre as diferentes amostras possibilitando uma comparação exata do nível de transcrição de mRNA (NYGARD et al., 2007).

Os genes escolhidos para a seleção de normalizadores da reação estão descritos na QUADRO 2.

Gene	Primer	Sequências (5' - 3')
AYO21_09850-NADPH-citocromoP450 redutase	NADPH.F	AGATCCCTTTGCCGAGTGC
AYO21_09850 (NADPH-citocromo P450 redutase)	NADPH.R	GAGCCGTTCTACACAAGCATC
AYO21_11301 (Peroxidase)	Peroxidase.F	CAACGCCCGAGAGTTTCCTA
AYO21_11301 (Peroxidase)	Peroxidase.R	TGAGACCAGCAGCGATTGAG
AYO21_02611 (Formato desidrogenase)	Dehydrogenase.F	CAAGCCGTTCGACTGCAAAG
AYO21_02611 (Formato desidrogenase)	Dehydrogenase.R	TCTTCGACACGTCTGCAACC
AYO21_05450 (Lacase)	AYO21_05450 (Lacase) F	ACTGGGGTGACACGTTGAAG
AYO21_05450 (Lacase)	AYO21_05450 (Lacase) R	TCTTCCATTGACGCAGACCG
AYO21_07092 (Lacase)	AYO21_07092 (Lacase) F	ACTCAATCTCGTGCCAAGGG
AYO21_07092 (Lacase)	AYO21_07092 (Lacase) R	TCGACCTCTTTGTGACGGTG
AYO21_01584 (álcool desidrogenase)	AYO21_01584 F	ACATCAGCATCATCTCGGGC
AYO21_01584 (álcool desidrogenase)	AYO21_01584 R	AGTTCTTCCACTACCGCGAC
AYO21_01590 (homocisteína S-metiltransferase)	AYO21_01590 F	CTTCTGGATGGCGGGTTAGG
AYO21_01590 (homocisteína S-metiltransferase)	AYO21_01590 R	TGACCATAGAGGTGTTGCGG
FONT	(0000)	

QUADRO 1 – *PRIMERS* DESENHADOS PARA OS GENES ALVO DO ESTUDO

FONTE: O autor (2020).

QUADRO 2 – PRIMERS PAR	A GENES CANDIDATOS A	A CONTROLE ENDÓGENO

Gene	Primer	Sequências (5' - 3')	Autor
Rps9	RPS9.192F	CCTCGACCAAGAGCTGAAG	NÓBREGA, 2011
Rps9	RPS9.254R	CCTCCAGACCTCACGTTTGTTC	NÓBREGA, 2011
Rpb2	Rpb2.F	TGCAGGAGCTGGTGGAAGA	JACOB et al., 2012
Rpb2	Rpb2.R	GCTGGGAGGTACTGTTTGATCAA	JACOB et al., 2012
β-tubulina	β-tubulina.F	ACAATGGCACCTCGGATCTC	XIE et al., 2011
β-tubulina	β-tubulina.R	AGCTCGAACAGCGTCCATAG	XIE et al., 2011
AYO21_07350 (gama actina)	Unigene (7394) F	TGGCTGGTCGTGATTTGA	Ll et al., 2016
AYO21_07350 (gama actina)	Unigene (7394) R	CTCTGGGAAGCGGTTTGA	LI et al., 2016
RPL27a	RPL27a F	TCATCCTGAAGGCAAAGCTCCAGT	CHAE et al., 2012
RPL27a	RPL27a R	AGGTTGGTTAGGCAGGCACCTTTA	CHAE et al., 2012

FONTE: O autor (2020).

4.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO POR qPCR

As reações de qPCR de cada amostra foram realizadas utilizando 1 µL do *pool* de *primers*, 1 µL de água ultrapura, 3 µL de SYBR™ Green PCR Master Mix da Applied Biosystems™ e 1 µL de cDNA. Para padronização das reações, a qPCR de todas as amostras foi realizada com 10 ng/µL de cDNA.

A PCR em tempo real foi realizada utilizando o equipamento da Applied Biosystems[™] Step-One Plus Real-Time PCR System e os resultados foram analisados usando o programa StepOne[™] Software v2.3.

TABELA 1 – CONDIÇÕES PARA AS REAÇÕES DE PCR EM TEMPO REAL

Passo	Temperatura	Tempo
1	95 °C	10min
2(40x)	95 °C	15s
2 (40X)	60 °C	1min
3	4 °C	1min

FONTE: O autor (2021).

A análise da variação de *Ct* dos genes endógenos candidatos à normalizadores das reações foi realizada com o auxílio do *software* RefFinder. Os resultados de cada conjunto de amostras (6 amostras, sendo 2 de larvas inoculadas, 2 de fungo controle e 2 de larva controle) foram avaliados com base na menor variação apresentada entre as condições experimentais.

Através da análise realizada pelo programa RefFinder (WANG et al., 2021), foi selecionado o par de *primer* candidato à controle endógeno que apresentou menor pontuação, indicando menor variação entre as amostras. A pontuação (também conhecida como pontuação de controle endógeno) é a variação média em pares do candidato a endógeno selecionado em comparação com todos os outros genes candidatos. Quanto menor a pontuação, mais estável é a expressão desse alvo em relação a todos os outros alvos na comparação (APPLIED BIOSYSTEMS, 2022).

Ao final das reações de qPCR foram realizadas as curvas de dissociação (Curva de Melting) com o intuito de verificar a especificidade da amplificação do gene alvo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A cultura microbiológica em ágar Sabouraud dextrose realizada a partir da suspensão de esporos de *Fonsecaea monophora* com o intuito de avaliar sua a viabilidade dos esporos, obteve resultados satisfatórios, com crescimento elevado das colônias fúngicas. Após a confirmação da viabilidade, a suspensão foi utilizada para inoculação das larvas.

A permanência da linhagem de *F. monophora* inoculada em larvas de *Tenebrio molitor* que foi avaliada através da cultura da hemolinfa das larvas após 10 dias da data do procedimento de inoculação demonstrou que foi possível isolar o fungo dentro de larvas vivas, evidenciando sua capacidade de permanência dentro do organismo do animal (FIGURA 4).

FIGURA 4 – CULTURA DA HEMOLINFA DE LARVAS DE *Tenebrio molitor* INFECTADAS APÓS 10 DIAS DA DATA DE INOCULAÇÃO



FONTE: O autor (2020). De I a IV: Diferentes larvas inoculadas. A: Crescimento das colônias - frente e B: Crescimento de colônias - verso.

Também foram realizadas culturas de larvas controle, com o intuito de verificar se estas não possuem fungos negros colonizando seu interior quando não estão inoculadas pelos mesmos (FIGURA 5).



FIGURA 5 – CULTURA DA HEMOLINFA DE LARVAS DE Tenebrio molitor (CONTROLE)

FONTE: O autor (2020). De I a IV: Diferentes larvas utilizadas como controle. A e B frente e verso da cultura.

Após isolamento e sequenciamento das linhagens obtidas a partir das larvas inoculadas, foi constatado que a linhagem de *F. monophora* inoculada era a mesma recuperada das larvas após 10 dias de experimento, conforme indicado pela .comparação da sequência obtida com o banco de dados genéticos GenBank seguida da análise filogenética (ANEXO 2), confirmando a capacidade de sobrevivência e viabilidade do fungo dentro do animal escolhido para ser o modelo experimental.

Para a padronização da extração de RNA a partir do fungo em cultura e das larvas infectadas foi empregado TRIzol[™] associado à maceração dos tecidos em gral e pistilos previamente refrigerados com nitrogênio líquido. Após a maceração era adicionado nitrogênio líquido suficiente para congelar a amostra. Esse método proporcionou a obtenção de maiores quantidades de RNA e com qualidade satisfatória onde foi observado bandas fortes e com pouco arraste, indicando boa quantidade da amostra e baixa degradação (FIGURA 6).

FIGURA 6 – COMPARAÇÃO DOS PERFIS DE RNA TOTAL OBTIDOS A PARTIR DAS AMOSTRAS DAS LARVAS DE *Tenebrio molitor* MACERADAS COM ADIÇÃO IMEDIATA E TARDIA DE NITROGÊNIO LÍQUIDO NA AMOSTRA



FONTE: O autor (2020). A: Perfil de RNA total obtido a partir da maceração direta da amostra acrescida de nitrogênio líquido, sendo M: Marcador de peso molecular 1kb. 1, 2: Primeiras amostras de RNA total obtido a partir de larvas inoculadas maceradas com adição direta de nitrogênio líquido ao tecido. Em ambas se observa possível degradação e excesso de DNA genômico. B: Perfil de RNA total obtido a partir do resfriamento prévio dos utensílios com nitrogênio líquido e adição do mesmo diretamente na amostra apenas após maceração do tecido, sendo M: Marcador de peso molecular 1kb. 1 a 12: Amostras de RNA total obtido a partir de larvas inoculadas que foram maceradas com refrigeração prévia do cadinho e pistilo. Observa-se que essa técnica proporcionou uma melhora na qualidade do RNA extraído, com pouca degradação e baixa contaminação por DNA genômico.

A padronização das técnicas de obtenção de RNA é importante para a eficiência das análises, permitindo realizar reproduções com maior precisão. De acordo com Takahashi et al. (1969) o uso do nitrogênio líquido é essencial para conter a ação das nucleases, entretanto notou-se que manipular a amostra acrescida de nitrogênio líquido diretamente nela dificulta o procedimento de maceração, diminuindo a quantidade e qualidade de RNA obtido. Foi observado que refrigerar os utensílios previamente ao aplicar nitrogênio líquido diretamente no gral e no pistilo antes de colocar as amostras dentro facilita a maceração e possibilita extração de maiores quantidades de RNA e com qualidade satisfatória.

Após a padronização da técnica de extração de RNA para o modelo experimental *T. molitor* foi possível realizar a análise da expressão de alguns genes do fungo *F. monophora*, onde um total de 150 amostras foram processadas e após verificação da qualidade do RNA obtido, 56 amostras foram selecionadas para dar continuidade ao experimento. Entre as 56 amostras que apresentaram qualidade satisfatória de RNA, foram utilizadas no experimento 20 amostras, sendo 10 amostras de *T. molitor* inoculado com *F. monophora*, 5 amostras de *F. monophora* em cultura para controle e 5 amostras *T. molitor* também para fins de controle.

Os pares de *primers* para os genes alvo AYO21_09850 (NADPH-citocromo P450 redutase), AYO21_11301 (Peroxidase), AYO21_02611 (Formato desidrogenase), AYO21_05450 (Lacase), AYO21_07092 (Lacase), AYO21_01584 (álcool desidrogenase) e AYO21_01590 (homocisteína S-metiltransferase) foram desenhados e validados, podendo, também, ser utilizados como marcadores de qPCR em estudos futuros.

Na FIGURA 7 estão representados os dados de estabilidade de cada gene candidato a normalizador das reações de qPCR, incluindo genes constitutivos e genes alvo do estudo. A partir desta análise verificou-se que o gene 5 (AYO21_01584 álcool desidrogenase) era o que se manteve mais estável nas diferentes amostras.



FIGURA 7 – ANÁLISE DE ESTABILIDADE DOS GENES ENDÓGENOS CANDIDATOS A NORMALIZADORES

FONTE: Adaptado do Software RefFinder (2022). Gene1: AYO21_07092 (Lacase). Gene2: AYO21_07350 (gama actina). Gene3: AYO21_05450 (Lacase). Gene4: AYO21_01590 (homocisteína S-metiltransferase). Gene5: AYO21_01584 (álcool desidrogenase). Gene6: RPL27a. Gene7: Btubulina. Gene8: AYO21_02611 (Formato desidrogenase). Gene9: AYO21_09850 (NADPH-citocromo P450 redutase). Gene10: AYO21_11301 (Peroxidase). Gene11: Rps9. Gene12: Rpb2. As barras em verdes representam o valor referente à estabilidade dos genes, valores mais baixos referem-se a uma maior estabilidade da expressão gênica.

Os genes candidatos a endógeno apresentaram alta taxa de variação, o que não é indicado para um gene normalizador de dados de qPCR, entretanto o gene alvo AY021_01584 (álcool desidrogenase) apresentou boa estabilidade nas diferentes amostras e, quando comparado com os demais genes, demonstrou ser

uma boa escolha para normalizar os dados de análise de expressão gênica, portanto esse foi o gene selecionado para ser o normalizador das reações de qPCR das amostras alvo e controle.

Os genes alvo do estudo foram selecionados com base na literatura. AYO21 09850 (NADPH-citocromo P450 redutase) é importante no metabolismo de esteroides, vitaminas, agentes cancerígenos, drogas e outros compostos, além de desempenhar papéis importantes na oxidação substâncias químicas xenobióticas estruturalmente diversas e endobióticos (GUENGERICH et al., 2009; HUANG et al., 2015). O gene que codifica AYO21 11301 (Peroxidase) foi selecionado, pois essa enzima tem importante ação junto à resposta ao estresse oxidativo (CAVERZAN, 2008; BAZITO, 2012). AYO21_02611 (Formato desidrogenase) está envolvido na oxidação do metanol em microrganismos metilotróficos e possui ação na desintoxicação do formato exógeno em organismos não metilotróficos (VAN DEN BERG; STEENSMA, 1997; OVERKAMP et al., 2002). Também foram selecionados aenes denominados lacases/multicobre oxidases AYO21 05450 os е AYO21 07092, que segundo Moreno et al. (2017) são genes que supostamente codificam para lacases, enzimas que são capazes de catalisar a oxidação de vários compostos orgânicos aromáticos com a redução do oxigênio molecular a água. Além disso, as lacases são necessárias para a produção de melaninas fúngicas, um pigmento negro da parede celular reconhecido como um polímero chave para patogenicidade e extremotolerância em fungos semelhantes a leveduras negras. E por último foram selecionados os genes denominados AYO21 01584 (álcool desidrogenase) e AYO21 01590 (homocisteína S-metiltransferase) os quais ainda não foram devidamente caracterizados, entretanto, com base no relatado por GOMES e VICENTE et al. (dados não publicados), verificaram que estes estão diferencialmente mais expressos em biópsia de tecido humano infectado com *F. monophora* do que quando comparado com o mesmo fungo cultivado em meio de cultura.

Na TABELA 2 estão representados os resultados de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ obtidos a partir da média de *Ct's* de cada amostra na qPCR, seguido do cálculo de ΔCt e $\Delta\Delta Ct$ para finalmente chegar nos dados de $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Gene	2 ^{^-∆∆Ct} larva inoculada vs fungo controle
AYO21 07092 (Lacase)	2,44
AYO21_07350 (gama actina)	0,01
AYO21_05450 (Lacase)	0,10
AYO21_01590 (homocisteína S-metiltransferase)	0,09
AYO21_01584 (álcool desidrogenase)	0,80
RPL27a	141701,94
B-tubulina	0,00
AYO21_02611 (Formato desidrogenase)	0,04
AYO21_09850 (NADPH-citocromo P450 redutase)	8,90
AYO21_11301 (Peroxidase)	1,59
Rps9	62,54
Rpb2	73,07
FONTE: O autor (2022).	

TABELA 2 – $2^{-\Delta\Delta CT}$ LARVA INOCULADA VS FUNGO CONTROLE

Na FIGURA 8 estão demonstrados os níveis de expressão dos genes alvos em larvas inoculadas quando comparados ao fungo controle.

FIGURA 8 – NÍVEIS DE EXPRESSÃO GÊNICA DOS GENES ALVO

9 8 7 6 5 4 2^-AACt 3 2 2 4 4 1 1,59 0,09 0,0,4 0.1 0 0.8 Chothome Past A4021-07092 AX021 05450 ANO21-01-590 A7021 01584 Petotidase Formate

2^-∆∆Ct Larva Inoculada vs Fungo Controle

FONTE: O autor (2022). As barras representam o valor dos níveis de expressão dos genes alvos em larvas inoculadas quando comparados ao fungo controle. Os genes AYO21_07092 (Lacase), AYO21_09850 (NADPH-Citocromo P450 redutase) e AYO21_11301 (Peroxidase) apresentaram expressão mais elevada quando comparados ao controle, sendo AYO21_07092 2,44 vezes mais expresso, AYO21_09850 (NADPH-Citocromo P450 redutase) 8,9 vezes mais expresso e AYO21_11301 (Peroxidase) 1,59 vezes mais expresso na larva inoculada do que no fungo controle. Esses genes apresentam expressão aumentada no modelo animal infectado assim como em tecidos humanos acometidos por lesões causadas pelo mesmo fungo (GOMES e VICENTE et al., dados não publicados). Esse resultado sugere que esses genes são importantes para a manutenção do fungo dentro do tecido do hospedeiro, podendo possivelmente ser utilizados como alvo para os tratamentos de pacientes acometidos pela doença causada por este patógeno oportunista.

Os genes AYO21_05450 (Lacase), AYO21_01590 (homocisteína Smetiltransferase), AYO21_1584 (álcool desidrogenase) e AYO21_02611 (Formato desidrogenase) apresentaram níveis de expressão gênica diminuídos nas larvas inoculadas em relação ao fungo controle. Esses genes são diferencialmente expressos em tecido humano infectado por *F. monophora* (GOMES e VICENTE et al., dados não publicados), entretanto não apresentaram o mesmo perfil de expressão no modelo experimental. Nesse contexto, é possível relacionar esse resultado com ações de silenciamento gênico que alguns animais podem apresentar como ato de defesa. O silenciamento de RNA representa um sistema ancestral de defesa contra microrganismos e foram previamente descritos em plantas, fungos, animais e protozoários (LINDBO et al., 1993b; BAULCOMBE, 2000; MATZKE et al., 2001). Ele ocorre a partir de uma modificação epigenética que regula negativamente os genes (VAUCHERET; FAGARD, 2001) o que pode explicar o fato de estarem expressos em níveis diminuídos ou similares à condição controle.

Adicionalmente, os genes que inicialmente eram candidatos a genes controle do experimento também apresentaram níveis de expressão diferenciados nas amostras de larvas inoculadas em relação ao fungo controle. Na FIGURA 9 são apresentados os níveis de expressão dos genes candidatos a normalizadores, sendo possível notar altas taxas de expressão para os genes Rps9, Rpb2 e RPL27a em larvas inoculadas quando comparados ao fungo controle, com os genes β-tubulina e AYO21_07350 (gama actina) apresentaram níveis de expressão gênica diminuídos nas larvas inoculadas em relação ao fungo controle.

FIGURA 9 – NÍVEIS DE EXPRESSÃO GÊNICA DOS GENES SELECIONADOS PARA CANDIDATOS A NORMALIZADORES



FONTE: O autor (2022). As barras representam o valor dos níveis de expressão dos genes selecionados para candidatos a normalizadores comparando sua expressão em larvas inoculadas vs fungo controle.

Os genes Rps9 e Rpb2 apresentaram-se, respectivamente, 62,45 e 73,07 mais elevados nas amostras de larvas inoculadas quando comparados ao fungo controle. E o gene RPL27a demonstrou intenso aumento na expressão em amostras de larvas inoculadas, com 141.701,94 vezes mais expresso do que no fungo controle. Em contrapartida, os genes β -tubulina e AYO21_07350 (gama actina) apresentaram taxas de expressão diminuídas, com valor de 0 para β -tubulina e 0,01 para AYO21_07350 (gama actina).

Os genes RPL27a, Rpb2 e Rps9 codificam proteínas que compõe as subunidades ribossomais e inicialmente foram selecionados para candidatos à normalizadores das reações, conforme previamente reportado utilizaram (CHAE et al., 2012; JACOB et al., 2012; NÓBREGA, 2011) entretanto, nesse experimento apresentaram altos índices de expressão nas larvas inoculadas. Ao investigar na literatura vigente, verificou-se que proteínas ribossomais podem estar relacionadas à virulência do patógeno. Li et al. (2021) cita que um mutante de *Cryptococcus deneoformans* com inibição do gene que presumivelmente codifica uma proteína do domínio YEAST (Yst1) apresentou diminuição na expressão de genes que codificam as proteínas ribossomais, uma vez que o gene Yst1 apresenta estar relacionado com a expressão dos mesmos. No mutante deficiente de Yst1 a virulência de *C.*

deneoformans em *Galleria mellonella* foi reduzida, bem como sua resistência ao estresse osmótico, com a cepa mutante sendo hipersensível a baixas temperaturas e drogas anti-ribossômicas, supostamente devido comprometimento da função ribossômica (LI et al. 2021). Os resultados do estudo de Li et al., (2021) ajudam a elucidar a importância de genes que codificam proteínas ribossomais e podem explicar o motivo dos genes RPL27a, Rpb2 e Rps9 estarem mais diferencialmente expressos em larvas inoculadas.

Ao fim das reações, foram selecionadas apenas amostras as quais obtiveram Curva de Melting indicativa de amostra específica, sendo descartadas amostras com curvas fora do padrão esperado (FIGURA 10).



FIGURA 10 - EXEMPLO DE CURVA DE DISSOCIAÇÃO (MELTING) FORA DO PADRÃO ESPERADO

FONTE: O autor (2022).

No ANEXO 3 foi sumarizado o resultado das curvas de dos genes analisados neste estudo. O resultado das curvas sugere especificidade nos produtos amplificados, com pouca probabilidade de formação de dímeros de *primers* e sem presença de contaminantes.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Modelos animais são importantes para a pesquisa clínica, pois por intermédio deles é possível reproduzir as condições experimentais necessárias para determinados estudos, possuindo baixo custo de manutenção e fácil cultivo em ambiente laboratorial.

A qualidade do material genético extraído das amostras interfere diretamente na eficiência das reações de qPCR, por isso a padronização da técnica é imprescindível para obter bons resultados. Nesse experimento foi demonstrado que o resfriamento prévio dos utensílios utilizados no procedimento de extração do RNA seguido da maceração do tecido favorece a obtenção de notável quantidade de RNA de boa qualidade.

A larva de *Tenebrio molitor* é um modelo interessante para análise diferencial de expressão gênica da levedura negra *Fonsecaea monophora*, a qual constatou ser capaz de infectar o tecido animal vivo por um período de pelo menos 10 dias. E assim como determinados genes apresentam-se diferencialmente expressos em tecido humano infectado por *F. monophora* também apresentam-se diferencialmente expressos no tecido da larva inoculada.

Contudo, alguns genes encontrados com elevada expressão no tecido humano infectado não demonstraram o mesmo padrão no modelo experimental utilizado. No entanto, faz se necessário ressaltar que esta expressão pode estar relacionada à modulação epigenética que provavelmente ocorre de forma diferente entre os hospedeiros animais, levando a expressão desses genes como um mecanismo de defesa e sobrevivência. Para isto, são necessárias maiores investigações, devido ao pequeno tamanho amostral, e para garantir que tal padrão de expressão não está relacionado à amplificação de produtos de PCR não específicos relacionados a RNAs expressos em *T. molitor*, espécie modelo para a qual ainda não existe um genoma completamente anotado. Ainda assim, a existência de genes que estão diferencialmente expressos em tecidos humanos infectados, mas que não demonstram o mesmo padrão em modelo experimental, conforme demonstrado neste estudo, pode contribuir para o conhecimento das rotas precisa de ação desses genes e quais as vias metabólicas são semelhantes entre humanos e modelos animais acometidos pelo mesmo patógeno.

REFERÊNCIAS

ABREU, J. R.; PAIVA, L. V.; RODRÍGUEZ, M. A. D.; SILVA, A. T.; HENRIQUES, A. R.; CHALFUN-JUNIOR, A. Identification and quantification of differentially expressed genes associated with citrus blight (*Citrus* spp.) Ciência e Agrotecnologia, 39 (1), 32-38. (2015) https://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542015000100004

ACAROZ, U.; INCE, S.; ARSLAN-ACAROZ, D.; GURLER, Z.; DEMIREL, H. H.; KUCUKKURT, I.; ERYAVUZ, A.; KARA, R.; VAROL, N.; ZHU, K.; Bisphenol-A induced oxidative stress, inflammatory gene expression, and metabolic and histopathological changes in male Wistar albino rats: protective role of boron, Toxicology Research, Volume 8, Issue 2, March 2019, Pages 262–269, https://doi.org/10.1039/c8tx00312b

AGROLINK. Besouro: *Tenebrio molitor*. Disponível em: <https://www.agrolink.com.br/problemas/besouro_2963.html>. Acessado em 10 jun. 2022.

ALMEIDA J. R. F.; KAIHAMI G. H.; JANNUZZI G. P.; ALMEIDA S. R. (2015). Therapeutic vaccine using a monoclonal antibody against a 70-kDa glycoprotein in mice infected with highly virulent *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis*. Med. Mycol. 53 42–50. 10.1093/mmy/myu049

APPLIED BIOSYSTEMS. Applied Biosystems StepOne[™] and StepOnePlus[™] Real-Time PCR Systems, Relative Standard Curve and Comparative CT Experiments: Getting Started Guide. 2010. Disponível em: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/cms_046736.pdf#page=172&zoom=100,58,352. Acessado em 25 fev. 2022.

APPLIED BIOSYSTEMS. Expression Suite Software Help. Disponível em: <file:///C:/Program%20Files%20(x86)/Applied%20Biosystems/ExpressionSuite/docs/ help/GUID-B28C0473-2B4F-4F43-BA0C-9D5090E6C154.html?local=true&nav=toc>. Acessado em 25 fev 2022.

ANDRADE, T.S.; CURY, A.E.; CASTRO, L.G.M.; HIRATA, M.H.; HIRATA, R.D.C. Rapid identification of *Fonsecaea* by duplex polymerase chain reaction in isolates from patients with chromoblastomycosis. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, v. 57, p. 267-272, 2007.

AZEVEDO, C. M. P. S.; GOMES, R. R.; VICENTE, V. A.; SANTOS, D. W. C. L.; MARQUES, S. G.; NASCIMENTO, M. M. F.; ANDRADE, C. E. W.; SILVA, R. R.; QUEIROZ-TELLES, F.; DE HOOG, G. S. 2015. *Fonsecaea pugnacius*, a novel agent of disseminated chromoblastomycosis. J Clin. Microbiol 53:2674–2685.

BADALI, H.; GUEIDAN, C.; NAJAFZADEH, M.J.; BONIFAZ, A.; GERRITS VAN DEN ENDE, A.H.G.; DE HOOG, G.S. Biodiversity of the genus *Cladophialophora*. Studies in Mycology, vol. 61, p. 175–191, 2008.

BAULCOMBE, D.C. 2000. Unwinding RNA silencing. Science 290:1108-9.

BAZITO, Olivia Domingues. Estresse oxidativo e bioluminescência nos fungos *Gerronema viridilucens* e *Mycena lucentipes*. São Paulo: 2012.

BOMBASSARO, AMANDA. Virulence aspects of *Fonsecaea* species associated to disseminated infection based on the comparative genomic analysis and in vivo assays. Curitiba, 2020.

BONIFAZ, A.; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, D.; PERUSQUÍA-ORTIZ, A.M. Subcutaneous mycoses: chromoblastomycosis, sporotrichosis and mycetoma. Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft, v.8, n.8, p. 619-27, 2010.

CARDONA-CASTRO N.; AGUDELO-FLOREZ P.; RESTREPO-MOLINA R. (1996). Chromoblastomycosis murine model and in vitro test to evaluate the sensitivity of *Fonsecaea pedrosoi* to ketoconazole, itraconazole and saperconazole. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 91 779–784. 10.1590/S0074-02761996000600026

CASTRO, P. L.; FERRAZ, A. L. J.; PATIL; J. G.; RIBEIRO, R. P. Use of melatonin as an inhibitor of apoptotic process for cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. Brazilian Journal of Biology, 2022, vol. 82, e241081 | https://doi.org/10.1590/1519-6984.241081

CAVERZAN, Andréia. Caracterização funcional dos genes de ascorbato peroxidase de arroz (*Oryza sativa* L.) nas interações entre estresse oxidativo e estresses abióticos. Porto Alegre: 2008.

CHAE, J.-H.; KUROKAWA, K.; SO, Y.-I.; HWANG, H. O.; KIM, M.-S.; PARK, J.-W.; JO, Y.-H.; LEE, Y. S.; LEE, B. L. Purification and characterization of tenecin 4, a new anti-Gram-negative bacterial peptide, from the beetle *Tenebrio molitor*. Developmental & Comparative Immunology. Volume 36, Issue 3, March 2012, Pages 540-546.

CORREIA, R. T. M.; VALENTE, N. Y. S.; CRIADO, P. R.; MARTINS, J. E. C. Cromoblastomicose: relato de 27 casos e revisão da literatura. An Bras Dermatol. 2010; 85(4):448-54

HOOG, G. S.; NISHIKAKU, A. S.; FERNANDEZ-ZEPPENFELDT, G.; PADÍN-GONZÁLEZ, C.; BURGER, E.; BADALI, H.; RICHARD-YEGRES, N.; VAN DEN ENDE, A. H. G. Molecular analysis and pathogenicity of the *Cladophialophora carrionii* complex, with the description of a novel species. Studies in Mycology, 2007, 58, 219–234. doi:10.3114/sim.2007.58.08

HOOG, G. S.; VICENTE, V.A.; NAJAFZADEH, M. J.; HARRAK, M. J.; BADALI, H.; SEYEDMOUSAVI, E. S. Waterborne *Exophiala* species causing disease in cold-blooded animals. Persoonia, 27 (2011), pp. 46-72

HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; FIGUERAS, M. J. Atlas of clinical fungi. 4. ed. Utrecht: Universitat Rovira i Virgilli, 2014. Disponível em: <http://www.clinicalfungi.org/>. Acessado em 31 maio 2020. ELDRIDGE, M. L.; CHAMBERS, C. J.; SHARON, V. R.; THOMPSON, G. R. Fungal infections of the skin and nail: new treatment options. Expert Rev. Anti Infect. Ther. Early online, 1–17 (2014).

EMBRAPA TRIGO. POTRICH, T. D.; LORINI, I.; VOSS, M.; STEFFENS, M. C. S.; PAVANI, D. P. Sessão I – Fifotecnia, Fitossanidade, Solos, Comunicação e Sócio-Economia. METODOLOGIA DE CRIAÇÃO DE *Tenebrio molitor* EM LABORATÓRIO PARA OBTENÇÃO DE LARVAS. Passo Fundo, RS – 2007. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do82_12.htm>. Acessado em 28 ago 2019

FMUSP. Biotério Central da FMUSP. Produtos e Serviços Oferecidos pelo Centro de Bioterismo. ROE - Balb/c. – São Paulo, 2009. Disponível em: <http://www.biot.fm.usp.br/index.php?mpg=03.00.00&tip=CAMUNDONGO&id_ani=2 &caract=sim>. Acessado em 28 ago 2019

FORNARI, G.; GOMES, R. R.; DEGENHARDT-GOLDBACH, J.; DOS SANTOS, S. S.; ALMEIDA, S. R.; SANTOS, G. D.; MURO, M. D.; BONA, C.; SCOLA, R. H.; TRINDADE, E. S.; BINI, I. H.; FERREIRA-MABA, L. S.; KESTRING, D. R.; NASCIMENTO, M. M. F.; LIMA, B. J. F. S.; VOIDALESKI, M. F.; STEINMACHER, D. A.; SOLEY, B. D. S.; DENG, S.; BOCCA, A. L.; SILVA, M. B.; SALGADO, C. G.; AZEVEDO, C. M. P. E. S.; VICENTE, V. A.; DE HOOG, S. A Model for Trans-Kingdom Pathogenicity in *Fonsecaea* Agents of Human Chromoblastomycosis. Front Microbiol. 2018 Oct 9;9:2211. doi: 10.3389/fmicb.2018.02211.

FRANZEN, A. J., CUNHA, M. M. L., MIRANDA K., HENTSCHEL, J., PLATTNER, H., SILVA, M. B., SALGADO, C. G., SOUZA, W., ROZENTAL, S. Ultrastructural characterization of melanosomes of the human pathogenic fungus *Fonsecaea pedrosoi*. Journal of Structural Biology 162:75–84, 2008.

GOMES, R. R.; VICENTE, V. A.; AZEVEDO, C. M. P. S.; SALGADO, C. G.; SILVA, M. B.; QUEIROZ-TELLES, F.; MARQUES, S. G.; SANTOS, D. W. C. L.; ANDRADE, T. S.; TAKAGI, E. H.; CRUZ, K. S.; FORNARI, G.; HAHN, R. C.; SCROFERNEKER, M. L.; CALIGINE, R. B.; RAMIREZ-CASTRILLON, M.; ARAÚJO, D. P.; HEIDRICH, D.; COLOMBO, A. L.; DE HOOG, G. S. Molecular Epidemiology of Agents of Human Chromoblastomycosis in Brazil with the Description of Two Novel Species. PLOS Neglected Tropical Diseases | DOI:10.1371/journal.pntd.0005102November 28, 2016.

GOULART, L. S. Genes diferencialmente expressos por *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* durante a infecção de macrófagos. Porto Alegre: 2009

GUENGERICH, F. P.; MARTIN, M. V.; SOHL, C. D.; CHENG, Q. Measurement of cytochrome P450 and NADPH–cytochrome P450 reductase. Nat Protoc 4, 1245-1251 (2009). https://doi.org/10.1038/nprot.2009.121

HOEGGER P. J., KILARU S., JAMES T. Y., THACKER J. R., KÜES U. (2006). Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. FEBS J. 273, 2308–2326. 10.1111/j.1742-4658.2006.05247.x

HUANG, Y.; LU, X.-P.; WANG, L.-L.; WEI, D.; FENG, Z.-J.; ZHANG, Q.; XIAO, L.-F.; DOU, W.; WANG, J.-J. Functional characterization of NADPH-cytochrome P450 reductase from *Bactrocera dorsalis*: Possible involvement in susceptibility to malathion. Sci. Rep. 5, 18394; doi: 10.1038/ srep18394 (2015).

JACOB, TIAGO R.; PERES, NALU T. A.; PERSINOTI, GABRIELA F.; SILVA, LARISSA G.; MAZUCATO, MENDELSON; ROSSI, ANTONIO; MARTINEZ-ROSSI, NILCE M.. *rpb2* is a reliable reference gene for quantitative gene expression analysis in the dermatophyte *Trichophyton rubrum*, *Medical Mycology*, Volume 50, Issue 4, May 2012, Pages 368–377, https://doi.org/10.3109/13693786.2011.616230

JOHNSTON, P. R.; MAKAROVA, O.; ROLFF, J. Inducible Defenses Stay Up Late: Temporal Patterns of Immune Gene Expression in *Tenebrio molitor*. G3 Genes|Genomes|Genetics, Volume 4, Issue 6, 1 June 2014, Pages 947–955, https://doi.org/10.1534/g3.113.008516

KINSHOKU, M. R.; RODRIGUEZ, C. A. L.; FIDALGO, R. S.; DURAN, C. C. G.; LEME, P. L. S.; TCBC-SP4; DUARTE, I. S. Uso racional de modelos animais para pesquisa e ensino de microcirurgia. Rev. Col. Bras. Cir. 2012; 39(5): 414-417

LADEIRA, P. R. S.; ISAAC, C; FERREIRA, M. C. Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real. Rev Med (São Paulo). 2011 jan.mar.;90(1):47-51.

LEONI, Nicole de Melo. Modulação dietética utilizando lipídeos e resveratrol na senescência e formação do pufe *Hsp22* em *Drosophila melanogaster*. 2012.

LI, C.; HOU, S.; MA, X.; LI, J. HUO, L.; ZHANG, P.; HAO, X.; ZHU, X. Epigenetic regulation of virulence and the transcription of ribosomal protein genes involves a YEATS family protein in *Cryptococcus deneoformans*. FEMS Yeast Research, 2021, Vol. 21, No. 1

LI, X. Q.; GUO, B. L.; CAI, W. Y.; ZHANG, J. M.; HUANG, H. Q.; ZHAN, P.; XI, L. Y.; VICENTE, V. A.; STIELOW, B.; SUN, J. F.; DE HOOG, G. S. The role of melanin pathways in extremotolerance and virulence of *Fonsecaea* revealed by *de novo* assembly transcriptomics using illumina paired-end sequencing. STUDIES IN MYCOLOGY 83: 1–18. 2016.

LINDBO, J.A.; SILVA-ROSALES, L.; PROEBSTING, W.M.; DOUGHERTY, W.G. 1993b. Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: Implications for regulation of gene expression and virus resistance. Plant Cell 5:1749-59.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. METHODS 25, 402–408 (2001). doi:10.1006/meth.2001.1262, available online at http://www.idealibrary.com

LUPI, O.; TYRING, S. K.; MCGINNIS, M. R. Tropical dermatology: fungal tropical diseases. J Am Acad Dermatol 2005; 53 : 931 – 951.

MACHADO, A. P.; SILVA, M. R. R.; FISCHMAN, O. Local phagocytic responses after murine infection with different forms of *Fonsecaea pedrosoi* and sclerotic bodies originating from an inoculum of conidiogenous cells. (2009) Mycoses 54, 202–211

MAEKAWA L. E.; ROSSONI R. D.; BARBOSA J. O.; JORGE A. O. C.; JUNQUEIRA J. C.; VALERA M. C. (2015). Different extracts of *Zingiber officinale* decrease *Enterococcus faecalis* infection in *Galleria mellonella*. Braz. Dent. J. 26105–109. 10.1590/0103-6440201300199

MATZKE, M.; MATZKE, A.J. & KOOTER, J.M. 2001. RNA: Guiding gene silencing. Science 293:1080-3

MONTEIRO, R.; BRANDAU, R.; GOMES, W. J.; BRAILE, D. M. Tendências em experimentação animal. Rev Bras Cir Cardiovasc 2009; 24(4): 506-513.

MORENO, L. F.; VICENTE, V. A.; DE HOOG, S. Black yeasts in the omics era: Achievements and challenges. Medical Mycology, 2018, 56, S32–S41 doi: 10.1093/mmy/myx129

MORENO, L. F.; FENG, P.; WEISS, V. A.; VICENTE, V. A.; STIELOW, J. B.; DE HOOG, S. Phylogenomic analyses reveal the diversity of laccase-coding genes in *Fonsecaea* genomes. PLoS One. 2017; 12(2): e0171291. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171291

NALIATO, GEORGGIA FÁTIMA SILVA. Modelo invertebrado *Tenebrio molitor* para a avaliação da virulência de espécies clínicas e ambientais de fungos patogênicos do gênero *Sporothrix*. 2022. 42 f. Monografia (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2022.

NAVARRO, E. et al. Real-time PCR detection chemistry. Clinica Chimica Acta, v. 439, n. 5, p. 231-250, 2015.

NÓBREGA, Yanna Karla de Medeiros. Análise da expressão de genes envolvidos na interação inicial entre macrófagos murinos e *Fonsecaea pedrosoi* ou suas frações. 2011. xvii, 61 f., il. Tese (Doutorado em Patologia Molecular)—Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

NYGARD, A. B.; JØRGENSEN, C. B.; CIRERA, S.; FREDHOLM, M. Selection of reference genes for gene expression studies in pig tissues using SYBR green qPCR. BMC Molecular Biol 8, 67 (2007). https://doi.org/10.1186/1471-2199-8-67

O'DONNELL, K. Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaris*). Current Genetics, v. 22, p. 213-320, 1992.

OVERKAMP, K. M.; KÖTTER P.; VAN DER HOEK, R.; SCHOONDERMARK-STOLK, S.; LUTTIK, M. A.; VAN DIJKEN, J. P.; PRONK, J. T. Functional analysis of structural genes for NAD(+)-dependent formate dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast. 2002 Apr;19(6):509-20. doi: 10.1002/yea.856. PMID: 11921099. PRADA-ARISMENDY, J.; CASTELLANOS, J. E. Real time PCR. Application in dengue studies. Colomb Med. 2011; 42: 243-58.

PERDONI F.; FALLENI M.; TOSI D.; CIRASOLA D.; ROMAGNOLI S.; BRAIDOTTI P.; et al. (2014). A histological procedure to study fungal infection in the wax moth *Galleria mellonella*. Eur. J. Histochem. 58 24–28. 10.4081/ejh.2014.2428

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

QUEIROZ-TELLES, F. Chromoblastomycosis: a neglected tropical disease. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo vol.57 supl.19 São Paulo Sept. 2015

QUEIROZ-TELLES F, SANTOS DW. 2013. Challenges in the therapy of chromoblastomycosis. Mycopathologia 175:477–488. https://doi.org/10.1007/s11046-013-9648-x.

QUEIROZ-TELLES, F.; NUCCI, M.; COLOMBO, A. L.; TOBÓN, A.; RESTREPO, A. Mycoses of implantation in Latin America: an overview of epidemiology, clinical manifestations, diagnosis and treatment. Med Mycol 49: 225-236 (2011). doi: 10.3109 / 13693786.2010.539631.

QUEIROZ-TELLES, F.; ESTERRE, P.; PEREZ-BLANCO, M.; VITALE, R. G.; SALGADO, C. G.; BONIFAZ, A. Chromoblastomycosis: an overview of clinical manifestations, diagnosis and treatment. Med Mycol. 2009; 47(1): 3-15.

QUEIROZ-TELLES, F.; MCGINNIS, M. R.; SALKIN, I.; GRAYBILL, J. R. Subcutaneous mycoses. Infect Dis Clin N Am 17 (2003) 59–85. doi: 10.1016/S0891-5520(02)00066-1.

RAO, X.; HUANG, X.; ZHOU, Z.; LIN, X. An improvement of the 2^(-delta delta CT) method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. Biostat Bioinforma Biomath. 2013 Aug; 3(3): 71–85.

REBOUÇAS, E. L.; COSTA, J. J. N.; PASSOS, M. J.; PASSOS, J. R. S.; HURK, R. V. D.; SILVA, J. R. V. Real time PCR and importance of housekeepings genes for normalization and quantification of mRNA expression in different tissues. Engineering, Technology and Techniques • Braz. arch. biol. technol. 56 (1). Feb 2013. https://doi.org/10.1590/S1516-89132013000100019

REVANKAR, S. G. Dematiaceous fungi. Mycoses. 2007 Mar;50(2):91-101.

RODRIGUES, Marcio L. Negligenciadas entre as negligenciadas: perspectiva de prevenção, controle e diagnóstico de doenças causadas por fungos / Marcio L. Rodrigues. – Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2019.

SALGADO, C. G.; SILVA, J. P.; DINIZ, J. A. P.; SILVA, M. B.; COSTA, P. F.; TEIXEIRA, C.; SALGADO, U. I. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from thorns of *Mimosa pudica*, a probablenatural 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.; ALVIANO, D.S.; RODRIGUES, M.L.; ALVIANO, C.S. Biology and pathogenesis of *Fonsecaea pedrosoi*, the major etiologic agent of chromoblastomycosis. FEMS Microbiology Reviews, v. 31, p.570-591, 2007.

SCORZONI L.; LUCAS M. P.; MESA-ARANGO A. C.; FUSCO-ALMEIDA A. M.; LOZANO E.; CUENCA-ESTRELLA M.; et al. (2013). Antifungal efficacy during *Candida krusei* infection in non-conventional models correlates with the yeast in vitro susceptibility profile. PLoS One 8:e60047. 10.1371/journal.pone.0060047

SELBMANN, L., DE HOOG, G. S., MAZZAGLIA, A., FRIEDMANN, E. I., ONOFRI, S. Fungi at the edge of life: cryptoendolithic black fungi from Antarctic Desert. Studies In Mycology 51: 1–32, 2005.

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, v.27, p. 527–542, 2014.

SIQUEIRA, I. M. Imunopatologia da cromoblastomicose: modulação da resposta inflamatória por formas do fungo *Fonsecaea pedrosoi* e seu impacto na cromoblastomicose murina. Brasília – DF, 2016.

SOUSA, J. C.; MAGALHÃES-MARQUES, K. K.; CRUZ-MACHADO, S. S.; MORAES, M. N.; CASTRUCCI, A. M. L. Dexamethasone Modulates Nonvisual Opsins, Glucocorticoid Receptor, and Clock Genes in *Danio rerio* ZEM-2S Cells. Hindawi BioMed Research International Volume 2017, Article ID 8459385, 14 pages.

TAKAHASHI, T.; IRIE, M.; UKITA, T. A comparative study on enzymatic activity of bovine pancreatic ribonuclease A, ribonuclease S and ribonuclease S. Journal of Biochemistry, Oxford, v. 65, n. 1, p. 55-62, 1969.

TAKIGUCHI, M.; NIIMI, T.; SU, Z. H.; YAGINUMA, T. (1992). Trehalase from male accessory gland of an insect, *Tenebrio molitor*. cDNA sequencing and developmental profile of the gene expression. Biochemical Journal, 288(1), 19–22. doi:10.1042/bj2880019

TAVARES, R. V.; MOURA, R. S. Desenvolvimento de um modelo experimental de infecção por diferentes bactérias patogênicas humanas em larvas de *Tenebrio molitor*. Anais do Programa de Iniciação Científica da UniEVANGÉLICA, 2022.

TEIXEIRA, M. M.; MORENO, L. F.; STIELOW, B. J.; MUSZEWSKA, A.; HAINAUT, M.; GONZAGA, L.; ABOUELLEIL, A.; PATAN, J. S. L.; PADRE, M.; SOUZA, R.; YOUNG, S.; FERREIRA, K. S.; ZENG, Q.; DA CUNHA, M. M. L.; GLADKI, A.; BARKER, B.; VICENTE, V. A.; DE SOUZA, E. M.; ALMEIDA, S.; HENRISSAT, B.; VASCONCELOS, A. T. R.; DENG, S.; VOGLMAYR, H.; MOUSSA, T. A.; GORBUSHINA, A.; FELIPE, M. M.; CUOMO, C. A.; DE HOOG, G. S. Exploring the genomic diversity of black yeasts and relatives (Chaetothyriales, Ascomycota). Studies in Mycology, v. 86, p. 1–28, 2017.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. Princípios Básicos de RT-qPCR. Disponível em: https://www.thermofisher.com/br/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/basic-principles-rt-qpcr.html. Acessado em 06 mar 2022.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. Choosing an Endogenous Control for Gene Expression Analysis Using Real-Time PCR (qPCR). Disponível em: <https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-timepcr-learning-center/gene-expression-analysis-real-time-pcr-information/choosingendogenous-control-gene-expression-analysis-real-time-pcr.html>. Acessado em 06 mar 2022.

TRUKHACHEV, V.; SKRIPKI, V.; KVOCHKO, A.; KULICHENKO, A.; KOVALEV, D.; PISARENKO, S.; VOLYNKINA, A.; SELIONOVA, M.; AYBAZOV, M.; KRIVORUCHKO, A. Correlation between gene expression profiles in muscle and live weight in dzhalginsky merino sheep. Rev Colom Cienc Pecua vol.29 n°.3 Medellín July/Sept. 2016

UNTERGASSER, A.; CUTCUTACHE, I.; KORESSAAR, T.; YE, J.; FAIRCLOTH, B. C.; REM, M.; ROZEN, S. G. Primer3—new capabilities and interfaces. Nucleic Acids Research, Volume 40, Issue 15, 1 August 2012, Page e115, https://doi.org/10.1093/nar/gks596

VALASEK, M. A.; REPA, J. J. The power of real-time PCR. Advances in Physiology Education, v. 29, n. 3, p. 151-159, 2005.

VAN DEN BERG, M. A.; STEENSMA, H. Y. Expression cassettes for formaldehyde and fluoroacetate resistance, two dominant markers in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast. 1997 May;13(6):551-9. doi: 10.1002/(SICI)1097-0061(199705)13:6<551::AID-YEA113>3.0.CO;2-0. PMID: 9178506.

VAUCHERET, H. & FAGARD, M. 2001. Transcriptional gene silencing in plants: Targets, inducers and regulators. Trends in Genetics 17:29-35.

VICENTE, V.A.; ATTILI-AGELIS, D.; PIE, M.R.; QUEIROZ-TELLES, F.; CRUZ, 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, p. 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. (2013). Environmental siblings of black agents of human chromoblastomycosis. Fungal Divers. 65 47–63. 10.1007/s13225-013-0246-5

VICENTE V. A., NAJAFZADEH M. J., SUN J., GOMES R. R., ROBL D., MARQUES S. G., ET AL. (2014). Environmental siblings of black agents of human chromoblastomycosis. Fung. Div. 65, 47–63. 10.1007/s13225-013-0246-5

VICENTE, V. A.; WEISS, V. A.; BOMBASSARO, A.; MORENO, L. F.; COSTA, F. F.; RAITTZ, R. T.; LEÃO, A. C.; GOMES, R. R.; BOCCA, A. L.; FORNARI, G.; DE CASTRO, R. J. A.; SUN J.; FAORO, H.; TADRA-SFEIR, M. Z.; BAURA, V.; BALSANELLI, E.; ALMEIDA, S. R.; DOS SANTOS, S. S.; TEIXEIRA, M. M.; FELIPE, M. S. S.; DO NASCIMENTO, M. M. F.; PEDROSA, F. O.; STEFFENS, M. B.; ATTILI-ANGELIS, D.; NAJAFZADEH, M. J.; QUEIROZ-TELLES, F.; SOUZA, E. M.; DE HOOG, S. Comparative Genomics of Sibling Species of *Fonsecaea* Associated with Human Chromoblastomycosis. Front. Microbiol. 09 October 2017 | https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01924

WANG, Y.; ZHANG, Y.; LIU, Q.; TONG, H.; ZHANG, T.; GU, C.; LIU, L. HUANG, S.; YUAN, H. Selection and validation of appropriate reference genes for RT-qPCR analysis of flowering stages and different genotypes of *Iris germanica* L. Sci Rep 11, 9901 (2021). https://doi.org/10.1038/s41598-021-89100-y

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. PCR Protocols: A guide to methods and applications, p. 315-322. Academic Press: San Diego, U.S.A., 1990.

XI, L.; SUN, J.; LU, C.; LIU, H.; XIE, Z.; FUKUSHIMA, K.; TAKIZAWA, K.; NAJAFZADEH, M. J.; DE HOOG, G. S. Molecular diversity of *Fonsecaea* (Chaetothyriales) causing chromoblastomycosis in southern China. Medical Mycology, Volume 47, Issue 1, February 2009, Pages 27–33, https://doi.org/10.1080/13693780802468209

XIE, Z.; FENG, P.; ZHANG, J.; LI, X.; SUN, J.; LU, C.; HUANG, H.; XI, L. Molecular cloning, characterization and differential expression of Cdc42 in *Fonsecaea monophora*. Mol Biol Rep 39, 839-844 (2012). https://doi.org/10.1007/s11033-011-0806-2

YANG, Y.-T.; LEE, M. R.; LEE, S. J.; KIM, S.; NAI, Y.-S.; KIM, J. S. (2017). *Tenebrio molitor* Gram-negative-binding protein 3 (TmGNBP3) is essential for inducing downstream antifungal Tenecin 1 gene expression against infection with *Beauveria bassiana* JEF-007. Insect Science. doi:10.1111/1744-7917.12482

ZHU, JIA-YING; WU, GUO-XING; ZHANG, ZHONG. Upregulation of coleoptericin transcription in *Tenebrio molitor* parasitized by Scleroderma guani. Journal of Asia-Pacific Entomology. Volume 17, Issue 3, September 2014, Pages 339-342

ANEXOS

Nome	CBS	Outras referências	Substrato/Localização	GenBank
Cladophialophora arxi	306.94 (T)	IFM 52022	Abscesso traqueal, homem/DE	EU103986
Cladophialophora boppii	126.86 (T)	FMC 292	Lesão de pele, homem/BR	EU103997
Cladophialophora carrionii	260.83 (T)	CDC B-1352, FMC 282	Lesão de pele, homem/Desconhecido	EU137292
Cladophialophora devriesii	147.84 (T)	dH 15404	Homem/US	EU140595
Cladophialophora emmonsii	102594	dH 11918	Úlcera na mão/US	KF155214
Cladophialophora imunda	834.96 (T)	dH 21287	Micose subcutânea, homem/US	EU137318
Cladophialophora yegresii	114405 (T)	UNEFM SgSr3	Cactos Stenocereus griseus/VE	EU137322
Cyphellophora ambígua	235.93 (T)	dH 15593	Unha humana/NL	JQ766431
Cyphellophora capiguarae	132767 (T)	dH 22956	Formiga/BR	KF928464
Cyphellophora fusarioides	130291 (T)	MUCL 44033, IHEM 6073	Homem/IL	JQ766439
Cyphellophora guayanensis	124764 (T)	CPC 13412, CPC 13413	Eucalyptus sp./AU	GQ303274
Cyphellophora guayanensis	129342	MUCL 43737	Desconhecido	MH865228
Cyphellophora laciniata	190.61 (T)	ATCC 14166, MUCL 9569	Pele, homem/CN	EU035416
Cyphellophora laciniata	239.91	dH 15600	Pele, homem/NL	JQ766424
Cyphellophora livistonae	133589 (T)	CPC 19433	Desconhecido	KC005774
Cyphellophora ludoviensis		CMRP 1317	Lesão de pele, humano/BR	KX434722
Cyphellophora olivacea	122.74	I	Papel de parede úmido/DE	KC455247
Cyphellophora oxyspora	698.73 (T)	UAMH 4935	Clerodendrum monassa, folha/LK	NR_132883
Cyphellophora oxyspora	124686	dH 17079	Unha do pé/DK	JQ766451
Cyphellophora oxyspora	416.89	dH 17023	Pele Humana/DK	JQ766449
Cyphellophora pauciseptata	284.85 (T)	dH 15679	Pele, Homem/NL	NR_132868
Cyphellophora pluriseptata	286.85 (T)	ATCC 62672	Pele do pé, homem/NL	FN908214
Cyphellophora reptans	113.85 (T)	dH 15292	Comida no meio ambiente/SE	NR_121346
Cyphellophora reptans	152.90	dH 15424	Unha humana/NL	JQ766446
Cyphellophora reptans	120903	dH 12534	Água Potável/DE	JQ766448
Cyphellophora sessilis	238.93	I	Filtro biológico para fumos contendo estireno/NL	KF928459
Cyphellophora sessilis	243.85	LM 328	Resina, <i>Picea abie</i> s	EU514700
Cyphellophora sp.	ı	CMRP 3103	Abelha/BR	MH705341
Cyphellophora suttonii	449.91 (T)	dH 15893	Orelha de cachorro/US	JQ766464
Cyphellophora vermispora	228.86 (T)	dH 15574	Raiz de <i>Triticum aestivum/</i> DE	JQ766426
Exophiala angulospora	482.92 (T)		Agua Potável/JP	EF413618
Exophiala equina	116009	dH 13221, F1090	Tartaruga de Galápagos/US	JF747095
Exophiala jeanselmei	507.90(T)	dH 15933, ATCC 34123		AY156963
Exopniaia jeanseimei	01.10	-	Miceroma/UK	AYTOJOJA

ANEXO 1 - LINHAGENS DE REFERÊNCIA UTILIZADAS PARA A CONFECÇÃO DA ÁRVORE FILOGENÉTICA DE Fonsecaea monophora (continua)

Nome	CBS	Outras referências	Substrato/Localização	GenBank
Exophiala jeanselmei	116.86		Micetoma/JP	AY163556
Exophiala pisciphila	537.73 (T)	AFTOL 669, ATCC 24901	Peixe Ictalurus punctatus/US	AF050272
Exophiala salmonis	157.67 (T)	BMU 00834	Truta, cérebro/CA	JF747137
Exophiala spinifera	101534	IFM 41698	Solo/CN	MF039706
Exophiala spinifera	899.68 (T)	ı	Granuloma nasal/US	AY156976
Exophiala xenobiotica	117642	ı	Ferida no pé/US	DQ182593
Exophiala xenobiotica	117753	ı	Ferida na perna/US	359051911
Exophiala xenobiotica	117641	1	Cisto no joelho/US	DQ182591
Exophiala xenobiotica	118157 (T)	ı	Solo de derramamento de óleo/VE	DQ182587
Exophiala xenobiotica		CMRP 3077	Exoesqueleto de formiga/BR	MH704245
Fonsecaea brasiliensis	119710 (T)	dH 16818	Caranguejo/BR	JN173784
Fonsecaea brasiliensis		CMRP 3445	Cupim/BR	MH705342
Fonsecaea erecta	125763 (T)	ı	Espinho Japecanga (Smilacaceae)/BR	KC886414
Fonsecaea minima	125760 (T)	ı	Folha de palmeira (Orbignya speciosa)/BR	KC886416
Fonsecaea monophora	269.37 (T)	dH 12659	Cromoblastomicose humana/América do Sul	AY366906
Fonsecaea monophora	123849	dH 20215	Cromoblastomicose humana/África	FJ785471
Fonsecaea multimorphosa	980.96 (T)	NCMH 1412	Feohifomicose, gato/AU	JF267657
Fonsecaea nubica	269.64 (T)	dH 15656	Cromoblastomicose/CM	EU938592
Fonsecaea pedrosoi	271.37 (T)	dH 15659	Cromoblastomicose/América do Sul	AY366914
Fonsecaea pedrosoi	102245	ı	Cromoblastomicose humana/BR	AY366918
Fonsecaea pedrosoi	125749	ı	Cromoblastomicose humana/BR	KC886423
Fonsecaea pedrosoi		CMRP 3076	Ninho de cupins/BR	MH703648
Neophaeococcomyces catenatus	650.76 (T)	ATCC 42183	Ar/CN	MH861022
Phialophora americana	273.37 (T)	ATCC 10223	Cromoblastomicose humana/BR	AF050281
Phialophora europaea	101466 (T)	dH 11284	Pé, humano/NL	EU514698
Phialophora europaea	218.78	dH 15563	Unha humana/NL	JQ766441
Phialophora europaea	120392	dH 16697	Pele Humana/DK	JQ766444
Phialophora verrucosa	286.47	ATCC 9541	Frutas, Musa sapientum/Desconhecido	AF050282
Rhinocladiella anceps	157.54	ATCC 15680, MUCL 1081	Fagus sylvatica/FR	EU041804
Rhinocladiella anceps	181.65	ATCC 18655; DAOM 84422	Solo sob Thuja plicata/CA	EU041805
Rhinocladiella atrovirens	264.49	MUCL 9904	Mel/FR	EU041812
Rhinocladiella basitona	101460 (T)	IFM 47593	Homem/JP	EU041806
Rhinocladiella phaeophora	496.78 (T)	IMI 287527	Solo/CO	EU041811
Rhinocladiella similis	111763 (T)	dH 11329	Úlcera cutânea crônica, homem/BR	F551461
Rhinocladiella similis		CMRP 3079	Exoesqueleto de formiga/BR	MH704431
EONTE O autor (2022) CBS 11/actardii	k Euncel Biodivere	ity Institute: (T). Linhadem tyne		

FONTE: O autor (2022). CBS: Westerdijk Fungal Biodiversity Institute; (T): Linhagem type

ANEXO 2 – ANÁLISE FILOGENÉTICA PARA Fonsecaea monophora ISOLADA A PARTIR DE LARVA DE Tenebrio molitor INOCULADA



FONTE: O autor (2022). Análise filogenética molecular pelo método de máxima verossimilhança comparando a linhagem de *Fonsecaea monophora* recuperada de tecido larval infectado com

linhagens de *Fonsecaea* spp. e espécies proximamente relacionadas. A linhagem *de Neophaeococcomyces catenatus* CBS 650.76 foi utilizada como grupo externo. A história evolutiva foi inferida usando o método da Máxima Verossimilhança baseado no modelo *General Time Reversible* com base em alinhamento na região gênica do espaçador interno transcrito (ITS). A porcentagem de árvores nas quais os táxons associados se agruparam é mostrada ao lado dos ramos. A análise envolveu 70 sequências de nucleotídeos e demonstraram que o fungo isolado da larva após 10 dias da inoculação corresponde à *Fonsecaea monophora, representada em negrito na arvore*. As análises evolutivas foram realizadas no MEGA7.



ANEXO 3 - CURVA DE DISSOCIAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS (continua)

(R-) ODAVIRED RETROGER



(Я-) ОДАМАЗД АЭТЯОЧЭЯ

Curva de Melting NADPH-cytochrome P450 reductase 95.0 0.08 85.0 70.0 Tm: 72.18 Tm: 72.18 TEMPERATURA (*C) 65.0 16000.0 10000.0 2000.0 0.0 14000.0 12000.0 4000.0 8000.0 6000.0 (Я~) ODAVIABO ABTROGAR 95.0 Curva de Melting Formate dehydrogenase 0.00 85.0 75.0 80.0 Tm: 75.38 TEMPERATURA ("C) 70.0 02:00 19000.0--14000.0 4000.0 9000.0

(Я-) ОДАМАЗД АЗТЯФЧЭЯ



(nR-) ODAVIRED RETROGER



(Я-) ОДАМИАД ИЗТЯОЧАЯ

68









FONTE: O autor (2022)

(n?-) ODAVIRED RETROGER