UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE BIOMEDICINA

GABRIEL HENRIQUE PINTO DO NASCIMENTO

PAPEL DOS FATORES DE TRANSCRIÇÃO NirA e AreA NA ASSIMILAÇÃO DE NITROGÊNIO EM *Paracoccidioides lutzii*

GOIÂNIA
2025

UFG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE GRADUAÇÃO NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio do Repositório Institucional (RI/UFG), regulamentado pela Resolução CEPEC no 1240/2014, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei no 9.610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo dos Trabalhos de Conclusão dos Cursos de Graduação disponibilizado no RI/UFG é de responsabilidade exclusiva dos autores. Ao encaminhar(em) o produto final, o(s) autor(a)(es)(as) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação (TCCG)

Nome completo do autor: Gabriel Henrique Pinto do Nascimento

Título do trabalho: "Papel dos fatores de transcrição NirA e AreA na assimilação de nitrogênio em *Paracoccidioides lutzii*"

2. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador) Concorda com a liberação total do documento [x] SIM [ ] NÃO[1]

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante: a) consulta ao(à)(s) autor(a)(es)(as) e ao(à) orientador(a); b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo do TCCG. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro.

Obs.: Este termo deve ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.

Documento assinado eletronicamente por **Clayton Luiz Borges**, **Professor do Magistério Superior**, em 24/02/2025, às 15:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Gabriel Henrique Pinto Do Nascimento**, **Discente**, em 25/02/2025, às 18:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5191633** e o código CRC **B8AFA0A5**.

Referência: Processo nº 23070.006357/2025-30 SEI nº 5191633

GABRIEL HENRIQUE PINTO DO NASCIMENTO

PAPEL DOS FATORES DE TRANSCRIÇÃO NirA e AreA NA ASSIMILAÇÃO DE NITROGÊNIO EM *Paracoccidioides lutzii*

Trabalho de conclusão de curso apresentado à coordenação do curso de Biomedicina da Universidade Federal de Goiás para obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Professor Dr. Clayton Luiz Borges
Coorientadora: Me. Elisa Dias Pereira

GOIÂNIA
2025

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Nascimento, Gabriel Henrique Pinto do
PAPEL DOS FATORES DE TRANSCRIÇÃO NirA e AreA NA ASSIMILAÇÃO DE NITROGÊNIO EM Paracoccidioides lutzii [manuscrito] / Gabriel Henrique Pinto do Nascimento. - 2025.
xxxiv, 34 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Clayton Luiz Borges; co-orientadora Elisa Dias Pereira.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Biomedicina, Goiânia, 2025.
Bibliografia.

1. Paracoccidioides. 2. NCR. 3. AreA. 4. Assimilação de nitrato. 5. NirA. I. Borges, Clayton Luiz, orient. II. Título.

CDU 577.2

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos vinte e um dias do mês de fevereiro de dois mil e vinte e cinco iniciou-se a sessão pública de defesa do Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) intitulado "Papel dos fatores de transcrição NirA e AreA na assimilação de nitrogênio em *Paracoccidioides lutzii*" de autoria de Gabriel Henrique Pinto do Nascimento, do curso de Biomedicina, do Instituto de Ciências Biológicas da UFG. Os trabalhos foram instalados pelo Dr. Clayton Luiz Borges- Instituto de Ciências Biológicas/UFG com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Dra. Vanessa Rafaela Milhomem Cruz Leite e Me. Ester Dias Ruas Otto - Instituto de Ciências Biológicas/UFG. Após a apresentação, a banca examinadora realizou a arguição do estudante. Posteriormente, de forma reservada, a Banca Examinadora atribuiu a nota final de 10 (dez), tendo sido o TCC considerado aprovado.

Proclamados os resultados, os trabalhos foram encerrados e, para constar, lavrou-se a presente ata que segue assinada pelos Membros da Banca Examinadora.

Documento assinado eletronicamente por **Clayton Luiz Borges**, **Professor do Magistério Superior**, em 21/02/2025, às 18:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 .

Documento assinado eletronicamente por **Ester Dias Ruas Otto**, **Usuário Externo**, em 21/02/2025, às 18:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **VANESSA RAFAELA MILHOMEM CRUZ LEITE**, **Usuário Externo**, em 24/02/2025, às 21:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 .

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5141585** e o código CRC **09159D43**.

Dedico este trabalho aos meus pais, Dhébora e Clébio, que, muitas vezes, abdicaram de seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, que me manteve firme e não me deixou desistir. Aos meus pais, grandes incentivadores e investidores, que possibilitaram que eu chegasse até aqui. Sem eles, nada disso seria possível. Aos meus amigos, feitos durante a graduação, em especial ao João Pedro, à Giovanna Manzan, ao Victor Hugo, à Gabriela Vasconcelos, à Emília, à Paula, ao Lucas e à Geovana Medeiros. Vocês foram grandes companheiros e me ajudaram a chegar até aqui. Obrigada por toda a ajuda prestada ao longo desses anos e por serem meu alívio nos momentos difíceis.

Agradeço também à Stefane Amaro e à Lorena Luiz, por, mesmo de longe, estarem sempre tão próximas e por terem sido um apoio constante desde o início.

À Vanessa Rafaela Milhomem Cruz-Leite, por me convidar a conhecer o Laboratório de Biologia Molecular, e ao professor Clayton Luiz Borges, por me aceitar no grupo e confiar em mim para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço ainda à Elisa Dias Pereira, que, além de grande incentivadora, foi meu apoio durante o desenvolvimento da pesquisa. Você acreditou em mim em momentos em que nem eu mesma acreditava, pegou na minha mão, me ensinou um pouco do que sabe e teve um papel fundamental no resultado final deste trabalho. Sem você, nada disso seria possível. Muito obrigada por me ajudar tanto.

Aos membros do grupo Clayton, agradeço pelo acolhimento, apoio e pelos ensinamentos diários no laboratório. Ao Laboratório 3 do LBM, que me acolheu, me ensinou e fez do dia a dia algo mais leve. Vocês desempenharam um papel fundamental na minha formação.

Também agradeço aos membros da Atlética Acadêmica Sanguinária por me acolherem durante minha formação. Vocês foram essenciais nesse processo.

Além disso, agradeço ao CNPq, à FAPEG, ao INCT e ao Laboratório de Biologia Molecular por fornecerem os recursos necessários para o desenvolvimento deste trabalho.

Por fim, agradeço a todos que, de alguma forma, me ensinaram e me ajudaram a chegar até aqui.

RESUMO

O complexo *Paracoccidioides* é composto por fungos termodimórficos, agentes etiológicos da Paracoccidioidomicose (PCM), uma micose sistêmica e endêmica na América Latina. A aquisição de nutrientes é um dos fatores que contribuem para a sua virulência no hospedeiro sendo o nitrogênio um dos nutrientes destacados como essencial para a sobrevivência do fungo e produção de moléculas como proteínas e ácidos nucléicos. Neste sentido, o patógeno utiliza vários mecanismos para captação de nitrogênio, uma vez que o hospedeiro restringe os nutrientes através da imunidade nutricional. Um dos mecanismos existentes é a Repressão Catabólica de Nitrogênio (*Nitrogen Catabolic Repression* - NCR), que garante fontes secundárias de nitrogênio, quando fontes preferenciais não estão disponíveis. A NCR é mediada pelo fator de transcrição GATA AreA, sendo este de fundamental importância para o sucesso na aquisição de fontes não preferenciais de nitrogênio. Para a assimilação de nitrato e nitrito é necessário o fator de transcrição NirA que interage fisicamente com AreA em *Aspergillus nidulans*, sendo um importante regulador da assimilação de nitrogênio. No complexo *Paracoccidioides* esse mecanismo ainda não é bem elucidado. Neste sentido, objetivamos a avaliação da influência de NirA e AreA no mecanismo de NCR em *P. lutzii*. Para isso, foi desenvolvida uma cepa silenciada para o gene AreA (AS-*AreA*) de *P. lutzii* utilizando a tecnologia de RNA antisense mediado por *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT). Através de análises da curva de crescimento por densidade óptica (D.O) das cepas de *P. lutzii* selvagem (*wild-type* - WT) e o mutante silenciado (AS-*AreA*) em meio seletivo suplementado com Nitrato de Sódio (10mM) como fonte de nitrogênio não preferencial, e Sulfato de Amônia (10mM) como fonte preferencial, demonstrou-se que o fator de transcrição AreA pode estar relacionado com a assimilação de nitrato no gênero *Paracoccidioides*. Além disso, através da marcação das células WT e AS-*AreA* com iodeto de propídeo, foi possível notar uma boa viabilidade das células mesmo após 48h em meio sem fonte preferencial de nitrogênio, indicando a existência de mecanismos alternativos para captação desse composto e manutenção das atividades celulares. A análise da expressão de NirA por qPCR, nas condições estudadas, revelou uma superexpressão na cepa As-*AreA* em nitrato. Entretanto, mesmo com uma superexpressão, a análise do crescimento reforça a importância de AreA para o crescimento celular. Portanto, os resultados prévios sugerem a importância de AreA-NirA para a assimilação de nitrato no mecanismo NCR, porém outras análises, são necessárias para corroborar com os resultados prévios obtidos.

Palavras-chave: NCR; AreA; *Paracoccidioides spp.*; Assimilação de Nitrato; NirA.

ABSTRACT

The *Paracoccidioides* complex consists of thermodimorphic fungi, the etiological agents of Paracoccidioidomycosis (PCM), a systemic and endemic mycosis in Latin America. The acquisition of nutrients is one of the factors contributing to its virulence in the host, with nitrogen being one of the key nutrients essential for the survival of the fungus and the production of molecules such as proteins and nucleic acids. In this regard, the pathogen employs various mechanisms for nitrogen acquisition, as the host restricts nutrients through nutritional immunity. One of these mechanisms is Nitrogen Catabolic Repression (NCR), which ensures secondary nitrogen sources are available when preferred sources are not. NCR is mediated by the GATA transcription factor AreA, which is crucial for the successful acquisition of non-preferred nitrogen sources. For the assimilation of nitrate and nitrite, the NirA transcription factor is required, which physically interacts with AreA in *Aspergillus nidulans*, and is an important regulator of nitrogen assimilation. In the *Paracoccidioides* complex, this mechanism has not yet been fully elucidated. Thus, we aimed to evaluate the influence of NirA and AreA on the NCR mechanism in *P. lutzii*. To achieve this, a silenced strain for the AreA gene (AS-AreA) of *P. lutzii* was developed using antisense RNA technology mediated by *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT). Growth curve analysis by optical density (OD) of the wild-type (*WT*) and silenced mutant (AS-AreA) strains of *P. lutzii* in selective medium supplemented with Sodium Nitrate (10mM) as a non-preferred nitrogen source, and Ammonium Sulfate (10mM) as a preferred source, showed that the AreA transcription factor may be related to nitrate assimilation in the *Paracoccidioides* genus. Additionally, through propidium iodide staining of WT and AS-AreA cells, it was observed that the cells maintained good viability even after 48 hours in medium without a preferred nitrogen source, indicating the presence of alternative mechanisms for nitrogen uptake and maintenance of cellular activities. The analysis of NirA expression by qPCR under the studied conditions revealed overexpression in the AS-AreA strain in nitrate. However, even with overexpression, growth analysis reinforces the importance of AreA for cell growth. Therefore, the preliminary results suggest the importance of the AreA-NirA interaction for nitrate assimilation in the NCR mechanism, but further analyses are needed to corroborate these findings.

Keywords: NCR; AreA; *Paracoccidioides* spp.; Nitrate Assimilation; NirA.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....7
1.1 Fungos patogênicos humanos..... 7
1.2 Complexo *Paracoccidioides spp*..... 8
1.3 Paracoccidioidomicose - PCM.....9
1.4 Resposta imunológica..... 10
1.5 Repressão Catabólica de Nitrogênio - NCR.....11
1.6 Assimilação de nitrato em fungos.....12
2 JUSTIFICATIVA..... 14
3 OBJETIVOS.....15
3.1 Objetivo geral.....15
3.2 Objetivos específicos..... 15
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....16
4.1 Construção da cepa *P. lutzii* silenciada do fator de transcrição AreA.....16
4.2 Manutenção dos microrganismos e meios de cultura..... 16
4.3 Extração do RNA total, síntese do cDNA e PCR convencional.....16
4.4 PCR quantitativa em tempo real (qPCR)..... 17
4.5 Avaliação de crescimento e viabilidade celular das cepas *P. lutzii* em meio seletivo YNB..... 18
4.6 Caracterização fenotípica de crescimento em diferentes fontes de nitrogênio..... 18
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....20
5.1 Validação do silenciamento gênico da cepa AS-AreA de P.lutzii em meio seletivo.....20
5.2 Curva de crescimento e viabilidade celular de *P. lutzii* WT e AS-*AreA* em diferentes fontes de nitrogênio.....21
5.3 Perfil fenotípico de crescimento de *P. lutzii* WT e AS-*AreA* em meio sólido com diferentes fontes de nitrogênio.....22
5.4 Amplificação e análise da expressão do gene NirA em *P. lutzii*: Síntese de cDNA e PCR convencional como estratégia de investigação.....24
5.5 Análise da expressão gênica de NirA em *P. lutzii*.....25
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....29

1 INTRODUÇÃO

1.1 Fungos patogênicos humanos

Os fungos são microrganismos unicelulares ou multicelulares que estão presentes em todo o ambiente, desempenhando papel importante no ecossistema. Em geral, os fungos possuem relação de simbiose com outros organismos, mas em alguns casos podem causar doenças e levar a quadros sérios de infecção (Iliev e Leonardi, 2017). O ser humano é exposto diariamente a inúmeras espécies fúngicas no meio ambiente, e algumas delas têm potencial patogênico significativo (Hay, 2006; Limon *et al.*, 2017).

As infecções fúngicas, conhecidas como micoses, são doenças causadas por fungos patogênicos ou pelo crescimento exacerbado de fungos na microbiota humana, resultando em disbiose (Iliev e Leonardi, 2017). De modo geral, as micoses podem ser classificadas em três categorias: superficiais, subcutâneas e sistêmicas (Hay, 2006).

Nas micoses superficiais são acometidos a epiderme e camadas mais externas do hospedeiro, onde se destacam as espécies patogênicas: *Malassezia globosa*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum audouinii* e *Candida albicans*. Já as micoses subcutâneas, os fungos penetram uma camada mais profunda da epiderme, sendo necessário uma lesão prévia para que seja instaurado a infecção. São representados pelas espécies: *Sporothrix schenckii*, *Fonsecaea pedrosoi* e *Wangiella dermatitidis* (Hay, 2006).

As micoses sistêmicas — também conhecidas como micoses oportunistas — são caracterizadas pela disseminação interna dos fungos no hospedeiro. Sua instalação se dá através da inalação de propágulos desses fungos (Hay, 2006; Galimberti *et al.*, 2012). Alguns exemplos de fungos que pertencem a esse grupo são os fungos termodimórficos dos gêneros: *Blastomyces spp.*, *Histoplasma spp.*, *Coccidioides spp.*, *Penicillium spp.* e *Paracoccidioides spp.* (Hay, 2006; Thompson *et al.*, 2021).

Alguns fungos apresentam dimorfismo, que é a capacidade de mudar sua morfologia em resposta a fatores ambientais, como nutrientes e temperatura. Eles podem ser classificados como fungos termodimórficos e dimórficos não térmicos. Os fungos termodimórficos, em particular, são um grupo patogênico que alterna entre as formas de micélio e levedura dependente da temperatura. Em temperaturas ambientes (22-25ºC), ocorre o crescimento na forma de micélio, enquanto a forma de levedura se desenvolve em temperaturas próximas a 37ºC, que corresponde à temperatura corporal do hospedeiro (Gauthier, 2015).

As alterações morfológicas que ocorrem nos fungos dimórficos estão diretamente relacionadas à sua patogenicidade, pois essas mudanças permitem que os fungos ultrapassem

barreiras estruturais, térmicas e imunológicas. Durante a transição para a forma de levedura, há modificações na parede celular e a produção de proteínas que ajudam a evitar a detecção pelo sistema imunológico do hospedeiro (Gauthier, 2015). Os fungos patogênicos termodimórficos incluem mais de 30 gêneros e um número indefinido de espécies, sendo os principais agentes que infectam humanos: *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum* e o complexo *Paracoccidioides spp.* (Turissinni *et al*., 2017; Taborda *et al.*, 2018).

1.2 Complexo *Paracoccidioides* spp.

O complexo *Paracoccidioides* é formado por fungos patogênicos responsáveis por causar a paracoccidioidomicose (PCM) em humanos. É uma das espécies termodimórficos, onde encontramos uma fase miceliana em solos ou cultivos em 25ºC e uma forma leveduriforme parasitária, encontrada no hospedeiro ou cultivada em temperaturas de 37ºC (Figura 1) (Restrepo e Jiménez, 1980; Brummer *et al.*, 1993).

Figura 1: Morfologia do *Paracoccidioides spp*. (A) microscopia óptica apresentando as hifas **(B)** conídios **(C)** célula leveduriforme com característica esférica

Fonte: broadinstitute.org

A PCM é causada por cinco espécies cultiváveis: *P. brasiliensis*, *P. americana*, *P. venezuelensis*, *P. lutzii* e *P. restrepiensis* (Turissinni *et al*., 2017). Além disso, em estudos recentes foram descritas outras duas espécies não cultiváveis isoladas de golfinhos: *Paracoccidioides cetii* e *Paracoccidioides loboi* (Vilela *et al.*, 2023; Hahn *et al.*, 2022; Peçanha *et al*., 2022). Taxonomicamente o gênero é classificado como *Eukaryota* do reino *Fungi*, filo *Ascomycota*, subfilo *Pezizomycotina*, e família *Ajellomycetaceae* (Chaves *et al.*, 2021).

Paracoccidioides spp. é encontrado principalmente em solos e pode ser a principal fonte de infecção para humanos e animais selvagens, visto que não há evidências de

transmissão entre hospedeiros ou reservatórios e hospedeiros. Foram identificados e isolados fungos em duas espécies de tatu, *Dasypus novemcinctus L.* e *Cabassous centralis*, destacando-os como potencial reservatório natural de *Paracoccidioides* (Chaves *et al.*, 2021). Alguns casos de *Paracoccidioides* já foram relatados em animais domésticos como cães (Ricci *et al.*, 2004) e gatos (De Oliveira *et al.*, 2013). As atividades que envolvem manejo de solos podem levar ao contato com propágulos do fungo e o desenvolvimento da Paracoccidioidomicose (Peçanha *et al*., 2022).

1.3 Paracoccidioidomicose - PCM

A paracoccidioidomicose é uma doença granulomatosa que se manifesta de forma crônica, aguda ou subaguda. As formas aguda e subaguda são responsáveis por 25% dos casos, enquanto a forma crônica ocorre entre 74% a 96% dos casos (Chaves *et al.*, 2021; Shikanai-Yasuda *et al*., 2017).

A PCM está presente principalmente em países de clima tropical, subtropical, com alta umidade, temperaturas moderadas e solo ácido (Ramos-e-Silva *et al.*, 2008). A doença está distribuída geograficamente em países da América Latina, como o Brasil (80% dos casos), Argentina, Uruguai, Paraguai, Peru, Equador, Colômbia, Venezuela e México (Chaves *et al.*, 2021; Peçanha *et al.*, 2022). No Brasil, o maior número de casos é registrado nas regiões do Norte, Centro-oeste e Sudeste (Shikanai-Yasuda *et al*., 2017), onde no estado do Tocantins é a infecção fúngica mais comum (Krakhecke-Teixeira *et al*., 2022). A incidência no país varia de 1 a 10 por 100 mil habitantes por ano nas áreas endêmicas (Peçanha *et al*., 2022).

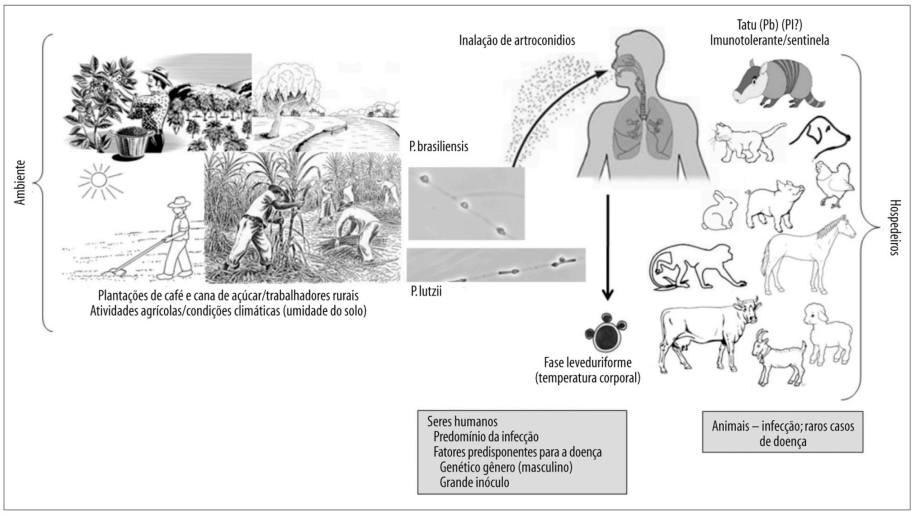
Um fator de risco para PCM é o manejo com solos em áreas rurais em regiões endêmicas. A transmissão de humano para humano ainda não foi relatada, mas em termos de hábitos, o tabagismo e etilismo são fatores relatados como de risco para o desenvolvimento da doença (Santos *et al*., 2003; Peçanha *et al.*, 2022).

A forma crônica da doença acomete primordialmente o sexo masculino com idades entre 30 a 60 anos. Já a forma aguda apresenta uma distribuição igualitária entre os sexos. O hormônio estrogênio nas mulheres inibe a transformação dos conídios em células leveduriformes e isso pode explicar a prevalência da PCM em homens (Restrepo *et al*., 1984; Chaves *et al*., 2021; Peçanha *et al*., 2022).

A infecção se inicia pela inalação de propágulos de hifas e conídios dispersos em aerossóis. Uma vez inalados, esses propágulos se alojam nos alvéolos pulmonares e se transformam em leveduras, sua forma patogênica, que pode se disseminar do pulmão para diversos órgãos (De Oliveira *et al*., 2015). Os locais mais afetados incluem os linfonodos

superficiais, a pele, os ossos, as articulações, além do baço e do fígado (Shikanai-Yasuda *et al*., 2017).

Figura 2: Modelo de propagação de *Paracoccidioides spp*.



Fonte: Shikanai-Yasuda *et al*., 2017.

1.4 Resposta imunológica

No hospedeiro, o patógeno enfrenta a primeira linha de defesa do sistema imunológico, o macrófago. Ao ser inalado, o patógeno é apresentado a célula de defesa através dos Receptores de Reconhecimento Padrão (*Pattern Recognition Receptors* - PRRs) que reconhecem os Padrões Moleculares associados a patógenos (*Pathogen-associated molecular patterns* - PAMPs) (Gordon, 2002; Pollard, 2009; Fernandez-Garcia *et al*., 2021).

O principal componente da parede celular fúngica é a beta-1,3-glucana (Romani, 2011). Seu reconhecimento desencadeia a fagocitose, além da liberação de citocinas Th1, do recrutamento de neutrófilos e da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) (Thind *et al*., 2015; Fernandez-Garcia *et al*., 2021). Ao longo da evolução, *Paracoccidioides spp.* desenvolveu mecanismos de modulação da parede celular. Na fase micelial, a parede celular é rica em beta-1,3-glucana, enquanto na fase leveduriforme esse polissacarídeo é substituído por alfa-1,3-glucana. Essa mudança permite que o patógeno escape do sistema imunológico (Camacho *et al*., 2017).

Alguns fungos patogênicos termodimórficos se adaptaram para sobreviver aos ambientes hostis dos tecidos do hospedeiro, desenvolvendo mecanismos como a modulação da parede celular e a regulação da expressão gênica (Hoft *et al*., 2022). No complexo *Paracoccidioides*, além da evasão fagocitária, o fungo utiliza o mecanismo do "cavalo de

Tróia", permanecendo dentro do macrófago e modulando a atividade desses fagócitos, além de inibir as vias apoptóticas (Acorci *et al*., 2009; Giusiano, 2021).

Nos macrófagos, o fungo *Paracoccidioides* enfrenta restrições nutricionais como a privação de nitrogênio e carbono, além de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Lorenz *et al*., 2004; Schinko *et al*., 2010). A sobrevivência e permanência do fungo em tecidos hospedeiro se deve a mecanismos alternativos para captação de nutrientes, desencadeados pela regulação do metabolismo tais como a Repressão Catabólica de Carbono (*Carbon Catabolite Repression* - CCR) e Repressão Catabólica de Nitrogênio (*Nitrogen Catabolic Repression* - NCR) (Zaman *et al*., 2008; Lima *et al*., 2014; Cruz-Leite *et al*., 2020).

1.5 Repressão Catabólica de Nitrogênio - NCR

A capacidade de um patógeno causar doença é determinada por diversos fatores e envolvem vias de sobrevivência e adaptação em um determinado hospedeiro. Dentre esses fatores, a aquisição de nutrientes e os processos metabólicos são determinantes críticos de virulência (Ries *et al*., 2018).

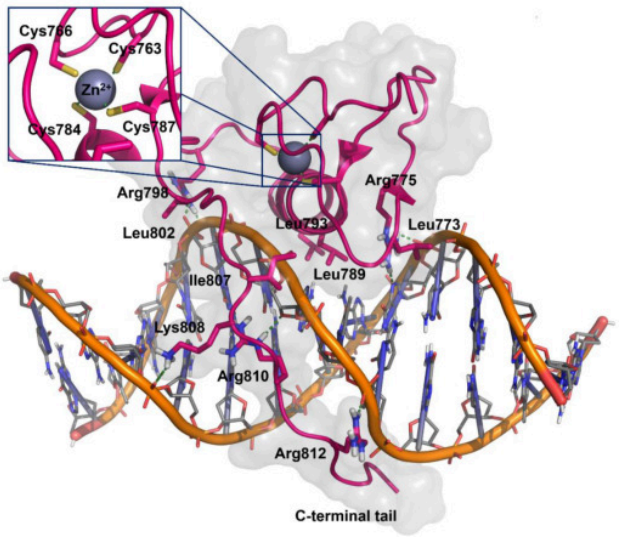
O nitrogênio é fundamental para os fungos, pois é necessário para a síntese de ácidos nucleicos e proteínas (Wong *et al*., 2008). Ao enfrentar o sistema imunológico, o fungo encontrará um ambiente com restrições nutricionais (Lorenz *et al*., 2004; Schinko *et al*., 2010). Assim, a utilização de fontes alternativas para a captação de nitrogênio é essencial para a sobrevivência desse organismo (Caddick *et al*., 1994).

Pesquisas sobre regulação gênica em fungos ascomicetos, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus nidulans* e *Neurospora crassa*, contribuíram para a compreensão dos mecanismos de Repressão Catabólica do Nitrogênio (NCR) e Repressão Metabólica do Nitrogênio (NMR) (Lee *et al*., 2013). O mecanismo NMR permite que seja utilizado fontes preferenciais de nitrogênio como glutamina e amônio. No entanto, quando essas fontes preferenciais não estão disponíveis, a NCR permite o uso de fontes não preferenciais como, nitrato, ureia, ácido úrico, aminas, amidas, pirimidinas, purinas e outras fontes nitrogenadas (Fu e Marzluf, 1987; Fraser *et al*., 2001).

A NCR é mediada pelo fator de transcrição da família GATA AreA, conservada evolutivamente em plantas, aves e fungos (Block e Shapira, 2015; Fujiwara, 2017). Na região promotora do DNA de genes sensíveis à NCR (A/T)GATA(A/G), o fator de transcrição se liga na região promotora através de ligação dedo de zinco tipo IV Cys2-Cys2 (Evans e Felsenfeld, 1989; Muro-Pastor *et al*., 1999) (figura 3).

Em *S. cerevisiae* a proteína Ure2, transportador de ureia succinato, e quatro reguladores são descritos como as principais proteínas de regulação da NCR. Dois reguladores são positivos: proteína do metabolismo de glutamina (Gln3) e a proteína do motivo de ligação ao DNA do dedo de zinco do tipo GATA-1 (Gat1). Já a proteína de degradação de alantoína (Dal80) e dedo de zinco GATA fator 3 (Gzf3) são reguladores negativos (Zhao *et al*., 2016).

Figura 3: Estrutura 3D do modelo de AreA de *P. lutzii* ligado ao DNA. O modelo de homologia mostra resíduos conservados e o domínio do dedo de zinco.



Fonte: Cruz-Leite *et al.*, 2020.

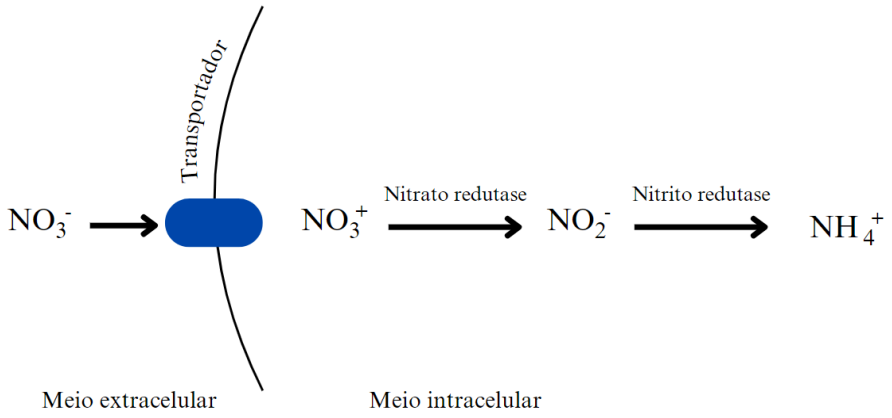
Os fatores de transcrição GATA Gln3 e Gat1 em *S. cerevisiae* são homólogos aos genes que codificam permeases de amônio MEP1 e MEP2 em *C. albicans* (Biswas e Morschhauser, 2005). Em *A. nidulans*, a regulação é controlada por um único fator da família GATA, conhecido como AreA. Por outro lado, a regulação negativa é realizada pelo fator GATA AreB, que é homólogo aos genes Dal80 e Gzf3 encontrados em *S. cerevisiae* (Conlon *et al*., 2001).

Estudos demonstram que no complexo *Paracoccidioides* a NCR é mediada pelo fator de transcrição GATA AreA, enquanto sua regulação negativa é desencadeada pela proteína Nmr e pelo fator de transcrição AreB, onde a Nmr de *Paracoccidioides spp*. é ortólogo do repressor NmrA de *A. nidulans* (Cruz-Leite *et al*., 2020). O fator de transcrição relacionado à indução de nitrato e nitrito em *A. nidulans* é o NirA, pois é um importante regulador da assimilação de nitrogênio (Foster *et al*., 2009).

1.6 Assimilação de nitrato em fungos

A assimilação do nitrato é uma eficiente forma de aquisição de nitrogênio. Para utilização é preciso de um transportador ativo para nitrato, além de enzimas nitrato redutase e nitrito redutase (figura 4). Ela é feita a partir da conversão de nitrato (NO_3) a nitrito (NO_2) e, por fim, a amônia (NH_4), que é tida como fonte preferencial de nitrogênio (Cove, 1979; Siverio, 2002; Gorfer *et al*., 2011). A regulação da redução do nitrato é mediada por genes que respondem aos níveis de amônio e glutamina intracelular. Essa resposta é crucial, uma vez que a conversão de nitrato em amônia implica um alto custo metabólico (Caddick *et al*., 1994; Berger *et al*., 2008).

Figura 4: Assimilação de Nitrato em fungos. O Nitrato (NO_3) é internalizado por um transportador de nitrato, e através da enzima Nitrato Redutase é convertido a Nitrito (NO_2) e por fim a Amônio (NH_4) pela ação da Nitrito Redutase.



Fonte: adaptado de Pereira *et al.*, 2003.

A interação da sequência de exportação nuclear (NES) do fator de transcrição NirA, de *A. nidulans*, com a exportina KapK é rompida pelos níveis de nitrato e nitrito intracelular, levando ao acúmulo nuclear do NirA (Berger *et al*., 2006; Dong *et al*., 2009). Além disso, estudos demonstram a existência de uma ação sinergética entre os fatores de transcrição NirA e AreA em *A. nidulans* para indução dos genes de nitrato e nitrito sensíveis (Narendja *et al*., 2002).

Análises *in silico* realizadas pelo nosso grupo possibilitaram a predição de uma alta homologia de sequências proteicas com fator de transcrição NirA em espécies de *P. lutzii*, *P. americana* e em *P. brasiliensis*. Na análise foi observado um Query Cover acima de 90% e E-value de 0.0, indicando que a proteína encontrada seja ortólogo ao NirA de *A. nidulans* (Santos, dados não publicados). Embora análises *in silico* demonstrem a presença desse fator,

esse mecanismo precisa ser melhor elucidado para maior compreensão do processo de aquisição de nitrogênio a partir da assimilação do nitrato.

2 JUSTIFICATIVA

O complexo *Paracoccidioides* são os fungos responsáveis pela paracoccidioidomicose, uma micose sistêmica de alta incidência na América Latina, especialmente no Brasil. Essa micose é de grande relevância para a saúde pública, não apenas por sua prevalência, mas também por suas implicações clínicas significativas. A capacidade do fungo de se adaptar ao hospedeiro, escapar do sistema imunológico e sobreviver em condições nutricionalmente restritivas é fundamental para a instalação de infecções e a disseminação para os tecidos do hospedeiro.

A Repressão Catabólica do Nitrogênio (NCR), mediada pelo fator de transcrição GATA AreA, constitui um mecanismo complexo que regula diversas vias metabólicas do nitrogênio. Em *A. nidulans*, esse regulador também está associado à via de assimilação de nitrato, que é coordenada pelo fator de transcrição NirA. Esse processo é essencial para a aquisição de fontes não preferenciais de nitrogênio, permitindo, assim, a sobrevivência e disseminação do microorganismo.

No caso do complexo *Paracoccidioides*, os mecanismos de assimilação de nitrato permanecem pouco elucidados. Portanto, é fundamental realizar estudos sobre a aquisição de nitrogênio por essa via. O entendimento destes mecanismos é importante para auxiliar na compreensão da biologia do fungo, além de auxiliar em novas perspectivas para o desenvolvimento de tratamentos, diagnósticos e profilaxias eficazes, contribuindo assim para o enfrentamento desse desafio significativo de saúde pública.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o impacto do silenciamento do fator de transcrição AreA na expressão de NirA e no mecanismo de assimilação de nitrato em *P. lutzii*, investigando a influência desses reguladores na adaptação do fungo em diferentes fontes de nitrogênio.

3.2 Objetivos específicos

- Investigar a eficiência do silenciamento gênico do mutante AS-*AreA* mediante a avaliação do crescimento em meio seletivo BHI + Higromicina;
- Avaliar a capacidade de crescimento e viabilidade das cepas de *P. lutzii* WT e mutante silenciado para o fator de transcrição AS-*AreA* através de densidade óptica (D.O) e marcação com iodeto de propídeo em Sulfato de amônio e Nitrato de sódio;
- Realizar uma caracterização fenotípica de crescimento das cepas *P. lutzii* WT e mutante AS-*AreA* em meio BHI e YNB sólido, suplementado com fonte preferencial (Sulfato de amônio) e não preferencial (Nitrato de sódio) de nitrogênio;
- Realizar extração de RNA total e construção de cDNA das cepas de *P. lutzii* WT e o mutante AS-*AreA* cultivado em BHI e YNB suplementado com Sulfato de amônio e Nitrato de sódio;
- Avaliar o impacto do silenciamento de AreA na expressão gênica de NirA em diferentes condições de cultivo e fontes de nitrogênio por meio de qPCR.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Construção da cepa *P. lutzii* silenciada do fator de transcrição AreA

O silenciamento do fator de transcrição AreA (AS-*AreA*) de *P. lutzii* foi realizado pelo grupo de pesquisa utilizando a técnica de RNA antisense (aRNA) mediado pela *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT). Sendo a cepa silenciada para o fator de transcrição AreA gentilmente cedida para os experimentos realizados no projeto. Oligonucleotídeos foram projetados para gerar um fragmento antisense (AS) do gene do fator de transcrição AreA de *P. lutzii* e inserido em um plasmídeo binário contendo um gene de resistência à higromicina B. A integração do cassete no genoma fúngico foi confirmada por q-PCR (dados não publicados).

4.2 Manutenção dos microrganismos e meios de cultura

Os microrganismos utilizados nos experimentos deste trabalho foram as cepas de *P. lutzii* tipo selvagem (Wild Type -WT) e a cepa silenciada para o fator de transcrição AreA (AS-*AreA*). As cepas *P. lutzii* WT foram mantidas *in vitro* em meio sólido de BHI (*Brain Heart Infusion Broth*) e e AS-*AreA* em meio BHI suplementadas com Higromicina (Kasvi, Espanha) em estufa a 37°C. Quando requeridos para os experimentos de avaliação da resposta NCR, leveduras de *P. lutzii* WT e AS-*AreA* foram incubadas em meio BHI líquido suplementada com glicose 4% à 150 rpm em 37°C , e então após 48 horas de cultivo transferidos para o meio de seleção líquido YNB (*Yeast Nitrogen Base without amino acids, and ammonium sulfate* – YNB) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) suplementado com fonte de nitrogênio preferencial de Sulfato de amônia (SIGMA) à 10 mM (m/v) e fonte de nitrogênio não preferencial de Nitrato de sódio (SIGMA) à 10 mM (m/v) e glicose 2% (Cruz-Leite *et al*., 2020).

4.3 Extração do RNA total, síntese do cDNA e PCR convencional

Para a extração de RNA total das cepas *P. lutzii* WT e mutante AS-*AreA* foram cultivadas em BHI sólido por 3 dias. Após o crescimento as células foram transferidas para o meio líquido BHI (*brain heart infusion*) sob agitação constante de 150 rpm e temperatura de 37ºC, por 48 horas. Posteriormente, as células leveduriformes foram transferidas para o meio sintético YNB suplementado com 10mM de Sulfato de amônia e 10mM de Nitrato de sódio por um período de 48 horas, tempo de alívio do mecanismo NCR (Cruz-Leite, 2020). Após o período de cultura nas condições NCR, as células foram recuperadas e o RNA total extraído pelo método de TRIzol Reagent (*Sigma-Aldrich*), após a extração, a qualidade e quantidade

do RNA total foi determinada usando o aparelho Nanodrop (*Thermo Fisher Scientific*) e corrida de eletroforese. A partir do RNA extraído, o cDNA foi sintetizado utilizando-se o protocolo da enzima *RevertAid Reverse Transcriptase* (Thermo Scientific, Carlsbad, CA, EUA) seguindo as recomendações do fabricante. O resultado foi analisado através de uma corrida eletroforética em gel de agarose utilizando Gel Red (Biotium) como agente intercalante de DNA, para que facilite a visualização quando exposto à luz UV.

A PCR convencional foi realizada para testar a integridade do cDNA construído, utilizando os primers da tubulina beta (Tabela 1). As condições de ciclagem foram as seguintes: 1 ciclo por 5 min a 94°C; 39 ciclos da sequência 30s/94°C – 30s/62°C – 45s/72°C; e 1 ciclo final de 4 minutos à 72°C. Para testar o primer do NirA (Tabela 1) construído, também foi realizado uma PCR convencional seguindo a mesma ciclagem.

Tabela 1: Sequência dos primers usados na PCR.

Gene/Número de acesso	Primer senso (5'-3')	Primer antisense (5'- 3')	Temperatura de melting (Tm)
Tubulina beta (PAAG_03031)	GATAACGAGGCTCTGTATGATA	ATGTTGACGGCGAGTTTGCG	62ºC
Fator de transcrição de assimilação de nitrogênio NirA (PAAG_02447)	AATGTCGATGGTACGGGGAT	GTTAGACCAGCATTTGTCGAA	62ºC
Enolase (PAAG_11169)	GATTTGCAGGTTGTCGCCGA	TGGCTGCCTGGATGGATTCA	62ºC
Actina (PAAG_03031)	CGTCCTCGCCATCATGGTAT	GAAAGCAGCCGTAACAAAGAC	62ºC

Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

4.4 PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

Para avaliar o impacto do silenciamento de AreA na expressão de NirA em diferentes condições de cultivo e fontes de nitrogênio as cepas *P. lutzii* WT e mutante AS-*AreA* foram cultivadas em fontes preferenciais e não preferenciais como mencionadas no tópico anteriormente. A partir do cDNA construído foi realizado uma qPCR onde os valores de expressão transcricional foram obtidos utilizando o QuantStudio 5 (Applied Biosystems, Foster City, CA). A análise NormFinder foi aplicado aos genes: tubulina beta (PAAG_03031), enolase (PAAG_11169) e actina (PAAG_03031) em meio BHI e YNB suplementados com

nitrato de sódio e sulfato de amônio (Andersen *et al.*, 2004). O primer específico do fator de transcrição NirA (PAAG_02447) foi utilizado como gene de interesse. A reação qPCR ocorreu em triplicata para cada amostra de cDNA, e uma análise da curva padrão confirmou a detecção de um único produto de PCR. A curva padrão relativa foi gerada usando um conjunto de cDNAs coletados de todas as condições e diluídas em série de 1:5 até 1:625. Os níveis de expressão relativa dos transcritos de interesse foram calculados usando o método de curva padrão para quantificação relativa. Para as comparações estatísticas utilizaremos o teste t de STUDENT para considerar os dados estatisticamente significantes (Bookout *et al*., 2006; Parente-Rocha *et al*., 2015). Os valores de *** indicam $p < 0,001$, e * indicam $p < 0,05$. Os primers específicos utilizados em todos os experimentos de qPCR estão descritos na tabela 1.

4.5 Avaliação de crescimento e viabilidade celular das cepas *P. lutzii* em meio seletivo YNB

A fim de monitorar a viabilidade e crescimento de *P. lutzii* WT e o mutante AS-*AreA* foram avaliados fenotipicamente em relação a sua capacidade de sobrevivência em condições de suficiência de nutrientes. Após o cultivo inicial de 48 horas em BHI, as cepas foram transferidas para o meio sintético YNB (Sigma Aldrich®), suplementado com Sulfato de amônio, Nitrato de sódio e glicose 2% por um período 0, 24, 48 e 72 horas (Cruz-Leite *et al*., 2020). A absorbância foi medida no espectrofotômetro *Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech)* em um comprimento de onda de 600 nm. Os valores foram anotados e aplicados em *software* de análise de dados *(GraphPad Prism 8, Dotmatics)*.

A viabilidade celular foi determinada através da análise da integridade da membrana celular usando o marcador de morte celular iodeto de propídio (IP) como descrito por Grossklaus *et al*. (2013). As células foram marcadas no ponto de 48 horas através da adição da solução de iodeto de propídio em uma concentração de 2μg/mL por um período de 20 minutos ao abrigo da luz e em temperatura ambiente. Após a incubação as lâminas foram preparadas e levadas para microscopia de fluorescência (Carl Zeiss AG, Alemanha) a 493/623 nm.

4.6 Caracterização fenotípica de crescimento em diferentes fontes de nitrogênio

Cepas *P. lutzii* WT e AS-*AreA* foram cultivadas por 48 horas em meio BHI líquido sob agitação de 150 rpm a 37°C. Após esse período as células foram coletadas, centrifugadas e diluídas serialmente em concentrações de 10^6, 10^5, 10^4 e 10^3 e semeadas em triplicatas com volume de 10 μL em placas de Petri contendo meio sólido BHI; BHI + Higromicina e YNB

suplementado com 10 mM de Sulfato de amônia e Nitrato de sódio. As placas foram incubadas por 15 dias a 37°C em estufa e analisadas quanto a formação de colônias. A análise estatística foi realizada através de ANOVA unidirecional e * representa valores de $p \leq 0,05$ considerados significativos. Os ensaios de mensuração de pixels foram realizados em quadruplicatas experimentais. O software GraphPad Prism 8.0.1 (San Diego, CA, EUA) e o software Excel foram usados para executar análises estatísticas.

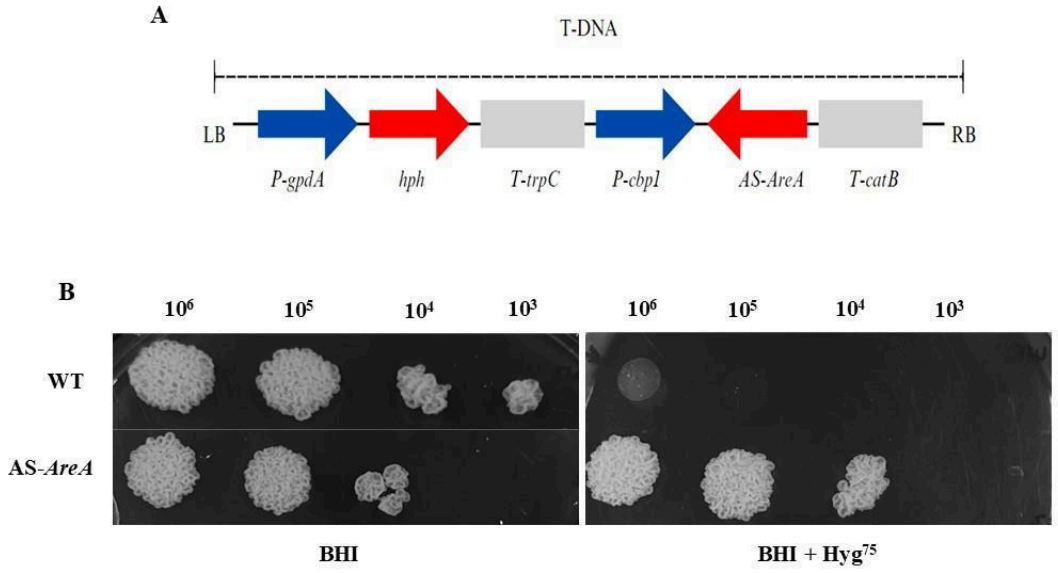
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Validação do silenciamento gênico da cepa AS-*AreA* de *P.lutzii* em meio seletivo

O silenciamento do fator de transcrição AreA nas cepas *P. lutzii* foi realizado utilizando a técnica RNA antisense mediado pela *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT) conforme já realizado anteriormente pelo grupo de pesquisa para o gene da formamidase (*fmd*) (Silva *et al*., 2022). O gene de resistência a higromicina B (Hyg) foi inserido no cassete e permite a verificação da integridade do silenciamento por meio do crescimento em meio contendo o antimicrobiano (ver figura 5).

Antes de prosseguir para os experimentos foi conduzido uma análise preliminar do silenciamento gênico, utilizando o crescimento em placa contendo BHI suplementado com higromicina B. Portanto, em meio BHI é possível verificar a formação de colônia das cepas *P. lutzii* WT e As-*AreA*, enquanto em meio BHI suplementado com Hyg (75µg/mL) o crescimento acontece apenas nas cepas As-*AreA*, indicando a integridade no silenciamento das cepas para o fator de transcrição AreA (Figura 5B).

Figura 5: (A) Representação esquemática do T-DNA gerado para transformação ATMT. O fragmento AS-*AreA* antisense foi construído sob o controle do promotor da proteína de ligação ao cálcio (*cbp1*) de *H. capsulatum* e do terminador *catB* de *A. fumigatus*. O gene resistente à higromicina (*hph*) foi construído sob o controle do promotor da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*gpdA)* e do terminador trpC de *A. nidulans* (Adaptado de Silva *et al*., 2022). **(B)** Células de levedura foram cultivadas por 3 dias em meio líquido BHI por 48 horas a 37ºC sob agitação constante de 150 rpm. Logo após, as células foram recuperadas e contadas em câmara de Neubauer e diluídas serialmente até uma concentração de 10^6 10^5 10^4 e 10^3 células/mL e semeadas em um volume de 10 µL em meio sólido BHI e meio BHI + Hyg 75 µg/mL.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

5.2 Curva de crescimento e viabilidade celular de *P. lutzii* WT *e* AS-*AreA* em diferentes fontes de nitrogênio

A absorção de nutrientes é essencial para sobrevivência e virulência dos fungos, onde o nitrogênio desempenha papel fundamental para síntese de ácidos nucleicos e proteínas (Lee; Morrow; Fraser, 2013). Ao ser fagocitado o fungo enfrenta a imunidade nutricional do hospedeiro (Lorenz *et al*., 2004; Schinko *et al*., 2010). A assimilação do nitrato é uma boa fonte de nitrogênio, embora a sua utilização requeira enzimas de nitrito e nitrato redutase e um alto custo metabólico. O nitrato e nitrito são considerados uma fonte de nitrogênio desfavorável e são somente usados quando fontes preferenciais como glutamina e amônio não estão disponíveis (Siverio, 2002; Pfannmüller; Boysen; Tudzynski, 2017).

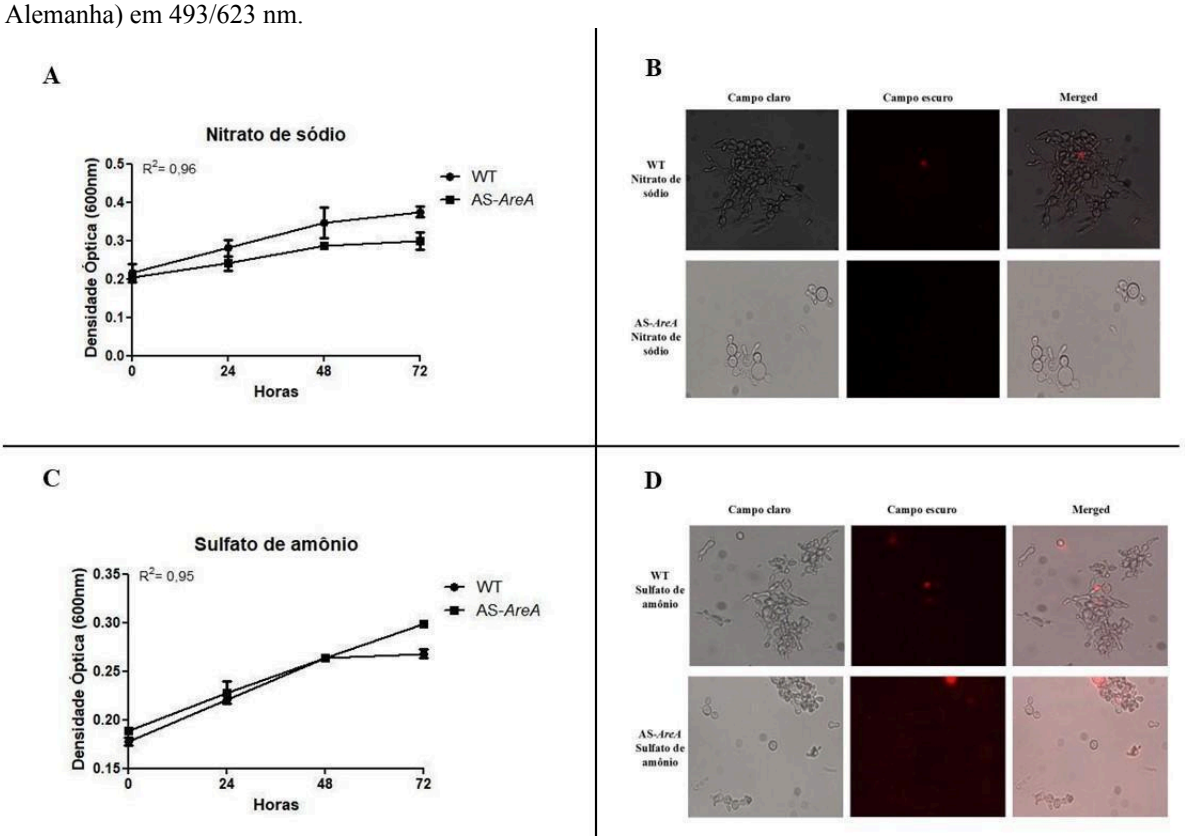
O fator de transcrição NirA de *A. nidulans* e Nit4 de *N. crassa* têm interação com fator de transcrição GATA AreA e Nit-2, respectivamente, para expressão dos genes assimiladores de nitrato (Narendja *et al*., 2002). Portanto, foi realizada uma curva de crescimento utilizando uma cepa silenciada para o fator de transcrição AreA (AS-*AreA*) nos tempos de 0h, 24h, 48h e 72h para avaliar a capacidade do fungo de se adaptar em ambiente sem fonte de nitrogênio preferencial e de assimilar o nitrato como única fonte de nitrogênio (Figura 6 A e C).

Em *P. lutzii* a assimilação de nitrato e a interação entre os fatores NirA e AreA ainda não foram bem descritos, no entanto, os resultados da curva indicam que em *P. lutzii* AreA também possui um papel indireto para assimilação efetiva do nitrato, tendo em vista que houve uma queda no crescimento da cepa silenciada quando comparada com a cepa selvagem (WT) em meio suplementado com nitrato de sódio. No meio controle, suplementado com fonte preferencial sulfato de amônio, as cepas As-*AreA* tiveram um crescimento maior a partir do período de 48h, enquanto o WT teve o crescimento estacionado.

Para analisar se o baixo crescimento das cepas em diferentes suplementações de nitrogênio não se tratava de morte celular, foi realizado uma marcação com iodeto de propídeo nas células no tempo de 48h. Foi possível observar através da microscopia de fluorescência que as cepas AS-*AreA* suplementadas com nitrato de sódio, embora apresente um baixo crescimento, são viáveis (Figura 6).

As informações encontradas vão de acordo com os achados por Cruz-Leite *et al.* (2020), que mostram que em *Paracoccidioides spp.*, o alívio da NCR é estabelecido em 48h sem fontes de nitrogênio não preferencial. Além disso, os achados sugerem que as células de *P. lutzii* têm capacidade de se adaptar em ambientes com fonte de nitrogênio não preferencial (Cruz-Leite *et.al*., 2023).

Figura 6: Curva de crescimento e viabilidade celular das cepas WT e AS-*AreA*. (A e C) Células de levedura de *P. lutzii WT* e AS-*AreA* foram cultivadas em meio BHI por 24 horas, centrifugadas e lavadas com PBS 1x e inoculadas em meio YNB suplementado com Nitrato de Sódio e Sulfato de amônio com 2% de glicose a uma densidade óptica de 0,200. As células foram incubadas sob agitação constante a 150 rpm, a 37ºC, e a absorbância de crescimento foi medida nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 600 nm para determinação da curva de crescimento. **(B e D)** microscopia representa a viabilidade celular de *P. lutzii* que foi acessada por coloração com iodeto de propídio (2 µg/mL) às 48 horas para confirmar a viabilidade celular. As células mortas são coloridas de vermelho. Imagens obtidas em microscópio A1 (Carl Zeiss AG, Alemanha) em 493/623 nm.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2025

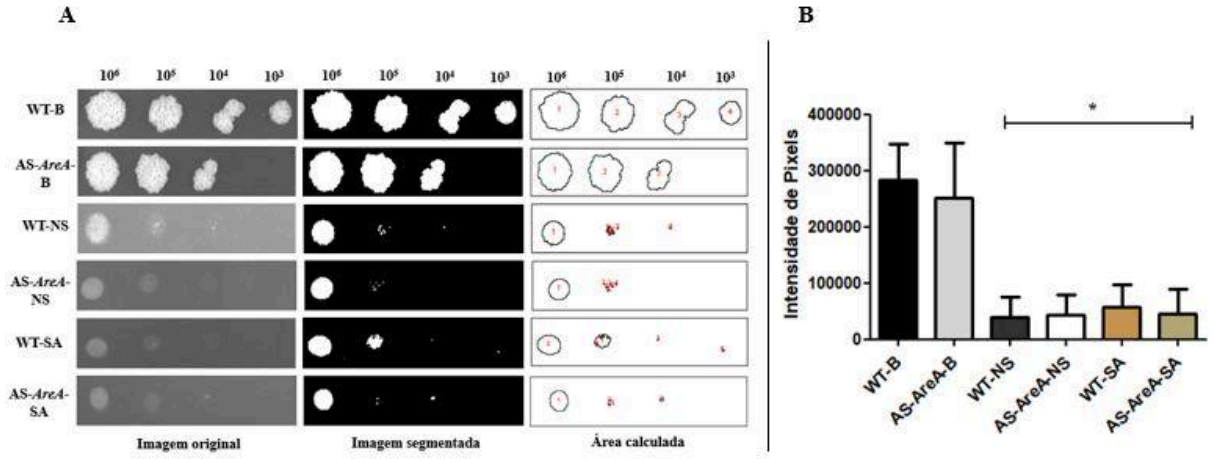
5.3 Perfil fenotípico de crescimento de *P. lutzii* WT e AS-*AreA* em meio sólido com diferentes fontes de nitrogênio

Para análise qualitativa e sustentação do que é visto em meio de cultura líquidas suplementadas com nitrato de sódio e sulfato de amônio, foi realizado o cultivo de *P. lutzii* em meio sólido suplementado com nitrato de sódio 10mM, sulfato de amônio 10mM e BHI (*Brain heart infusion* - BHI) em diluições seriadas de 10^6, 10^5, 10^4 e 10^3. Em estudos realizados por Pfannmuller (2017), é visto que a deleção de genes assimiladores de nitrato em *F. fujikuroi* impactam na formação da colônia quando cultivados em fontes não preferenciais de nitrogênio.

No estudo realizado por Pereira *et al.* (2003), os pesquisadores investigaram fungos filamentosos e observaram que, quando o mutante do regulador geral AreA foi cultivado em

meios que continham nitrato como fonte de nitrogênio, seu crescimento foi significativamente afetado. Em contraste, quando esse mesmo mutante foi cultivado em meio que utilizam amônia como fonte de nitrogênio, não houve impacto no crescimento.

Figura 7: Caracterização fenotípica de *P. lutzii* WT e AS-*AreA*. (A) A coluna "original" apresenta células de levedura cultivadas por 48 horas em meio líquido BHI a 37ºC, com agitação constante a 150 rpm. Após o cultivo, as células foram recuperadas, contadas em câmara de Neubauer e diluídas em séries decrescentes (10^6, 10^5, 10^4 e 10^3 células/mL). Em seguida, foram semeadas em 10 µL de meio sólido BHI (B) e meio seletivo YNB, suplementado com 10 mM de nitrato de sódio (NS) e sulfato de amônio (SA). As imagens foram capturadas após 15 dias de incubação a 37ºC. A coluna "imagem segmentada" exibe as imagens após aplicação de limiar (threshold) no FIJI, destacando as áreas de interesse para análise de intensidade de pixels. Em "Área calculada", são apresentados os contornos desenhados e as áreas calculadas para cada colônia. **(B)** Gráfico que mostra a intensidade de pixels obtidas a partir do crescimento celular de *P. lutzii* WT e AS-*AreA* em diferentes condições de nitrogênio. A significância estatística foi determinada por análise de variância (ANOVA de uma via), onde * indica valores de $p < 0,05$.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

Em P. lutzii, observa-se um crescimento robusto das cepas WT e As-AreA no meio contendo BHI, devido à alta disponibilidade de nutrientes nesse meio. Já em meio contendo nitrato de sódio, embora seja uma fonte de nitrogênio não preferencial, o fungo consegue crescer, mesmo que de forma reduzida. Não foram observadas diferenças significativas no crescimento entre as cepas WT e mutante nessa condição. Da mesma forma, no meio contendo sulfato de amônio, não houve diferenças significativas no crescimento entre as duas cepas.

Em resumo, o regulador AreA demonstra desempenhar um papel no crescimento do fungo na presença de nitrato, pois participa da ativação de genes responsáveis pela assimilação desse composto, como os que codificam o transportador de nitrato e as enzimas nitrato e nitrito redutases. No entanto, no crescimento em meio sólido contendo nitrato e

amônio não é possível notar diferenças significativas de crescimento entre as fontes de nitrogênio.

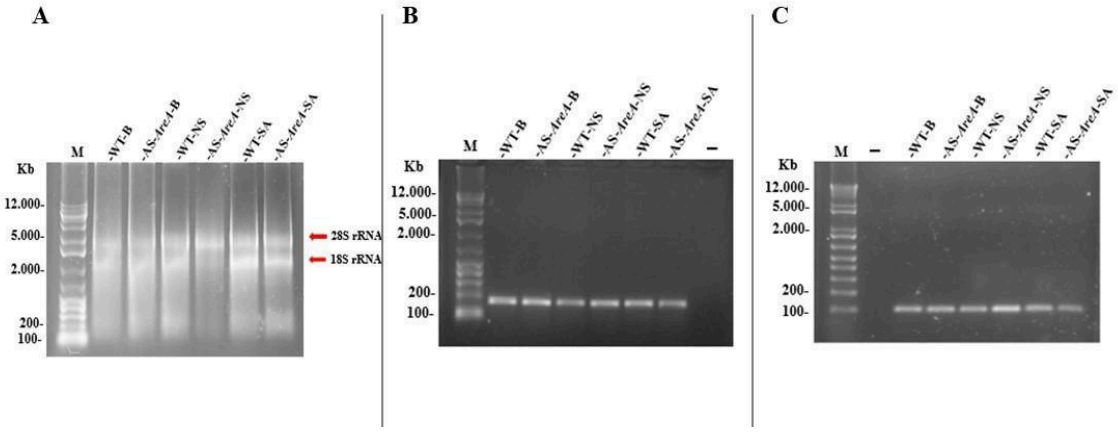
5.4 Amplificação e análise da expressão do gene NirA em *P. lutzii*: Síntese de cDNA e PCR convencional como estratégia de investigação.

Em análises *in silico* realizadas anteriormente foi possível identificar uma proteína ortóloga ao NirA de *A. nidulans* em espécies de *Paracoccidioides* (Santos, não publicado). Nessas avaliações é reconhecida a semelhança da composição entre elas. Portanto, para confirmar a expressão do gene NirA em *P. lutzii* e avaliar se o silenciamento do fator de transcrição AreA impacta na expressão de NirA, uma análise em qPCR foi realizada.

Para isso, foi realizada a extração de RNA total de cepas WT e AS-*AreA* de *P. lutzii* e a construção de cDNA em diferentes condições de cultivo e fontes de nitrogênio. Utilizando o gene da tubulina beta (164 pb), foi realizado uma PCR convencional para análise do cDNA construído. O resultado foi analisado através de uma corrida eletroforética em gel de agarose utilizando Gel Red (Biotium) como intercalante de DNA (Figura 8 A).

Para avaliar a eficácia do primer desenvolvido para o fator NirA (PAAG_02447), foi realizada uma reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional. A sequência FASTA obtida foi utilizada para identificar a temperatura de melting (TM) e o tamanho do amplicon. Os resultados mostraram que o amplicon teve um tamanho de 108 pb e a TM ideal foi de 62ºC. A eficácia da PCR foi confirmada por meio de análise eletroforética em gel de agarose (Figura 8 B).

Figura 8: Perfil eletroforético em gel de agarose. (A) Corrida de eletroforese dos extratos de RNA total de *P. lutzii* WT e As-*AreA* obtidos no tempo de 48h em meio BHI e YNB contendo nitrato de sódio e sulfato de amônio 10mM. **(B)** O produto da PCR convencional utilizando o primer endógeno Tubulina Beta de *P. lutzii*, a partir dos extratos de RNA. **(C)** Corrida de eletroforese utilizando o primer específico para o gene NirA de *P. lutzii*, a partir dos extratos de RNA.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

Essa análise utilizando os primers desenvolvidos para o fator de transcrição NirA possibilitou a confirmação da presença do alvo de interesse nas amostras analisadas bem como a qualidade do cDNA construído. A amplificação bem-sucedida foi evidenciada pela visualização de um amplicon de 108 pb na análise eletroforética em gel de agarose, corroborando a especificidade dos primers para o gene. A observação de uma banda clara e de tamanho esperado indicou que os primers amplificaram o fragmento desejado de maneira eficaz, confirmando a integridade e a especificidade da reação.

5.5 Análise da expressão gênica de NirA em *P. lutzii*

Para assegurar a precisão dos resultados relacionados à expressão gênica, foi realizada uma análise utilizando o programa NormFinder. Essa verificação visa estabelecer um gene endógeno do organismo que sofrerá uma menor variação entre as condições analisadas. Os genes avaliados foram enolase, actina e tubulina em meio BHI e YNB suplementados com sulfato de amônio e nitrato de sódio, e verificou-se que o gene que sofreu uma menor variação (ver tabela 2) foi da tubulina e, portanto é o normalizador mais adequado, apresentando estabilidade na expressão gênica em todas as condições analisadas.

Tabela 2: Genes analisados pelo programa NormFinder e os valores de estabilidade gerados nas condições analisadas.

Nome do gene	Valor de estabilidade
Actina	94,991
Enolase	164,572
Tubulina	34,664

Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

Na análise da expressão do fator de transcrição NirA, a cepa WT em meio BHI foi utilizada como controle. Observou-se que a cepa mutante As-*AreA* apresentou uma expressão significativamente menor em comparação ao controle (ver figura 9). Por outro lado, em meio contendo sulfato de amônio, a expressão do gene foi semelhante à observada no WT em BHI, apresentando pouca ou nenhuma diferença significativa nas cepas WT e As-*AreA*. O NirA está diretamente relacionado ao mecanismo de assimilação de nitrato (Foster *et al.*, 2009). Em meios de cultura ricos, como o BHI, que contém fontes de nitrogênio orgânico, a assimilação de nitrato e nitrito torna-se desnecessária. Por outro lado, em meio contendo sulfato de

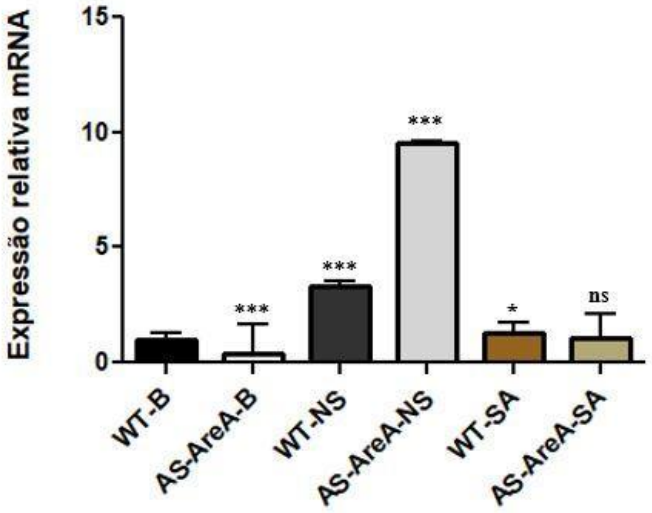
amônio, essa fonte de nitrogênio é considerada preferencial. Estudos realizados por Berger *et al.* (2006) indicam que o amônio promove a exportação nuclear de NirA, reduzindo sua atividade na regulação da assimilação de nitrato.

Isso indica que, em meios com fontes de nitrogênio preferenciais, o silenciamento do fator de transcrição AreA não exerce impacto significativo na expressão do gene avaliado. Entretanto, ao analisar as cepas selvagem e mutante em meio contendo nitrato de sódio, observamos uma maior expressão de NirA (Figura 9). Além disso, na cepa com o fator AreA silenciado, a expressão de NirA foi ainda maior quando comparada à cepa WT na mesma condição, indicando um papel diferencial do AreA na regulação do NirA sob essas condições.

O fator de transcrição AreA é amplamente reconhecido como um regulador geral do metabolismo de nitrogênio em fungos (Conlon *et al*., 2001; Biswas e Morschhauser, 2005) e já foi identificado no complexo *Paracoccidioides* (Cruz-Leite, 2020). De acordo com os estudos de Berger *et al*. (2006), AreA desempenha um papel essencial na ativação e remodelação da cromatina, facilitando a ligação do fator NirA ao DNA e induzindo a expressão de genes relacionados à assimilação de nitrato.

Em *A. nidulans*, o fator NirA é exportado para o núcleo após a indução por nitrato, na ausência de fontes preferenciais de nitrogênio (amônio e glutamina). É visto que NirA pode acumular-se no núcleo mesmo na ausência de AreA, desde que tenha acesso ao nitrato através de um transportador (Berger *et al*., 2006) e existem evidências que sugerem pelo menos outro transportador de nitrato, já que mutantes *crnA*$^{-}$ (gene codificador de uma permease de nitrato) ainda são capazes de utilizar nitrato como fonte de nitrogênio (Narandja *et al*., 2002). Entretanto, sua ligação à região promotora depende da presença de AreA funcional (Berger *et al*., 2006; Bernreiter *et al*., 2006).

Figura 9: Expressão relativa de NirA das cepas *P. lutzii* WT e As-*AreA* em meio BHI (B), meio Nitrato de Sódio (NS) e meio Sulfato de Amônio (SA). A significância foi determinada por test t student, onde os valores de *** indicam $p < 0,001$, * $p < 0,05$ e NS indicam Não Significativo.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

Na análise da expressão feita por qPCR, observa-se uma superexpressão de NirA, podendo corresponder a uma tentativa de contornar a ausência de AreA. Em resumo, a superexpressão de NirA em As-*AreA* pode refletir um mecanismo compensatório no qual a célula busca superar a deficiência na ativação promovida por AreA (Berger *et al*., 2006). No entanto, o crescimento reduzido observado em experimentos anteriores de crescimento em meio nitrato de sódio, reforça a importância de AreA para eficiente utilização de nitrato como fonte de nitrogênio.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste estudo fornecem informações significativas sobre a assimilação de nitrato e a função dos fatores de transcrição NirA e AreA em *P. lutzii*. A análise do crescimento e da viabilidade celular indicou que o fator AreA é fundamental para a assimilação de nitrato. A cepa silenciada para AreA (AS-*AreA*) mostrou um crescimento reduzido em meio enriquecido com nitrato de sódio em comparação com a cepa selvagem (WT). Esse efeito não foi observado na presença de fontes preferenciais de nitrogênio, como sulfato de amônio, onde ambas as cepas apresentaram crescimento semelhante, sugerindo que AreA desempenha um papel para a utilização eficaz do nitrato como fonte de nitrogênio.

A viabilidade celular da cepa AS-*AreA* foi confirmada por meio da marcação com iodeto de propídeo, o que indica que a diminuição do crescimento não foi causada pela morte celular, mas sim por uma limitação na assimilação de nitrato.

Além disso, a PCR convencional confirmou a presença do gene NirA em *P. lutzii*, com a amplificação bem-sucedida do fragmento esperado de 108 pb. Na análise de expressão por qPCR verificou-se uma superexpressão de NirA nas cepas As-*AreA* suplementadas com nitrato de sódio, indicando um provável efeito compensatório pela ausência de AreA.

Os resultados deste estudo fornecem informações valiosas sobre o mecanismo de assimilação de nitrato em *P. lutzii* e o papel dos fatores de transcrição NirA e AreA na aquisição de nitrogênio. A identificação da importância crucial de AreA nesse processo abre novas perspectivas para investigações futuras. Estudos adicionais serão essenciais para esclarecer os mecanismos subjacentes à superexpressão de NirA, além de explorar outras vias que podem estar envolvidas, como a desintoxicação por óxido nítrico, conforme relatado em algumas literaturas. A análise transcriptômica e proteômica associadas a esse processo também será fundamental para uma compreensão mais aprofundada das vias metabólicas reguladas por esses fatores de transcrição. Essas abordagens permitirão elucidar com maior precisão os mecanismos moleculares da assimilação de nitrato e o papel de NirA no mecanismo NCR.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACORCI, M. J. et al. Inhibition of human neutrophil apoptosis by *Paracoccidioides* brasiliensis: Role of interleukin-8. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 69, n. 2, p. 73–79, fev. 2009.

ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ØRNTOFT, T. F. Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. **Cancer Research**, v. 64, n. 15, p. 5245–5250, 1 ago. 2004.

BERGER, H. et al. Dissecting individual steps of nitrogen transcription factor cooperation in the Aspergillus nidulans nitrate cluster. **Molecular Microbiology**, v. 69, n. 6, p. 1385–1398, set. 2008.

BERGER, H. et al. The GATA factor AreA regulates localization and in vivo binding site occupancy of the nitrate activator NirA. **Molecular Microbiology**, v. 59, n. 2, p. 433–446, jan. 2006.

BERNREITER, A. et al. Nuclear Export of the Transcription Factor NirA Is a Regulatory Checkpoint for Nitrate Induction in Aspergillus nidulans. **Molecular and Cellular Biology**, v. 27, n. 3, p. 791–802, 21 nov. 2006.

BISWAS, K.; MORSCHHÄUSER, J. The Mep2p ammonium permease controls nitrogen starvation-induced filamentous growth in Candida albicans. **Molecular Microbiology**, v. 56, n. 3, p. 649–669, 2005.

BLOCK, D. H.; SHAPIRA, M. GATA transcription factors as tissue-specific master regulators for induced responses. **Worm**, v. 4, n. 4, 30 nov. 2015.

BOOKOUT, A. L. et al. High-Throughput Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR. **Current Protocols in Molecular Biology**, v. 73, n. 1, p. 15.8.1-15.8.28, 2006.

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 2, p. 89–117, abr. 1993.

CADDICK, M. X.; PETERS, D.; PLATT, A. Nitrogen regulation in fungi. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 65, n. 3, p. 169–177, 1994.

CAMACHO, E.; NIÑO-VEGA, G. A. *Paracoccidioides* Spp.: Virulence Factors and Immune-Evasion Strategies. **Mediators of Inflammation**, v. 2017, p. e5313691, 2 mai 2017.

CHAVES, A. et al. Updates in *Paracoccidioides* Biology and Genetic Advances in Fungus Manipulation. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 2, p. 116–116, 4 fev. 2021.

CONLON, H. et al. The Aspergillus nidulans GATA transcription factor gene areB encodes at least three proteins and features three classes of mutation. **Molecular Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 361–375, 2001.

COVE, D. J. Genetic Studies Of Nitrate Assimilation In *Aspergillus Nidulans*. **Biological Reviews**, v. 54, n. 3, p. 291–327, ago. 1979.

CRUZ-LEITE, V. R. M. et al. Nitrogen Catabolite Repression in members of *Paracoccidioides* complex. **Microbial Pathogenesis**, v. 149, p. 104281, 2020.

CRUZ-LEITE, V. R. M. et al. Proteomics of Paracoccidioides lutzii: Overview of Changes Triggered by Nitrogen Catabolite Repression. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 11, p. 1102–1102, 12 nov. 2023.

DE OLIVEIRA, G. G. et al. Serological Survey of Paracoccidioidomycosis in Cats. **Mycopathologia**, v. 176, n. 3, p. 299–302, 1 out. 2013.

DE OLIVEIRA, H. C. et al. *Paracoccidioides*-host Interaction: An Overview on Recent Advances in the Paracoccidioidomycosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 25 nov. 2015.

DONG, X. et al. Structural basis for leucine-rich nuclear export signal recognition by CRM1. **Nature**, v. 458, n. 7242, p. 1136–1141, 30 abr. 2009.

EVANS, T.; FELSENFELD, G. The erythroid-specific transcription factor Eryf1: a new finger protein. **Cell**, v. 58, n. 5, p. 877–885, 8 set. 1989.

FERNÁNDEZ-GARCÍA, O. A.; CUELLAR-RODRÍGUEZ, J. M. Immunology of Fungal Infections. **Infectious Disease Clinics of North America**, 1 jun. 2021.

FOSTER, M. W. et al. A genetic analysis of nitrosative stress. **Biochemistry**, v. 48, n. 4, p. 792–799, 2009.

FRASER, J. A.; DAVIS, M. A.; HYNES, M. J. The Formamidase Gene of Aspergillus nidulans: Regulation by Nitrogen Metabolite Repression and Transcriptional Interference by an Overlapping Upstream Gene. **Genetics**, v. 157, n. 1, p. 119–131, 1 jan. 2001.

FU, Y.-H.; MARZLUF, G. A. Characterization of *nit*-2, the Major Nitrogen Regulatory Gene of *Neurospora*Crassa. **Molecular and Cellular Biology**, v. 7, n. 5, p. 1691–1696, 1 maio 1987.

FUJIWARA, T. GATA Transcription Factors: Basic Principles and Related Human Disorders. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 242, n. 2, p. 83–91, 2017.

GALIMBERTI, R. et al. Emerging systemic fungal infections. **Clinics in Dermatology**, v. 30, n. 6, p. 633–650, nov. 2012.

GAUTHIER, G. M. Dimorphism in Fungal Pathogens of Mammals, Plants, and Insects. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 2, p. e1004608, 12 fev. 2015.

GIUSIANO, G. The Trojan Horse Model in *Paracoccidioides*: A Fantastic Pathway to Survive Infecting Human CellsFrontiers in Cellular and Infection. **Microbiology Frontiers Media S.A.**, 11 fev. 2021.

GORDON, S. Pattern Recognition Receptors: Doubling Up for the Innate Immune Response. **Cell**, v. 111, n. 7, p. 927–930, 27 dez. 2002.

GORFER, M. et al. Community profiling and gene expression of fungal assimilatory nitrate reductases in agricultural soil. **The ISME Journal**, v. 5, n. 11, p. 1771–1783, 12 nov. 2011.

HAHN, R. C. et al. Paracoccidioidomycosis: Current Status and Future Trends. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 35, n. 4, 21 dez. 2022.

HAY, R. J. Fungal infections. **Clinics in dermatology**, v. 24, n. 3, p. 201–12, maio 2006.

HÖFT, M. A.; DUVENAGE, L.; HOVING, J. C. Key thermally dimorphic fungal pathogens: shaping host immunity. **Open Biology**, v. 12, n. 3, 9 mar. 2022.

ILIEV, I. D.; LEONARDI, I. Fungal dysbiosis: immunity and interactions at mucosal barriers. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 10, p. 635–646, 12 out. 2017.

KRAKHECKE-TEIXEIRA, A. G. et al. Clinical and Eco-Epidemiological Aspects of a Novel Hyperendemic Area of Paracoccidioidomycosis in the Tocantins-Araguaia Basin (Northern Brazil), Caused by *Paracoccidioides* sp. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 5, p. 502, maio 2022.

LEE, I. R.; MORROW, C. A.; FRASER, J. A. Nitrogen regulation of virulence in clinically prevalent fungal pathogens. **FEMS Microbiology Letters**, v. 345, n. 2, p. 77–84, 1 ago. 2013.

LIMA, P. de S. et al. Transcriptional and Proteomic Responses to Carbon Starvation in *Paracoccidioides*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 5, 2014.

LIMON, J. J.; SKALSKI, J. H.; UNDERHILL, D. M. Commensal Fungi in Health and Disease. **Cell Host and Microbe**, v. 22, n. 2, p. 156–165, 9 ago. 2017.

LORENZ, M. C.; BENDER, J. A.; FINK, G. R. Transcriptional Response of Candida albicans upon Internalization by Macrophages. **Eukaryot Cell**, v. 3, n. 5, p. 1076–1087, 2004.

MURO-PASTOR, M. et al. The GATA factor AreA is essential for chromatin remodelling in a eukaryotic bidirectional promoter. **The EMBO Journal**, v. 18, n. 6, p. 1584–1597, 15 mar. 1999a.

NARENDJA, F. et al. Nitrate and the GATA factor AreA are necessary for in vivo binding of NirA, the pathway-specific transcriptional activator of Aspergillus nidulans. **Molecular Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 573–583, 2002.

PARENTE-ROCHA, J. A. et al. Macrophage Interaction with Paracoccidioides brasiliensis Yeast Cells Modulates Fungal Metabolism and Generates a Response to Oxidative Stress. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, 11 set. 2015.

PEÇANHA, P. M. et al. Paracoccidioidomycosis: What We Know and What Is New in Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 10, p. 1098, 18 out. 2022.

PEREIRA, J. F. et al. Nitrato redutase em fungos filamentosos - O potencial multifuncional da nitrato redutase em pesquisas com biologia molecular de fungos. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, 2003.

POLLARD, J. W. Trophic macrophages in development and disease. **Nature reviews Immunology**, v. 9, n. 4, p. 259–270, abr. 2009.

PFANNMÜLLER, A.; BOYSEN, J. M.; TUDZYNSKI, B. Nitrate assimilation in Fusarium fujikuroi is controlled by multiple levels of regulation. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 381, 2017.

RAMOS-E-SILVA, M.; SARAIVA, L. DO E. S. Paracoccidioidomycosis. **Dermatologic Clinics, International Dermatology**. v. 26, n. 2, p. 257–269, 1 abr. 2008.

RESTREPO, A.; JIMÉNEZ, B. E. Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase in a chemically defined culture medium. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 12, n. 2, p. 279–281, ago. 1980.

RESTREPO, A. et al. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. **Infect Immun**, v. 46, n. 2, p. 346–353, 1 nov. 1984.

RICCI, G. et al. Canine paracoccidioidomycosis. **Medical Mycology**, v. 42, n. 4, p. 379–383, ago. 2004.

RIES, L. N. A. et al. Overview of carbon and nitrogen catabolite metabolism in the virulence of human pathogenic fungi. **Molecular Microbiology**, v. 107, n. 3, p. 277–297, 1 fev. 2018.

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nature Reviews Immunology**, abr. 2011.

SANTOS, W. A. DOS et al. Associação entre tabagismo e paracoccidioidomicose: um estudo de caso-controle no Estado do Espírito Santo, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 1, p. 245–253, fev. 2003.

SCHINKO, T. et al. Transcriptome analysis of nitrate assimilation in Aspergillus nidulans reveals connections to nitric oxide metabolism. **Molecular Microbiology**, v. 78, n. 3, p. 720–738, 2010.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 5, p. 715–740, set. 2017.

SILVA, L. O. S. et al. *Paracoccidioides lutzii* Formamidase Contributes to Fungal Survival in Macrophages. **Microorganisms**, v. 10, n. 10, p. 2011–2011, 12 out. 2022.

SIVERIO, J. M. Assimilation of nitrate by yeasts. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, n. 3, p. 277-284, 2002.

TABORDA, C. P. et al. *Paracoccidioides* spp. and *Histoplasma capsulatum*: Current and New Perspectives for Diagnosis and Treatment. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 15, p. 1333–1348, 2018.

THIND, S. K.; TABORDA, C. P.; NOSANCHUK, J. D. Dendritic cell interactions with Histoplasma and *Paracoccidioides*. **Virulence**, v. 6, n. 5, p. 424–432, 4 jul. 2015.

THOMPSON, G. R. et al. Global guideline for the diagnosis and management of the endemic mycoses: an initiative of the European Confederation of Medical Mycology in cooperation with the International Society for Human and Animal Mycology. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 21, n. 12, p. e364–e374, 1 dez. 2021.

TURISSINI, D. A. et al. Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 106, p. 9–25, 1 set. 2017.

VILELA, R. et al. A taxonomic review of the genus *Paracoccidioides*, with focus on the uncultivable species. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 17, n. 4, p. e0011220–e0011220, 27 abr. 2023.

WONG, K. H.; HYNES, M. J.; DAVIS, M. A. Recent Advances in Nitrogen Regulation: a Comparison between Saccharomyces cerevisiae and Filamentous Fungi. **Eukaryotic Cell**, v. 7, n. 6, p. 917–925, jun. 2008.

ZAMAN, S. et al. How Saccharomyces responds to nutrients. **Annual review of genetics**, v. 42, p. 27–81, jan. 2008.

ZHAO, X. et al. The modification of Gat1p in nitrogen catabolite repression to enhance non-preferred nitrogen utilization in Saccharomyces cerevisiae. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 21603, 22 fev. 2016.