

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE BACHARELADO EM BIOMEDICINA

MARIA EDUARDA DOURADO PEIXOTO

CARACTERIZAÇÃO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO *AreA* DE *P. LUTZII*

GOIÂNIA

2024

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, autor(a) 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)(s) 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 da autor(a): Maria Eduarda Dourado Peixoto

Título do trabalho: "Caracterização do fator de transcrição Area de P. 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] 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(a) autor(a)(s) e ao(a) 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 07/12/2024, às 20:09, 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 **Maria Eduarda Dourado Peixoto, Usuário Externo**, em 08/12/2024, às 17:21, 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://sef.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_confirma&id_documento_acesso_externo=0, informando o código verificador 5004341 e o código CRC D0E38600.

MARIA EDUARDA DOURADO PEIXOTO

CARACTERIZAÇÃO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO *AreA* DE *P. LUTZII*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina pela Universidade Federal de Goiás.

Orientador: Prof. Dr. Clayton Luiz Borges.

Coorientador: Bel. Thalison Rodrigues Moreira.

GOIÂNIA

2024

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

Peixoto, Maria Eduarda Dourado
Caracterização do fator de transcrição AreA de *P. lutzii* [manuscrito] /
Maria Eduarda Dourado Peixoto. - 2024.
MMXXIV, 2024 f.

Orientador: Prof. Clayton Luiz Borges; co-orientador Thalison
Rodrigues Moreira.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade
Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Biomedicina,
Goiânia, 2024.

1. Paracoccidiodomicose. 2. Metabolismo de Nitrogênio. 3.
Glutamina. 4. AreA. I. Borges, Clayton Luiz, orient. II. Título.

CDU 61



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos vinte nove dias do mês de novembro de dois mil e vinte e quatro iniciou-se a sessão pública de defesa do Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) intitulado "Caracterização do fator de transcrição *AreA* de *P. lutzii*" de autoria de Maria Eduarda Dourado Peixoto, 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. Juliana Alves Parente Rocha - Instituto de Ciências Biológicas/ UFG e Dra. Olivia Basso Rocha - Instituto de Ciências Biológicas/ UFG. Após a apresentação, a banca examinadora realizou a arguição da estudante. Posteriormente, de forma reservada, a Banca Examinadora atribuiu a nota final de 10,0 (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 29/11/2024, às 11:26, 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 **Juliana Alves Parente Rocha, Professora do Magistério Superior**, em 29/11/2024, às 11:27, 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 **Olivia Basso Rocha, Usuário Externo**, em 29/11/2024, às 11:29, 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 **4997980** e o código CRC **61923A58**.

À minha criança, pois todo homem carrega consigo a criança que já fora um dia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço sobretudo aos meus pais que, além dos incentivos, sempre lutaram para que eu tivesse acesso à educação. Em meio as dificuldades, eles tentaram me mostrar que estudar era o melhor caminho. Bem, eles estavam certos. Gostaria de agradecer também ao meu irmão Johny por me ensinar o verdadeiro significado de amizade, e juntos das minhas irmãs Lara e Luísa, me mostrarem o que é ser amada de verdade.

Agradeço as minhas sogras, Sarah e Elisa. Ao meu sogro, Junior, e aos meus cunhados, Ariel, Lylar e Bernardo por me acolherem e serem casa quando eu só sabia sentir saudades da minha. Agradeço ao meu namorado, Ishai, por me incentivar a seguir os meus sonhos, além disso, me ajudar a realizá-los. A vida com ele tem sido linda.

Agradeço as minhas amigas de infância, Vitória e Maria Eduarda, pela caminhada que dividimos juntas desde muito novas. Aproveito e agradeço também aos amigos da faculdade (grupão) por terem sido rede de apoio dentro e fora do espaço acadêmico. Agradeço a Laura pelas considerações que foram feitas nesse trabalho e pela amizade. Agradeço aos amigos que fiz no LBM, sobretudo ao Thalison. Além da coorientação, conseguimos construir uma relação de amizade, sou muito grata por tudo que vivenciamos juntos nesse último ano.

Especialmente gostaria de agradecer a todos os professores que passaram pela minha vida, desde o primário. Gostaria de agradecer aos que me alfabetizaram, cujo nome não me recordo mais. À professora Gleiciara, por ter me ensinado matemática. Ao professor Samuel, pela dedicação em me ensinar orações subordinadas. Aos meus professores do ensino médio, Doreli, Maurício, Fadia, Chico, Diana e Márcia por terem me preparado para ingressar no ensino superior. Ao professor Clayton, quem me orientou nesse trabalho e me deu a oportunidade de ingressar na pesquisa. Tenho plena consciência de que os meus feitos são resultado do conhecimento que vocês me transmitiram. Obrigado a todos pelo compromisso.

Agradeço a minha psicóloga, Dra. Ana Carolina, por todo cuidado.

Agradeço a mim mesma por não ter desistido do tão sonhado bacharelado. Houve dificuldade e muito medo, mas eu consegui!

*“Tente (tente) e não diga que a vitória está perdida
se é de batalhas que se vive a vida, tente outra vez”*

(Raul Seixas).

RESUMO

A paracoccidiodomicose é uma micose endêmica de áreas subtropicais da América Latina, causada por fungos do gênero *Paracoccidioides*. A infecção ocorre pela inalação de conídios ou fragmentos de micélio. Ao chegar nos pulmões do hospedeiro, células fagocíticas combatem o micro-organismo por meio da fagocitose. Dentro do fagossomo, alterações no pH, estresse oxidativo e limitação nutricional desafiam a sobrevivência do patógeno. Nesse contexto, a imunidade nutricional é um processo que priva o patógeno de fontes preferenciais de nutrientes essenciais para a síntese de biomoléculas, como fontes de nitrogênio. Os fungos patogênicos, como *Paracoccidioides spp.*, possuem um mecanismo coordenado para captar fontes não preferenciais de nitrogênio, denominado Repressão Catabólica de Nitrogênio (RCN). O fator de transcrição GATA *AreA* comanda esse processo, regulando genes responsáveis pela captação e assimilação dessas fontes, garantindo o catabolismo do nitrogênio disponível no ambiente. O objetivo deste trabalho foi investigar o impacto do silenciamento do gene *areA* na assimilação de fontes de nitrogênio, crescimento, composição da parede celular e tamanho das células de *P. lutzii*, comparando cepas mutantes e selvagens cultivadas em diferentes concentrações de glutamina. Os genes *gap* e *areA* foram avaliados por RT-qPCR. A curva de crescimento foi medida pela absorbância nos pontos 0, 12, 24 e 48 horas. A viabilidade foi estimada utilizando iodeto de propídio, seguida de análise em microscópio de fluorescência. Para avaliação da composição da parede celular e tamanho celular, as células foram coradas com branco de calcofluor e analisadas por microscopia de fluorescência. Os genes *gap* e *areA* mostraram maior expressão na cepa mutante em glutamina. A análise de CFW sugere diferença na composição da parede celular entre as cepas em 10 mM de glutamina. Além disso, o mutante apresentou maior tamanho celular nessa condição. Portanto, os resultados sugerem que a cepa silenciada para o gene *areA* apresenta uma resposta biológica diferente do descrito na literatura quando cultivada em 10 mM de glutamina. A análise da expressão de novos alvos gênicos e a avaliação do perfil proteômico nas três condições abordadas podem ajudar a identificar fatores importantes para a compreensão do papel do *AreA* em *P. lutzii*.

Palavras chaves: Paracoccidiodomicose; Metabolismo de Nitrogênio; Glutamina; *AreA*.

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis is a mycosis endemic to subtropical areas of Latin America, caused by fungi of the genus *Paracoccidioides*. Infection occurs via inhalation of conidia or fragments of mycelium. In the lungs of the host, phagocytic cells engage in the process of phagocytosis to combat the microorganism. Within the phagosome, alterations in pH, oxidative stress, and nutritional limitation present challenges to the pathogen's survival. In this context, nutritional immunity can be defined as a process that deprives the pathogen of preferred sources of essential nutrients required for the synthesis of biomolecules, such as nitrogen sources. Pathogenic fungi such as *Paracoccidioides spp.* have a coordinated mechanism for capturing non-preferred sources of nitrogen, which is known as Nitrogen Catabolic Repression (NCR). The transcription factor GATA *AreA* is responsible for regulating this process, ensuring the catabolism of nitrogen available in the environment by controlling the genes responsible for the uptake and assimilation of these sources. The objective of this study was to examine the influence of *areA* gene silencing on the assimilation of nitrogen sources, growth, cell wall composition, and cell size of *P. lutzii*, with comparisons between mutant and wild-type strains grown in varying concentrations of glutamine. The *gap* and *areA* genes were evaluated by RT-qPCR. The growth curve was measured by absorbance at 0, 12, 24, and 48 hours. The viability of the cells was estimated by propidium iodide, followed by a subsequent analysis under a fluorescence microscope. To evaluate the composition of the cell wall and cell size, the cells were stained with calcofluor white and examined under a fluorescence microscope. The *gap* and *areA* genes exhibited elevated expression levels in the glutamine mutant strain. The CFW analysis indicates a discrepancy in cell wall composition between the strains in the presence of 10 mM glutamine. Furthermore, the mutant exhibited increased cell size under these conditions. Consequently, the results indicate that the strain in which the *areA* gene has been silenced displays a distinct biological response when grown in 10 mM glutamine, which differs from that described in the literature. An analysis of the expression of new gene targets and an evaluation of the proteomic profile in the therefore mentioned conditions may assist in identifying crucial factors for understanding the role of *AreA* in *P. lutzii*.

Key- words: Paracoccidioidomycosis; Nitrogen Metabolism; Glutamine; AreA.

SUMÁRIO

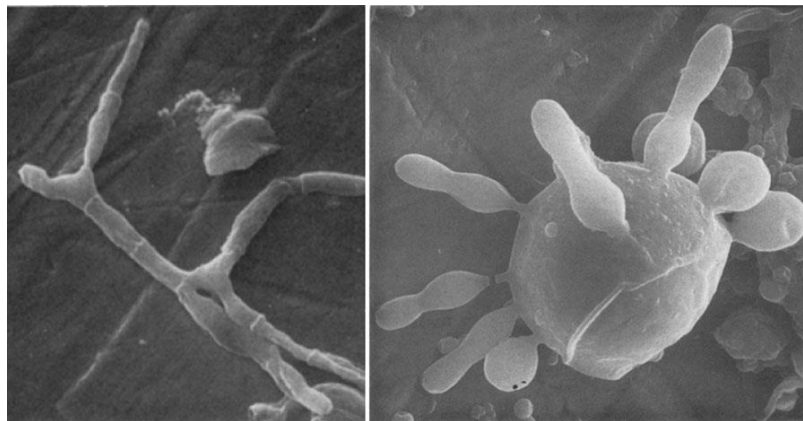
1.	INTRODUÇÃO.....	12
2.	JUSTIFICATIVA.....	19
3.	OBJETIVOS.....	20
	3.1 Objetivos gerais.....	20
	3.2 Objetivos específicos.....	20
4.	METODOLOGIA.....	21
	4.1 Manutenção das cepas mutante e selvagem.....	21
	4.2 Avaliação de expressão gênica.....	21
	4.3 Curva de crescimento e viabilidade.....	21
	4.4 Análise de parede e tamanho celular.....	22
	4.5 Análises estatísticas.....	22
5.	DISCUSSÃO.....	23
	5.2 Análise de Expressão Gênica Relativa de AreA e Gap1....	23
	5.2 Curva de crescimento e viabilidade.....	25
	5.3 Análise de parede e tamanho celular.....	26
6.	CONCLUSÃO.....	30
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31

1 INTRODUÇÃO

A Paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença causada por fungos do gênero *Paracoccidioides*, endêmica de áreas subtropicais e que acomete os países da América Latina. Anteriormente, esses patógenos eram classificados como espécies crípticas, reunidos em um complexo com quatro subgrupos: S1, PS2, PS3 e PS4 (Matute et al., 2006). Em 2009, Teixeira et al. propuseram uma nova espécie para o gênero, nomeada *P. lutzii*. Atualmente, são descritas cinco espécies capazes de causar doença em humanos: *P. brasiliensis*, *P. restrepienses*, *P. americana*, *P. venezuelensis* e *P. lutzii* (Turissini et al., 2017). O gênero ainda conta com duas espécies não cultiváveis *P. ceti* e *P. loboii*, como revisado por Vilela et al. (2023).

Os fungos desse gênero são organismos termo-dimórficos, isto é, quando em vida livre, a 25°C, possuem forma filamentosa, enquanto no hospedeiro, a 37°C, apresentam-se como levedura (Brummer et al., 1993) (Fig. 1). O gênero *Paracoccidioides* é encontrado no solo, água e plantas, onde vive de forma saprobiótica (Restrepo A., 1985; Brummer et al., 1993; Restrepo et al., 2001). Em termos de classificação, pertencem à família *Ajellomycetaceae* (Ascomyceta), onde estão inclusas outras espécies de relevância clínica como *Blastomyces spp.* e *Histoplasma spp.* (Teixeira et al., 2014).

Figura 1. *P. brasiliensis* em microscopia eletrônica de varredura. À esquerda, a forma filamentosa do patógeno, à direita a forma de levedura.

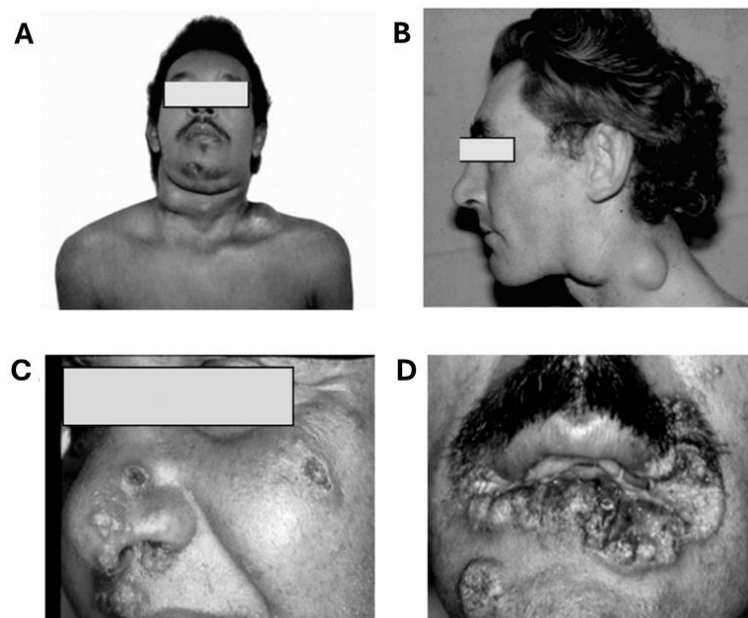


Fonte: Adaptada de Vieira e Silva et al. (1974).

O Brasil é responsável por 80% dos casos reportados de PCM (Restrepo, A., 1985), com prevalência das espécies *P. brasiliensis* e *P. lutzii* (Teixeira et al., 2014), sendo a última a mais encontrada na região Centro-Oeste (Arantes et al., 2016). A PCM incide principalmente sob a população de trabalhadores rurais, pois esses entram em contato com as estruturas infectantes dos patógenos presentes no solo (Hahn et al. 2022). A infecção pode ser adquirida através da inalação de conídios ou fragmentos do micélio (McEwen et al., 1987).

Após o contato com o fungo, a doença pode se manifestar nas formas aguda, subaguda e crônica. As duas primeiras são caracterizadas por uma rápida disseminação através do sistema retículo endotelial. Enquanto na forma crônica, os sintomas levam de meses a anos para se manifestarem. Ainda nesta forma, a doença pode ter caráter unifocal com acometimento apenas do pulmão ou multifocal, com disseminação em outros órgãos e sistemas (Fig.2). Entre 74 e 96% dos casos de PCM são crônicos, com apenas 25% desses sendo unifocais (Borges-Walmsley et al., 2002; Shikanai-Yasuda et al., 2017).

Figura 2. Manifestação aguda e crônica da PCM. Em A e B lesões características da forma aguda da doença, e em C e D, manifestações da forma crônica.



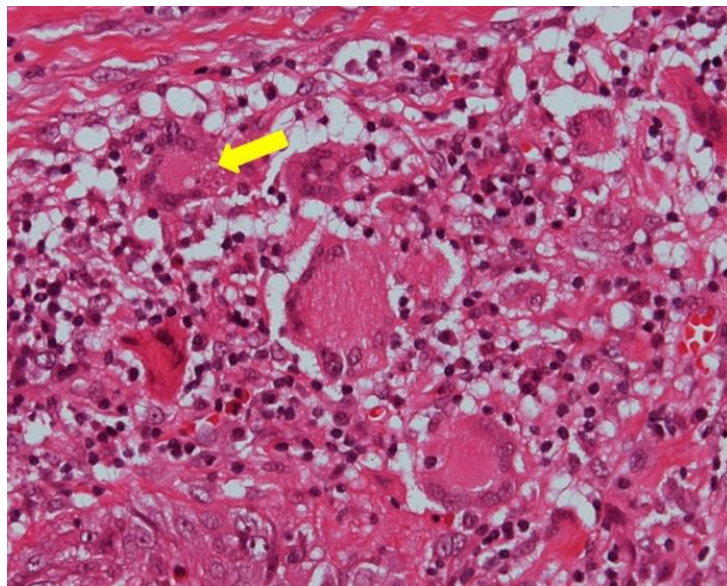
Fonte: Adaptado de Shikanai-Yasuda et al. (2006).

Dessa forma, os sítios primários de instalação do fungo são os pulmões, onde este transita para levedura sob influência da temperatura do corpo humano (San Blas et al., 1993). O sucesso do micro-organismo como patógeno exige mecanismos de evasão da resposta imunológica do hospedeiro (Camacho et al., 2017). O primeiro mecanismo de defesa do organismo é a resposta inata, mediada por células *natural killers* (NK), macrófagos, monócitos e neutrófilos, que, através da ativação do sistema complemento e fagocitose, trabalham na contenção do fungo (Calvi et al., 2003; Soares et al., 2001; Pagliari et al., 2010). Uma vez no interior dos fagócitos, o micro-organismo é mantido em um compartimento denominado fagossomo, que eventualmente, através de uma maquinaria de fusão, se torna o fagolisossomo (Stein et al., 2012; Mao, Y. e Finnemann, S. C., 2015; Jeschke, A. e Haas, A., 2016; Pauwels et al., 2017). Nesse nicho, os patógenos são expostos a um pH ácido, proteases lisossomais,

estresse oxidativo e nitrosativo e limitação nutricional (Appelberg R., 2006; Flannanga et al., 2015).

Já na resposta adaptativa, macrófagos e células dendríticas fazem o processamento do fungo e apresentam os antígenos fúngicos para os linfócitos T. Uma vez ativadas, essas células levam a um perfil de resposta Th1, caracterizado pela produção de TNF- α e IFN- γ . Como resultado, os macrófagos são estimulados a produzir espécies reativas de nitrogênio e oxigênio com o objetivo de inibir o crescimento do patógeno ou matá-lo (Gauthier, G. e Klein, B., 2008). Com o avanço da resposta pode haver formação de um granuloma, uma estrutura nodular composta de células epitelióides, células multinucleadas gigantes (agregação de macrófagos) e exsudato inflamatório (Iabuki et al., 1979; de Camargo et al., 2000), sendo essa uma das características mais expressivas da PCM (Fig. 3).

Figura 3. Granuloma característico de Paracoccidioidomicose. Seta amarela indicando granuloma com presença de fungo.



Fonte: Adaptado de Ikuta et al. (2015).

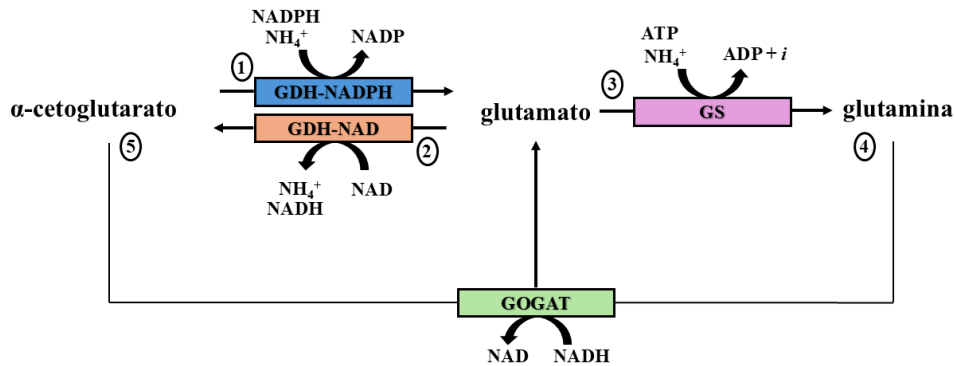
O estilo de vida saprobiótico dos fungos fez com que esses organismos desenvolvessem mecanismos altamente coordenados para se adaptar às mudanças e ao estresse ambiental (Brock M., 2009). No solo, a convivência com amebas predadoras, aliada a competição por nutrientes com outros micro-organismos, criou uma pressão seletiva que contribuiu com a evolução da virulência do patógeno (Albuquerque et al., 2019). Hospedeiros como mamíferos dispõem de estratégias sofisticadas para limitar o acesso dos fungos a nutrientes, entre essas, um processo intitulado imunidade nutricional (Hood, M. I. e Skaar, E. P., 2012). Para assegurar sua viabilidade, os micro-organismos dependem uma grande

quantidade de energia, necessitando, portanto, de macro e micronutrientes para manutenção metabólica (Sprenger et al., 2017).

Em termos de classificação, os nutrientes são divididos em macro e micronutrientes. O primeiro grupo é composto por carbono e nitrogênio, enquanto os micronutrientes, são compostos por íons de metais (Ramachandra et al., 2014). O nitrogênio integra proteínas e ácidos nucleicos, sendo indispensável ao metabolismo dos organismos (Carroll, S. B. e Salt, S. D., 2004). As fontes de nitrogênio são classificadas como preferenciais (primárias), devido a sua rápida metabolização, como amônia, glutamina e glutamato (Marzluf, G. A., 1997), e não preferenciais (secundárias) como prolina e ureia (Schure et al., 1999). O uso de uma molécula como fonte de nitrogênio exige a sua conversão em glutamato e glutamina, esses aminoácidos servem como doadores de nitrogênio para outros compostos que exigem esse nutriente em sua composição (Cooper, T. G., 1982; Wiame et al., 1985; Magasanik, B., 1992).

O glutamato e a glutamina podem ser sintetizados na célula a partir do uso da amônia como doador do grupo amino. A enzima Glutamato Desidrogenase dependente de NADPH (GDH-NADPH) transforma amônia e α -cetogluturato em glutamato (Nagasu et al., 1985). De maneira similar, a produção de glutamina exige que a enzima Glutamina Sintetase (GS) use glutamato ou amônia como substrato (Mitchell, A. P. e Magasanik, B., 1983; Mitchell, A. P. e Magasanik, B., 1984). A representação dessas reações pode ser observada na Fig. 4. Além disso, esses aminoácidos podem ser assimilados diretamente pelo fungo, quando disponíveis no ambiente (Magasanik, B., 1992) através das mesmas vias mencionadas anteriormente (Roon et al., 1974; Cogoni et al., 1995). As fontes não preferenciais como prolina e ureia também são convertidas à glutamato e amônia, respectivamente (Cooper, T. G., 1982).

Figura 4. Via de interconversão de α -cetogluturato, glutamato, glutamina e amônia. As setas indicam a direção das reações. 1) α -cetogluturato é convertido em glutamato através da enzima Glutamato Desidrogenase dependente de NADPH (GDH-NADPH), que utiliza amônia no processo. 2) Glutamato é degradado em α -cetogluturato e amônia através da Glutamina Desidrogenase dependente de NAD (GDH-NAD). 3) Glutamato pode ser convertido em glutamina através da Glutamina Sintetase (GS), com a incorporação de amônia e o gasto de ATP. 4; 5) Glutamina e α -cetogluturato são convertidos em glutamato pela ação da enzima Glutamato Sintetase (GOGAT).



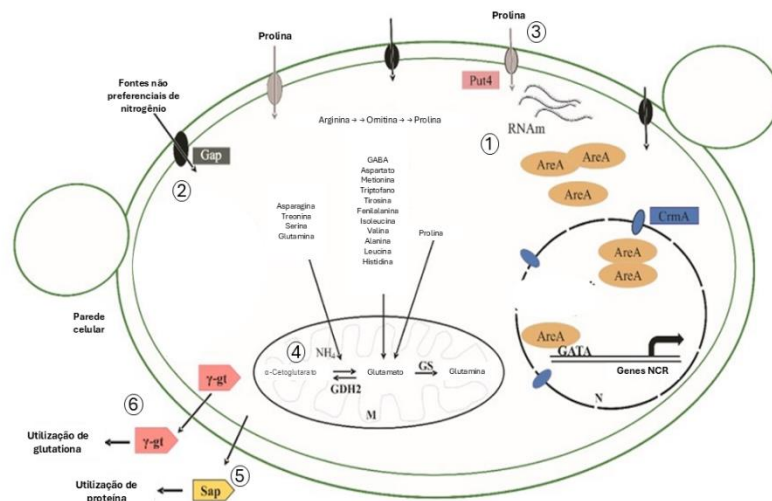
Fonte: Adaptado de ter Schure et al. (2000).

No tocante ao metabolismo de nitrogênio, os fungos patogênicos possuem uma maquinaria sensível para o reconhecimento e distinção de fontes de nitrogênio, bem como, para sua assimilação (Broach, J., 2012). A Repressão Catabólica de Nitrogênio (RCN) foi descrita pela primeira vez por Hynes, M. J. (1970) em *Aspergillus nidulans*. Atualmente, é bem estabelecida em diferentes modelos como *Saccharomyces cerevisiae* (Cooper, T. G. e Sumrada, R. A; 1983), *Candida albicans* (Limjindaporn et al., 2003), *Neurospora crassa* (Fu, Y. F. e Marzluf, G. A; 1986), *Cryptococcus neoformans* (Lee et al., 2011). No gênero *Paracoccidioides spp.*, a RCN tem sido foco de investigações do nosso grupo de pesquisa através dos trabalhos conduzidos por Cruz-Leite (2020) e Silva et al. (2022).

Como revisado por Ries et al. (2017), a RCN é um mecanismo pelo qual o fungo assimila fontes de nitrogênio não preferenciais disponíveis no ambiente. Através de uma fina cascata de sinalização, fatores de transcrição e enzimas necessárias à captação dessas fontes podem ser codificados. A regulação desse processo é feita por fatores de transcrição da família GATA (Arst and Cove, 1973; Kudla et al., 1990), que através de um domínio dedo de zinco reconhecem a sequência consenso HGATAR contida na região promotora de genes RCN-sensíveis (Kudla et al., 1990; Ravagnani et al., 1997). Em *S. cerevisiae* são descritos dois reguladores positivos *Gln3* e *Gat1* (Hofman-Bang J., 1999), em *N. crassa*, *Nit-2* (Fu et al., 1987), em *C. albicans*, *Gat1* (Limjindaporn et al., 2003) em *A. nidulans* e *Paracoccidioides spp.*, *AreA* (Kudla et al., 1990; Cruz-leite et al., 2020).

Por sua vez, os fatores *AreA* de *A. nidulans* e *Nit-2* de *N. crassa* são encontrados em níveis basais na célula, quando em suficiência de nitrogênio (Platt et al., 1996; Feng et al., 1998). O *AreA* é sujeito a autorregulação. Durante a RCN, o mRNA *areA* tem a estabilidade aumentada, o que leva a sua tradução. O fator de transcrição é transportado ao núcleo pela exportina nuclear *CrmA*, onde promove a transcrição do gene *areA*, contribuindo assim com elevação dos seus níveis. Paralelamente, esse fator de transcrição também promove a transcrição de outros genes RCN-sensíveis (Todd et al. 2005). Através de análises *in silico*, Cruz-Leite et al. (2020) demonstraram que o gênero *Paracoccidioides* apresenta 22 proteínas relacionadas à RCN homólogas a organismos onde esse mecanismo é bem descrito, entre elas *AreA* (PAAG_04476) e *Gap* (PAAG_09034). A Permease Geral de Aminoácidos (*Gap1*) transporta aminoácidos não preferenciais (Ter Schure et al., 2000). Em *S. cerevisiae* essa proteína é regulada por *Gln3* e *Gat1*, sua expressão e acúmulo na membrana plasmática ocorre quando o fungo está sob condição de RCN, conforme revisado por Kriel et al. (2011). A avaliação da expressão do gene *Gap* também foi demonstrada por Cruz-Leite et al. (2020) como marcador de RCN em *P. lutzii*, sugerindo um período de regulação de 48 horas. Nesse mesmo estudo, os autores ainda propuseram um modelo de RCN para *P. lutzii*, baseado em suas análises *in silico* (Fig. 5).

Figura 5. Repressão Catabólica de Nitrogênio em *P. lutzii*. 1) Na condição de RCN, o mRNA *AreA* passa a ser mais estável, o que leva a sua tradução no citoplasma. Após esse processo, a exportina *CrmA* transporta o fator de transcrição *AreA* para dentro do núcleo, onde esse estimula a expressão de genes RCN-sensíveis. 2) A proteína *Gap* é responsável por internalizar os aminoácidos não preferenciais disponíveis no ambiente. 3) Paralelamente, o transporte de prolina ocorre pela proteína *Put4* (Permease Prolina- específica). 4) Uma vez internalizados, os aminoácidos são convertidos em glutamato, glutamina e amônia para serem utilizados pela célula. 5) A enzima *Sap* está relacionada com a utilização de proteína, enquanto 6) γ -glutamil transpeptidase (γ -gt) com a utilização de glutatona.



Fonte: Adaptado de Cruz-Leite (2020).

No contexto de fungos termo-dimórficos, Mendes-Giannini et al. (2008) definiram fatores de virulência como produtos de genes que tem efeito na sobrevivência e crescimento do patógeno no hospedeiro. Nessa linha, a parede celular desses organismos tem sido relatada como um desses fatores, o que já foi descrito por San-Blas et al. (1977), Marion et al. (2006) e Camacho et al. (2012). A parede celular de fungos do gênero *Paracoccidioides* é composta por proteínas, lipídeos (Santos et al., 2020) e polissacarídeos, principalmente quitina (N-acetilglicosamina) e glicanos (Arantes et al., 2015). O percentual desses componentes varia de acordo com a morfologia que o fungo assume. Quando levedura, a parede celular é composta majoritariamente por carboidratos. Em contrapartida, na forma de micélio possui apenas 51% de polissacarídeos em sua composição (Puccia et al., 2016). Essa estrutura contribui com a adaptação do patógeno ao estresse ambiental, desempenhando um papel importante na interação com o hospedeiro (Hopke et al., 2018). Em *H. capsulatum* foi demonstrado que o fungo tem a capacidade de mascarar o β - (1,3) - glicano, conteúdo imunogênico, através da expressão de α - (1,3) - glicano (Rappleye et al., 2007), o mesmo foi observado por Felipe et al. (2005) em *Paracoccidioides spp.* Além disso, os fatores de transcrição GATA e a RCN também tem sido alvo de estudos de virulência (Hensel et al., 1998; Langdon et al., 1995; Limjindaporn et al., 2003; Kmetzsch et al., 2011) no gênero *Paracoccidioides*, contudo, essas relações ainda não são bem descritas. Dado o papel bem estabelecido dos fatores GATA na RCN em outros organismos modelo, é plausível inferir que o fator *AreA* em *P. lutzii* desempenhe um papel importante na assimilação de fontes de nitrogênio. Consequentemente, essa relação pode impactar significativamente a compreensão da biologia e da virulência deste patógeno.

2 JUSTIFICATIVA

A Paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença endêmica de áreas subtropicais da América Latina com alta prevalência na Colômbia, Venezuela, Argentina e Brasil, onde este responsável por 80% dos casos reportados, segundo revisado por Texeira et al. (2014). Contrariando a emergência denunciada pelos dados epidemiológicos da América Latina, o gênero *Paracoccidioides* foi categorizado como média prioridade na Lista de Prioridade de Patógenos Fúngicos da Organização Mundial de Saúde de 2022. Pensando no contexto brasileiro, a PCM é classificada como doença de notificação compulsória apenas em alguns estados, visto que no país, as micoses sistêmicas não compõem a lista nacional de doenças e agravos de notificação compulsória (Millington et al., 2018).

Ações eficazes de enfrentamento à PCM devem ser respaldadas na compreensão da biologia do patógeno e dos seus mecanismos de patogenicidade. Em *C. albicans*, foi observado que mutantes com deleção do fator GATA *Gat1* apresentaram virulência atenuada em modelos murinos de candidíase disseminada (Limjindaporn et al., 2003). Similarmente, a deleção de *areA* em *A. fumigatus* também levou a uma infecção atenuada em modelo *in vitro* de aspergilose pulmonar (Hensel et al., 1998), enquanto em *C. neoformans*, a deleção de *gat1* não afetou a virulência em um modelo murino de criptococose pulmonar. Contudo, a deleção desse fator levou o fungo à incapacidade de crescer em algumas fontes não preferenciais (Kmetzsch et al., 2011), o que também foi observado por Langdon et al. (1995) com a deleção de *areA* em *A. fumigatus*.

A homologia proposta por Cruz-Leite et al. (2020), através de análises *in silico*, entre os fatores *AreA* de *A. nidulans* e *P. lutzii* aponta para a similaridade não só estrutural que esses fatores podem ter, mas também funcional. A RCN, assim como o papel desse fator GATA, ainda não é bem estabelecida em *Paracoccidioides spp.*, porém, têm sido alvo de investigação por autores como Silva et al. (2022) e Cruz-Leite (2023). Estudos em cepa de *P. lutzii* silenciada com tecnologia anti-sentido para o gene *areA* devem contribuir com a melhor elucidação desse mecanismo no gênero e uma compreensão mais clara da biologia e virulência deste patógeno.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Investigar o impacto do silenciamento do gene *areA* na assimilação de fontes de nitrogênio e biologia de *P. lutzii*, comparando cepas mutante e selvagem cultivadas em diferentes concentrações de glutamina.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar expressão dos alvos gênicos selecionados na cepa mutante e selvagem, quando cultivados em fonte preferencial (glutamina) e não preferencial (prolina);
- Comparar o crescimento das cepas em meio mínimo suplementado com 10 mM e 60 mM de glutamina, seguida de análise de viabilidade celular;
- Estimar composição de parede celular das cepas de *P. lutzii* cultivadas em 10 mM e 60 mM de glutamina;
- Analisar tamanho das células do selvagem e mutante em glutamina à 10 mM e 60 mM;

4 METODOLOGIA

4.1 Manutenção das cepas mutante e selvagem

A cepa mutante de *P. lutzii* As-AreA foi mantida em meio *Brain Heart Infusion* (BHI) sólido (Kasvi) 1,1% (m/v) de glicose com Higromicina B 75 µg/ml (Sigma Aldrich), para manutenção da pressão de seleção, enquanto a selvagem, foi cultivada em BHI sólido (Kasvi) 2% (m/v) de glicose (Sigma Aldrich). Ambas as colônias foram mantidas à temperatura de 37°C ao abrigo da luz.

4.2 Análise de expressão gênica

As cepas foram cultivadas em BHI caldo (Kasvi) 4% (m/v) de glicose (Sigma Aldrich) por 48 horas à 37 °C, sob agitação de 150 rpm. Em seguida, foram transferidas para o YNB (Sigma Aldrich) 2% (m/v) de glicose (Sigma Aldrich) suplementado diferencialmente com 10 mM (m/v) de prolina (Sigma Aldrich) e 10 mM (m/v) de glutamina (Sigma Aldrich). A partir desses cultivos, extraiu-se RNA total pela metodologia de tiocianato de guanidina (*TRI Reagent*, Sigma Aldrich). A transcrição reversa foi realizada com o kit *M-MLV reverse transcriptase* (Sigma Aldrich). Em seguida, o cDNA foi quantificado utilizando o kit *SYBER Green PCR master mix* (Thermo Fisher) em um termociclador QuantStudio 5' (Applied Biosystems). Para a qPCR, cada amostra foi utilizada em triplicata. Os genes analisados foram *Gap1* (PAAG_09034) e *AreA* (PAAG_04476). Os dados foram normalizados usando o gene tubulina (PAAG_03532) como controle endógeno, e são apresentados como expressão relativa.

4.3 Curva de crescimento e viabilidade

As cepas foram cultivadas por 48 horas em BHI caldo (Kasvi) suplementado com 4% (m/v) de glicose (Sigma Aldrich), à 37 °C sob agitação de 150 RPM. Em seguida, foram transferidas ao meio mínimo *Yeast Nitrogen Base* (YNB) (Sigma Aldrich) 2% (m/v) de glicose (Sigma Aldrich), suplementado diferencialmente com 10 mM (m/v) e 60 mM (m/v) de Glutamina (Sigma Aldrich) à 37 °C, sob agitação de 150 RPM. Em cada condição, as cepas foram cultivadas em triplicata. A curva de crescimento em BHI também foi feita nas condições de inóculo mencionadas no início. A densidade ótica do meio foi mensurada através de espectrofotometria (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech), em um comprimento de onda de 600 nm, nos tempos de 0, 12, 24 e 48 horas. Em 48 horas, a análise de viabilidade das células foi feita utilizando 1 µg/ml (m/v) de Iodeto de Propídio (Sigma Aldrich), com posterior visualização em microscópio de fluorescência (Axiocam MRc-Scope A1, Carl Zeiss).

4.4 Análise de composição de parede celular e tamanho celular

A análise foi realizada através do método de Branco de Calcoflúor (CFW) (Sigma Aldrich). As células dos inóculos em BHI e YNB 10 mM e 60 mM foram fixadas com metanol 100% (Sigma Aldrich) à -80 °C durante 40 minutos, seguidos de 20 minutos à -20 °C. Após isso, as células foram lavadas com PBS e levadas à incubação com 100 µg/ml (m/v) de CFW por 30 minutos. Em seguida, foram lavadas novamente com PBS e levadas ao microscópio de fluorescência (AxioCam MRc-Scope A1, Carl Zeiss). A análise das imagens geradas foi efetuada pelo software *FIJI* (Schindelin et al., 2012) através de quantificação de intensidade de pixels da área correspondente a cada célula.

4.5 Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software *GraphPad Prism8* v.8.0.1. Os dados foram previamente submetidos ao teste Shapiro-Wilk com o objetivo de avaliar a sua normalidade. Para a curva de crescimento, a Correlação de Pearson foi empregada com um intervalo de confiança de 95%. Os dados da análise de composição de parede e tamanho celular foram submetidos ao teste não paramétrico Mann-Whitney. Todos os testes foram considerados significativos para $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

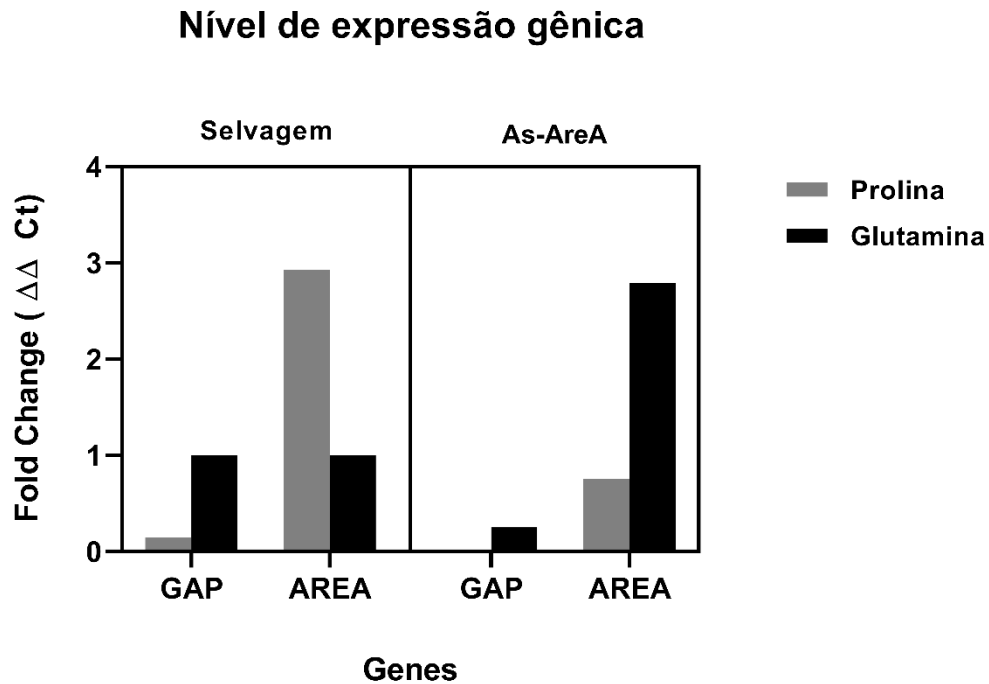
5.1 Análise de Expressão Gênica Relativa de *AreA* e *Gap1*

O gene *Gap1* codifica uma enzima que transporta aminoácidos para a célula fúngica (Ter Schure et al., 2000). Em *S. cerevisiae*, a análise desse gene tem sido utilizada como um marcador de RCN, visto que, o aumento de sua expressão está relacionado com a presença de fontes secundárias no ambiente, conforme revisado por Kriel et al. (2011). Sob condição de RCN, *Gap1* é altamente expresso, acumulando-se na membrana celular, criando um sistema eficiente e de alta afinidade para a captação de aminoácidos (Jauniaux, J. C. e Grenson, M., 1990). Em contrapartida, na presença de fontes primárias, a expressão desse gene é reprimida (Jauniaux, J. C. e Grenson, M., 1990; Stanbrough, M. e Magasanik, B., 1996). De acordo com Cruz-Leite et al. (2020), *Gap1* pode também ser utilizado como marcador de RCN em *Paracoccidioides spp.* Os autores observaram que, após 48 horas, a expressão do gene *Gap1* variou entre fonte preferencial (glutamina) e não preferencial (prolina), sendo mais expressiva nessa condição. Contudo, nas análises do presente trabalho esse gene demonstrou ser mais expresso em glutamina, tanto na cepa selvagem quanto mutante (Fig. 6).

O transporte de glutamina em *S. cerevisiae* é realizado por duas proteínas, *Gnp1* e *Agp1*, expressas tanto em fontes primárias como secundárias de nitrogênio (Zhu et al., 1996; Schreve et al., 1998). A presença desse aminoácido no meio intracelular é sinalizada pela proteína *Ure2p*, que impede que *Gln3* ative a expressão de genes essenciais a captação de fontes não preferenciais (Courchesne, W. E. e Magasanik, B., 1983). Georis et al. (2022) propõem que essa repressão é ocasionada pela atividade da permease *Agp1*, uma vez que, o influxo de H^+ gerado pelo transporte acoplado de glutamina deve levar a ativação de TORC1 (Saliba et al., 2018). Nessas mesmas condições, essa proteína interage diretamente com a quinase *Npr1*, responsável por regular negativamente a endocitose na célula. Esse processo leva a ubiquitinação de *Gap1*, na membrana celular, seguida de internalização e degradação dessa enzima (Merhi et al., 2012; Ghaddar et al., 2014). Uma análise de predição gênica em *A. nidulans* mostrou que esse organismo possui 19 genes para transportadores dessa família de permeases (Apostolaki et al., 2012), sendo o transportador de aminoácidos, *AgtA*, e de prolina, *PrnB*, bem caracterizados (Sophianopoulou, V. e Scazzocchio, C., 1989; Tazebay et al., 1995; Tavoularis et al., 2003; Apostolaki et al., 2009; Vangelatos et al., 2009). Baseado na literatura, o caminho sugerido para compreender a expressão atípica do gene *Gap* em glutamina observada no presente trabalho, é o transporte desse aminoácido, bem como, a sua cascata de sinalização, o que ainda não é bem

esclarecido em *P. lutzii*. Uma análise refinada de novos alvos gênicos pode ajudar na compreensão dessas vias.

Figura 6. Análise de Expressão Gênica. Os genes analisados na condição de prolina estão representados em cinza, enquanto na cor preta, glutamina. É possível visualizar a expressão dos genes *gap* e *areA*, nas respectivas condições analisadas. À esquerda, a expressão do selvagem e ao lado direito a expressão do mutante.



Fonte: Elaborada pelo autor (2024).

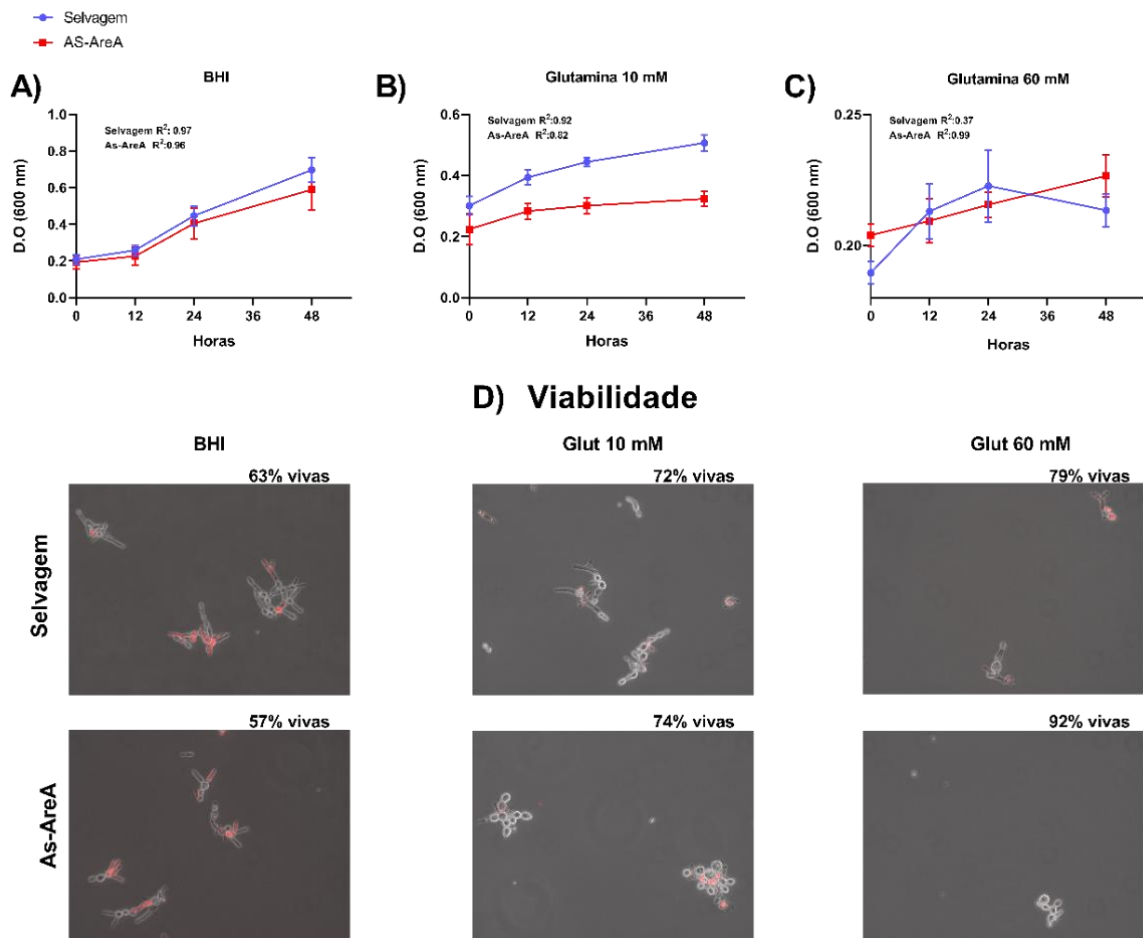
A respeito, do gene *areA*, a expressão foi maior no selvagem em meio suplementado com prolina. Curiosamente, na cepa mutante As-AreA, o maior nível de expressão foi registrado em glutamina (Fig. 6). O gene *areA* de *A. nidulans* é expresso na célula em níveis basais (Platt et al., 1996; Feng et al., 1998), o aumento de sua expressão é consequência da disponibilidade de fontes secundárias no ambiente (Todd et al., 2005). Além da via TOR, a glutamina sintetase (GS) também é descrita como importante para sinalização de nitrogênio na célula. Alterações de cunho genético ou químico nessa enzima foram responsáveis por de- reprimir genes de RCN em *N. crassa* e *S. cerevisiae*, quando cultivados em amônia e glutamato (Calderón et al., 1990; Crespo et al., 2002). Em *F. fujikuroi* a deleção de *areA* levou à diminuição dos níveis de GS. Já em uma cepa com deleção de *glnI* (gene que codifica GS), *areA* foi altamente regulado positivamente, quando em glutamato e amônia. Contudo, a glutamina demonstrou ser detectada por um mecanismo desconhecido independente dessa proteína, o que levou a regulação negativa de *areA* (Wagner et al., 2013). Na corrente sanguínea, a glutamina é encontrada em uma

concentração de 0.5 a 0.7 mM (D' Souza, R. e Tuck, J. P.; 2004). Em seus trabalhos com *A. nidulans*, Hynes, M. J. (1975) determinou que fontes de nitrogênio à 10 mM são a concentração ideal para os trabalhos de metabolismo. Atualmente, a maioria dos estudos como visto em Coffman et al. (1995) mantém essa concentração mínima estabelecida. Contudo, em *F. fujikuroi* Wagner et al. (2013) e Pfanmüller et al. (2016) trabalharam com 6 mM desse aminoácido como limite mínimo e estabeleceram 60 mM como condição de suficiência. Dito isso, muitos aspectos do metabolismo de nitrogênio no gênero *Paraccocidioides* ainda estão sob constante estudo. Para investigar a expressão atípica de *areA* em cepa mutante de *P. lutzii*, o crescimento do fungo, a parede e o tamanho celular foram avaliados em concentrações distintas de glutamina.

5.2 Curva de crescimento e viabilidade

Em meio BHI, empregado como controle, as cepas seguiram o mesmo padrão de crescimento. Os dados foram considerados estatisticamente relevantes, isto é, ambas as curvas possuem uma correlação significativa entre eixo X (horas) e Y (Densidade Ótica). O valor de R^2 próximo a 1 indica que os dados se ajustam bem ao modelo de regressão adotado. No tocante a glutamina à 10 mM, o R^2 de ambas as cepas ficou próximo ao valor de 1, contudo o crescimento do selvagem foi o único com relevância estatística. Contrariamente, em 60 mM, apenas a curva do mutante foi estatisticamente relevante. O valor de R^2 do selvagem próximo a 0, sugere que os dados não podem ser explicados pela análise adotada. Em relação a viabilidade, nas três condições experimentais, selvagem e mutante apresentaram mais de 50% das células vivas (Fig. 7).

Figura 7. Curvas de crescimento e viabilidade. A distribuição dos dados foi analisada pelo teste Shapiro-Wilk, que demonstrou que os dados apresentam distribuição gaussiana. Para a análise estatística, a Correlação de Pearson foi empregada, com um intervalo de confiança de 95%. A) As cepas demonstraram ser estatisticamente relevantes, e apresentaram o mesmo padrão de crescimento. B) O crescimento do selvagem variou em relação ao tempo (eixo X), já o mutante, não apresentou relevância estatística. C) O oposto foi observado na curva de glutamina 60 mM, a cepa mutante foi a única estatisticamente relevante. Em D) é possível analisar a viabilidade das cepas feita no ponto de 48 horas.



Fonte: Elaborada pelo autor (2024).

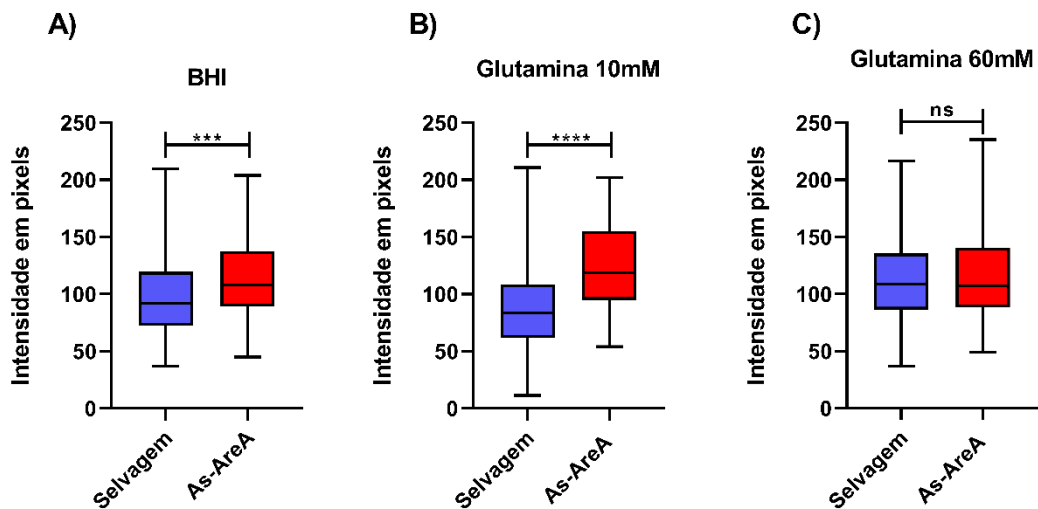
Em *C. albicans*, a perda de função de *gat1* levou ao crescimento normal do fungo em fontes preferenciais, incluindo glutamina (Limijindaporn et al., 2003). Em consonância, observou-se o mesmo em mutantes de *A. nidulans* e *N. crassa*, a ausência desses fatores GATA impactaram o comportamento dos fungos apenas em fontes secundárias (Langdon et al., 1995; Facklam, T. J. e Marzluf, G. A, 1978). Um estudo realizado com cepa de *C. neoformans* com deleção de *gat1* também demonstrou que o fungo estava apto a utilizar uma gama de fontes preferenciais (Lee et al., 2011), o que já é bem estabelecido para o organismo *S. cerevisiae* cultivado em glutamina (Cooper, T. G. & Sumrada, R. A; 1983). Não foi possível atribuir qualquer diferença estatística observada nas curvas de crescimento do presente trabalho (Fig. 7) à concentração variável de glutamina no meio. Para além disso, os dados não permitem traçar um padrão de comportamento das cepas estudadas. A realização de qualquer conclusão biológica exige que novos experimentos sejam realizados sob mais condições de cultivo que permitam explorar melhor esses dados.

5.3 Composição de parede celular e tamanho

O Branco de Calcoflúor (CFW) estabelece pontes de hidrogênio orientadas com a estrutura das microfibrilas de quitina, dessa forma, o fluoróforo consegue indicar topologicamente a presença desse polissacarídeo (Herth, W. e Schnepf, E., 1980; Herth, W., 1980). Como resultado, em meio rico (controle), a quantificação de pixels da área correspondente a cada célula demonstrou ser distinta entre as duas cepas, sendo mais expressiva em As-AreA. A análise estatística empregada confirmou que os dados são estatisticamente significativos. Foi possível observar o mesmo em glutamina 10 mM, onde a diferença entre selvagem e mutante foi ainda mais expressiva. Na condição de 60 mM, a mediana entre os dois grupos comparados apresentou valores muito próximos, além disso, não foi detectada diferença significativa entre as cepas (Fig. 8). A quitina é um polímero composto por cadeias de β -(1,4) N-acetil- D- glicosamina e integra a parede celular de fungos e o esqueleto de artrópodes, conferindo rigidez e integridade estrutural (Cohen, E.,1993; Pillai et al.,2009; Cohen, E., 2010). O conteúdo desse polissacarídeo na parede celular do fungo varia de acordo com a morfologia do organismo, quando levedura, ele representa mais da metade do peso seco da célula de *P. brasiliensis* (Niño-Vega et al., 2000). A β -1,3- glicana é outra classe de polissacarídeos abundante nessa estrutura fúngica (Arantes et al., 2015), a sua substituição por α - 1,3- glicana é relacionada com a redução de virulência em *Paracoccidioides spp.* (San-Blas et al., 1977), em *H. capsulatum* isso já foi registrado por Rappleye et al. (2007). Em *C. albicans*, uma cepa mutante com deficiência em quitina também apresentou virulência atenuada (Bulawa et al., 1995). É um fato que a mudança na composição e arranjo espacial da parede celular pode assegurar a sobrevivência do patógeno no hospedeiro (Puccia et al., 2016). Um estudo feito por Cruz-Leite et al. (2023) demonstrou que *P. lutzii* sob condição de RCN (prolina) apresentava mais conteúdo de quitina na parede celular, quando comparado com o cultivo a 10 mM de glutamina. Entretanto, nas análises do presente trabalho, sob essa última condição, a cepa As-AreA indicou maior conteúdo desse carboidrato. O remodelamento de parede já demonstrou ser um processo que ocorre em resposta as condições ambientais, e permite a adaptação do fungo as mesmas (Brown et al., 2014). A diferença observada em meio rico entre mutante e selvagem traz novas indagações, uma vez que, o silenciamento do gene *areA*, de acordo com a literatura, traz alterações biológicas quando o fungo está exposto a fontes não preferenciais (Langdon et al., 1995; Lee et al., 2011). Contudo, a cepa mutante utilizada nesse estudo ainda não foi propriamente caracterizada. Quanto a análise em glutamina 10 mM, os resultados apresentados até agora são suficientes apenas para sugerir novas análises que tenham enfoque em explorar a relação entre glutamina e o fator de transcrição GATA *AreA* de *P. lutzii* nessa concentração. Em glutamina 60 mM, os dados mostram que as cepas apresentam a mesma quantidade de quitina

em sua parede, o que pode sugerir que ambos estão processando essa condição nutricional da mesma maneira.

Figura 9. Análise de composição celular. Os dados foram plotados no *GraphPad Prism 8.0.1*. A distribuição dos dados analisada pelo teste Shapiro-Wilk revelou que esses não possuem distribuição normal, por isso foram submetidos ao teste não paramétrico Mann-Whitney. Para o n de cada grupo foram inseridas 100 amostras. O valor de p adotado para análise foi $p < 0.05$. No gráfico A), os grupos apresentaram valores de mediana distintos, o valor de $p = 0.0001$ (***) indicou diferença estatística. Em B), a mediana do selvagem ficou em torno de 83.58, o mutante apresentou um valor de 118.9. O valor de $p < 0.0001$ (***). Em C) as medianas dos grupos ficaram muito próximas numericamente, o valor de $p = 0.8592$ demonstrou que as cepas não apresentam diferença significativa.

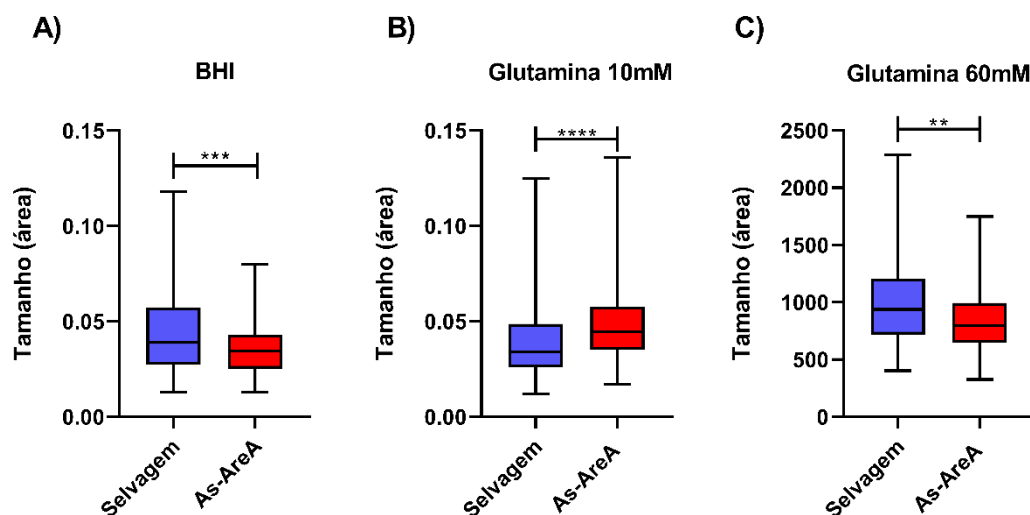


Fonte: Elaborada pelo autor (2024).

Na análise de tamanho celular, foi possível observar em BHI que selvagem e mutante apresentaram diferença significativa de valores, o que indica que as cepas possuem tamanho distintos, sendo *As-AreA* menor. Também foi possível verificar o mesmo padrão em glutamina 60 mM. Contrariamente, na concentração a 10 mM, o mutante demonstrou ser maior que o selvagem (Fig. 9). Os fungos possuem uma organela denominada vacúolo, que é responsável por manter a homeostase, reciclar e degradar componentes celulares, transportar nutrientes, guardar metabólitos e regular o crescimento (Klionsky et al., 1990; Li, S. C. e Kane, P. M. 2009; Veses et al., 2008; Weber, R. W. S., 2002). Essa estrutura já demonstrou ser importante para a viabilidade celular, a quantidade em que são encontrados na célula, bem como, o seu tamanho são uma resposta a estímulos externos e internos (Banta et al., 1998; Cakar et al., 2000). Em determinados cenários essas organelas podem se fundir, levando a formação de vesículas que ocupam uma fração grande do volume da célula (Richards et al., 2010). A limitação nutricional

é um dos fatores que pode levar a ocorrência desse fenômeno (Aufschnaiter, A. e Buttner, S., 2019). Retomando o que foi dito acima, o mutante utilizado nesse trabalho ainda está sob processo de caracterização. A diferença de tamanho entre As-AreA e selvagem, em BHI, sugere que o silenciamento de *areA* seja o motivo, já que, essa é a diferença a nível genômico existente entre a cepas. O processo de construção de um organismo mutante pode levar o fungo a expressar características morfológicas distintas do que é padronizado para o selvagem (Heilmann et al., 2013). Em glutamina 60 mM, o mesmo padrão observado reforça a ideia de que, de fato, a célula do mutante seja menor. Contudo, em glutamina 10 mM, As-AreA mostrou-se maior que o selvagem. Os achados na avaliação do gene *areA* e análise de composição de parede corroboram a hipótese de que glutamina 10 mM não seja a concentração adequada para que uma condição de suficiência seja mimetizada. Adicionalmente, considerando que o fungo está submetido à estresse nutricional, o aumento interno de vacúolos, aliado ao remodelamento de parede seriam um caminho para compreensão desse dado.

Figura 10. Tamanho celular. A distribuição anormal dos dados indicada pelo teste Shapiro-Wilk, levou os grupos a serem comparados através do teste Mann-Whitney. O n amostral de cada grupo foi composto por 100 amostras. O valor de p adotado para análise foi $p < 0.05$. No gráfico A), a mediana de cada grupo foi distinta numericamente, o valor de $p = 0.0082$ (**) indicou diferença estatística. Em B), o valor de p foi menor que 0.0001 (****), e novamente a mediana de cada grupo permaneceu discrepante. Em C) o padrão de mediana com valores diferentes se manteve, o valor de $p = 0.0043$ (**). O mutante e o selvagem foram estatisticamente diferentes nas três condições experimentais empregadas.



Fonte: Elaborada pelo autor (2024).

6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho sugerem que a cepa mutante de *P. lutzii* silenciada com tecnologia anti-sentido para o gene *areA*, quando cultivada em 10 mM de glutamina, apresenta uma resposta biológica diferente do que está descrito na literatura para outros fungos. É importante ressaltar que os estudos de metabolismo de nitrogênio no gênero *Paracoccidioides* são pequenos quando comparados ao volume de material que se tem para organismos como *S. cerevisiae*. Os dados aqui apresentados ainda são iniciais para descrever o mecanismo de uma resposta, contudo, orientam o caminho que deve ser traçado para novas investigações. A análise da expressão de novos alvos gênicos, bem como, a avaliação do perfil proteômico nas três condições aqui abordadas podem ajudar na identificação de fatores que são importantes para a melhor compreensão do papel que o *AreA* desempenha em *P. lutzii*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albuquerque, P.; Nicola, A. M.; Magnabosco, D.A.G, et al. **A hidden battle in the dirt: Soil amoebae interactions with *Paracoccidioides* spp.** *Neglected Tropical Diseases*, Plos, v. 13, n. 10, 2019.
- Apostolaki, A.; Erpapazoglou, Z.; Harispe, L.; Billini, M.; Kafasla, P.; Kizis, D.; et al. **AgtA, the dicarboxylic amino acid transporter of *Aspergillus nidulans*, is concertedly down-regulated by exquisite sensitivity to nitrogen metabolite repression and ammonium-elicited endocytosis.** *Eukaryot Cell*, v. 8, p. 339–352, 2009.
- Apostolaki, A.; Harispe, L.; Calcagno-Pizarelli, A.M.; Vangelatos, I.; Sophianopoulou, V.; Arst Jr., H.N.; Peñalva, M.A.; Amillis, S.; Scazzocchio, C. ***Aspergillus nidulans* CkiA is an essential casein kinase I required for delivery of amino acid transporters to the plasma membrane.** *Molecular Microbiology*, v. 84, n. 3, p. 530–549, 2012.
- Appelberg, R. **Macrophage nutritive antimicrobial mechanisms.** *Journal of Leukocyte Biology*, v. 79, n. 6, p. 1117-1128, 2006.
- Arantes, T.D.; Bagagli, E.; Niño-Vega, G.; San-Blas, G.; Theodoro, R.C. ***Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii*: a secret love affair.** *Rev Inst Med Trop São Paulo*, v. 57, Suppl. 1, p. 25–30, 2015.
- Arantes, T.D.; Theodoro, R.C.; Teixeira, M.M.; et al. **Environmental mapping of *Paracoccidioides* spp. in Brazil reveals new clues into genetic diversity, biogeography and wild host association.** *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 4, 2016.
- Arst, H.N. Jr.; Cove, D.J. **Nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*.** *Mol Gen Genet*, v. 126, p. 111–141, 1973.
- Aufschnaiter, A.; Buttner, S. **The vacuolar shapes of ageing: From function to morphology.** *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.*, v. 1866, p. 957–970, 2019.
- Banta, L. M., Robinson, J. S., Klionsky, D. J., Emr, S. D. **Organelle assembly in yeast: characterization of yeast mutants defective in vacuolar biogenesis and protein sorting.** *The Journal of Cell Biology*, v. 107, p. 1369–1383, 1988.
- Borges-Walmsley, M.I.; Chen, D.; Shu, X.; Walmsley, A.R. **The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*.** *Trends in Microbiology*, v. 10, n. 2, p. 80-87, 2002.
- Brock, M. **Fungal metabolism in host niches.** *Current Opinion in Microbiology*, v. 12, n. 4, p. 371-376, 2009.
- Broach, J.R. **Nutritional control of growth and development in yeast.** *Genetics*, v. 192, p. 73-105, 2012.
- Brown, A. J. P.; Budge, S.; Kaloriti, D.; Tillmann, A.; Jacobsen, M. D.; Yin, Z.; Ene, I. V.; Bohovych, I.; Sandai, D.; Kastora, S.; Potrykus, J.; Ballou, E. R.; Childers, D. S.; Shahana, S.; Leach, M. D. **Stress adaptation in a pathogenic fungus.** *The Journal of Experimental Biology*, v. 217, p. 144-155, 2014.
- Brummer, E.; Castañeda, E.; Restrepo, A. ***Paracoccidioidomycosis*: An update.** *Clinical Microbiology Reviews*, v. 6, n. 2, p. 89-117, 1993.
- Bulawa, C. E., Miller, D. W., Henry, L. K., and Becker, J. M. **Attenuated Virulence of Chitin-Deficient Mutants of *Candida albicans*.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 92, n. 23, p. 10570-10574, 1995.

- Cakar, Z. P., Sauer, U., Bailey, J. E., Muller, M., Stolz, M., Wallimann, T., Schlattner, U. **Vacuolar morphology and cell cycle distribution are modified by leucine limitation in auxotrophic *Saccharomyces cerevisiae*.** *Biology of the Cell*, v. 92, p. 629–637, 2000.
- Calderón, J.; Martínez, L.M.; Mora, J. **Isolation and characterization of a *Neurospora crassa* mutant altered in the alpha polypeptide of glutamine synthetase.** *J. Bacteriol.*, v. 172, p. 4996–5000, 1990.
- Calvi, S.A.; Peraçoli, M.T.; Mendes, R.P.; et al. **Effect of cytokines on the in vitro fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients.** *Microbes and Infection*, v. 5, n. 2, p. 107-113, 2003.
- Camacho, E.; Niño-Vega, G.A. **Paracoccidioides spp.: Virulence factors and immune-evasion strategies.** *Mediators of Inflammation*, v. 2017, p. 5313691, 2017.
- Camacho, E.; Sepulveda, V.E.; Goldman, W.E.; Martínez-Ruiz, R.; Haynes, C.L.; Torres-García, G. **Expression of *Paracoccidioides brasiliensis* AMY1 in a *Histoplasma capsulatum* amy1 mutant relates an alpha-(1,4)-amylase to cell wall alpha-(1,3)-glucan synthesis.** *PLoS One*, v. 7, n. 11, 2012.
- Carroll, S.B.; Salt, S.D. **Ecology for Gardeners.** *Timber Press: Portland*, 2004.
- Cogoni, C.; Valenzuela, L.; González-Halphen, D.; Olivera, H.; Macino, G.; Ballario, P.; González, A. ***Saccharomyces cerevisiae* has a single glutamate synthase gene coding for a plant-like high molecular-weight polypeptide.** *J. Bacteriol.*, v. 177, p. 792-798, 1995.
- Cohen, E. **Chitin synthesis and degradation as targets for pesticide action.** *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, v. 22, p. 245–261, 1993.
- Cohen, E. **Chitin Biochemistry: Synthesis, Hydrolysis and Inhibition.** *Advances in Insect Physiology*, 1st Edn, v. 38, Amsterdam: Elsevier Ltd, 2010.
- Cooper, T.G. **Nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*.** In: *The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces** (Strathern, J.N.; Jones, E.W.; Broach, J.R.; Eds.), p. 39-99, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1982.
- Cooper, T.G.; Sumrada, R.A. **What is the function of nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*?** *Journal of Bacteriology*, v. 155, p. 623-627, 1983.
- Courchesne, W. E.; M., B. **Ammonia regulation of amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Mol. Cell. Biol.*, v. 3, p. 672–683, 1983.
- Crespo, J.L.; Powers, T.; Fowler, B.; Hall, M.N. **The TOR-controlled transcription activators GLN3, RTG1, and RTG3 are regulated in response to intracellular levels of glutamine.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 99, p. 6784–6789, 2002.
- Cruz-Leite, V.R.M.; Moreira, A.L.E.; Silva, L.O.S.; Inácio, M.M.; Parente-Rocha, J.A.; Ruiz, O.H.; Weber, S.S.; Soares, C.M.A.; Borges, C.L. **Proteomics of *Paracoccidioides lutzii*: overview of changes triggered by nitrogen catabolite repression.** *J Fungi*, v. 9, p. 1102, 2023.
- Cruz-Leite, V.R.M.; Salem-Izacc, S.M.; Novaes, E.; Neves, B.J.; Brito, W.A.; Silva, L.O.H.S.; Pancez, J.D.; Parente-Rocha, J.A.; Pereira, M.; Soares, C.M.A.; Borges, C.L. **Nitrogen catabolite repression in members of *Paracoccidioides* complex.** *Microbial Pathogenesis*, 2020.

- De Camargo, Z.P.; De Franco, M.F. **Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis.** *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 17, n. 2, p. 41-48, 2000.
- D'Souza, R.; Tuck, J.P. **Glutamine supplements in the critically ill.** *J Royal Soc Med*, v. 97, p. 425-427, 2004.
- Facklam, T.J.; Marzluf, G.A. **Nitrogen regulation of amino acid catabolism in *Neurospora crassa*.** *Biochemical Genetics*, v. 16, n. 3, p. 343-354, 1978.
- Feng, B.; Marzluf, G.A. **Interaction between major nitrogen regulatory protein NIT2 and pathway-specific regulatory factor NIT4 is required for their synergistic activation of gene expression in *Neurospora crassa*.** *Mol Cell Biol*, v. 18, p. 3983–3990, 1998.
- Flannagan, R.S.; Heit, B.; Heinrichs, D.E. **Antimicrobial mechanisms of macrophages and the immune evasion strategies of *Staphylococcus aureus*.** *Pathogens*, v. 4, n. 4, p. 826-868, 2015.
- Fu, Y.H.; Marzluf, G.A. **Characterization of nit-2, the major nitrogen regulatory gene of *Neurospora crassa*.** *Mol Cell Biol*, v. 7, n. 5, p. 1691-1696, 1987.
- Gauthier, G.; Klein, B.S. **Insights into fungal morphogenesis and immune evasion: Fungal conidia, when situated in mammalian lungs, may switch from mold to pathogenic yeasts or spore-forming spherules.** *Microbe Wash DC*, v. 3, n. 9, p. 416-423, 2008.
- Georis, I.; et al. **Glutamine transport as a possible regulator of nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Yeast*, v. 39, n. 9, p. 493-507, 2022.
- Ghaddar, K.; Merhi, A.; Saliba, E.; Krammer, E.M.; Prévost, M.; André, B. **Substrate-induced ubiquitylation and endocytosis of yeast amino acid permeases.** *Molecular and Cellular Biology*, v. 34, p. 4447–4463, 2014.
- Hahn, R.C.; Hagen, F.; Mendes, R.P.; et al. **Paracoccidioidomycosis: Current status and future trends.** *Clin Microbiol Rev*, v. 35, n. 4, p. e0023321, 2022.
- Heilmann, C. J.; Sorgoa, A. G.; Mohammadia, S.; Sosinskac, G. J.; de Kosterb, C. G.; Brula, S.; de Koningb, L. J.; Klisa, F. M. **Surface Stress Induces a Conserved Cell Wall Stress Response in the Pathogenic Fungus *Candida albicans*.** *American Society for Microbiology*, v. 12, n. 2, 2013.
- Hensel, M.; Arst, H.N. Jr.; Aufauvre-Brown, A.; Holden, D.W. **The role of the *Aspergillus fumigatus* areA gene in invasive pulmonary aspergillosis.** *Mol Gen Genet*, v. 258, p. 553–557, 1998.
- Herth, W. **Calcofluor white and congo red inhibit chitin microfibril assembly of *Poteroiochromonas*: evidence for a gap between polymerization and microfibril formation.** *J. Cell Biol.*, v. 87, p. 442–450, 1980.
- Herth, W.; Schnepf, E. **The fluorochrome, calcofluor white, binds oriented to structural polysaccharide fibrils.** *Protoplasma*, v. 105, p. 129–133, 1980.
- Hofman-Bang, J. **Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Mol Biotechnol*, v. 12, n. 1, p. 35–73, 1999.
- Hood, M.; Skaar, E. **Nutritional immunity: transition metals at the pathogen–host interface.** *Nat Rev Microbiol*, v. 10, p. 525–537, 2012.

- Hopke, A.; Brown, A.J.P.; Hall, R.A.; Wheeler, R.T. **Dynamic fungal cell wall architecture in stress adaptation and immune evasion.** *Trends Microbiol*, v. 26, n. 4, p. 284–295, 2018.
- Hynes, M.J. **Induction and repression of amidase enzymes in *Aspergillus nidulans*.** *Journal Of Bacteriology*, v. 103, n. 2, p. 482-487, 1970.
- Iabuki, K.; Montenegro, M.R. **Experimental paracoccidioidomycosis in the Syrian hamster: morphology, ultrastructure and correlation of lesions with presence of specific antigens and serum levels of antibodies.** *Mycopathologia*, v. 67, n. 3, p. 131-141, 1979.
- Ikuta, C.R.S.; Neto, V.T.; Imada, T.S.N.; et al. **Paracoccidioidomicose crônica: Características intraorais em um relato de caso clínico.** *Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial*, v. 56, n. 4, p. 246-250, 2015.
- Jauniaux, J.-C.; Grenson, M. **GAP1, the general amino acid permease gene of *Saccharomyces cerevisiae*: nucleotide sequence, protein similarity with other baker's yeast amino acid permeases, and nitrogen catabolite repression.** *Eur J Biochem*, v. 190, p. 39–44, 1990.
- Jeschke, A.; Haas, A. **Deciphering the roles of phosphoinositide lipids in phagolysosome biogenesis.** *Commun Integr Biol*, v. 9, n. 3, p. e1174798, 2016.
- Klionsky, D. J., Herman, P. K., and Emr, S. D. **The fungal vacuole: composition, function, and biogenesis.** *Microbiol. Rev.*, v. 54, p. 266–292, 1990.
- Kmetzsch, L.; Staats, C.C.; Simon, E.; Fonseca, F.L.; Oliveira, D.L.; Joffe, L.S.; Rodrigues, J.; Azevedo, M.I.; Rodrigues, M.L.; Schrank, A.; Vainstein, M.H. **The GATA-type transcriptional activator Gat1 regulates nitrogen uptake and metabolism in the human pathogen *Cryptococcus neoformans*.** *Fungal Genet Biol*, v. 48, p. 192–199, 2011.
- Kriel, J.; Haesendonckx, S.; Rubio-Teixeira, M.; Thevelein, J.M. **From transporter to transceptor: signaling from transporters provokes re-evaluation of complex trafficking and regulatory controls.** *Bioessays*, v. 33, p. 870–879, 2011.
- Kudla, B.; Caddick, M.X.; Langdon, T.; Arst, H.N. Jr. **The regulatory gene *areA* mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Mutations affecting specificity of gene activation alter a loop residue of a putative zinc finger.** *EMBO J*, v. 9, p. 1355–1364, 1990.
- Langdon, T.; Sheerins, A.; Ravagnani, A.; Gielkens, M.; Caddick, M.X.; Arst, H.N. Jr. **Mutational analysis reveals dispensability of the N-terminal region of the *Aspergillus* transcription factor mediating nitrogen metabolite repression.** *Mol Microbiol*, v. 17, p. 877–888, 1995.
- Lee, I.R.; Chow, E.W.; Morrow, C.A.; Djordjevic, J.T.; Fraser, J.A. **Nitrogen metabolite repression of metabolism and virulence in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*.** *Genetics*, v. 188, n. 2, p. 309-323, 2011.
- Li, S. C., and Kane, P. M. **The yeast lysosome-like vacuole: endpoint and crossroads.** *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1793, p. 650–663, 2009.
- Limjindaporn, T.; Khalaf, R.A.; Fonzi, W.A. **Nitrogen metabolism and virulence of *Candida albicans* require the GATA-type transcriptional activator encoded by GAT1.** *Mol Microbiol*, v. 50, p. 993–1004, 2003.

- Marion, L.; Rappleye, C.A.; Engle, J.T.; Haynes, C.L.; Torres-García, G.; Goldman, W.E. **An alpha-(1,4)-amylase is essential for alpha-(1,3)-glucan production and virulence in *Histoplasma capsulatum***. *Mol Microbiol*, v. 62, n. 4, p. 970–983, 2006.
- Marzluf, G.A. **Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi**. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 61, n. 1, p. 17-32, 1997.
- Matute, D.R.; McEwen, J.G.; Puccia, R.; et al. **Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies**. *Mol Biol Evol*, v. 23, n. 1, p. 65-73, 2006.
- Magasanik, B. **Regulation of nitrogen utilization**. In: *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces*: Gene Expression* (Jones, E.W.; Pringle, J.R.; Broach, J.R.; Eds.), p. 283-317, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1992.
- Mendes-Giannini, M.J.S.; Monteiro da Silva, J.L.; de Fátima da Silva, J.; Donofrio, F.C.; Miranda, E.T.; Andreotti, P.F. **Interactions of *Paracoccidioides brasiliensis* with host cells: recent advances**. *Mycopathologia*, v. 165, p. 237–248, 2008.
- Merhi, A.; André, B. **Internal amino acids promote Gap1 permease ubiquitylation via TORC1/Npr1/14-3-3 dependent control of the Bul arrestin-like adaptors**. *Molecular and Cellular Biology*, v. 32, p. 4510–4522, 2012.
- Millington, M.A.; Queiroz Telles, F.; Hofmeister, R.M.; Negroni, R.; Almeida-Paes, R.; Martinez, R.; Bagagli, E. **Paracoccidioidomycosis: historical approach and perspectives on surveillance and control implementation**. *Epidemiol Serv Saúde*, v. 27, 2018.
- Mitchell, A.P.; Magasanik, B. **Purification and properties of glutamine synthetase from *Saccharomyces cerevisiae***. *J. Biol. Chem*, v. 258, p. 119-124, 1983.
- Mitchell, A.P.; Magasanik, B. **Biochemical and physiological aspects of glutamine synthetase inactivation in *Saccharomyces cerevisiae***. *J. Biol. Chem*, v. 259, 1984.
- Nagasu, T.; Hall, B.D. **Nucleotide sequence of the GDH gene coding the NADP-specific glutamate dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae***. *Gene*, v. 37, p. 247-253, 1985.
- Pagliari, C.; Pereira, N.V.; Kanashiro, L.; et al. **Characterization of cytotoxic immune response in skin and mucosal lesions of paracoccidioidomycosis**. *J Cutan Pathol*, v. 37, n. 5, p. 565-570, 2010.
- Pillai, C. K. S., Paul, W., and Sharma, C. P. **Chitin and chitosan polymers: chemistry, solubility and fiber formation**. *Prog. Polym. Sci.*, v. 34, p. 641–678, 2009.
- Pfannmüller, A.; Leufken, J.; Studt, L.; Sieber, C.M.K.; Rösler, S.M.; Brock, N.L.; Dickschat, J.S.; Tudzynski, B. **Comparative transcriptome and proteome analysis reveals a global impact of the nitrogen regulators AreA and AreB on secondary metabolism in *Fusarium fujikuroi***. *PLoS One*, v. 12, n. 4, 2017.
- Platt, A.; Ravagnani, A.; Arst, H.N. Jr.; Langdon, T.; Kirk, D.; Timberlake, W.E.; Caddick, M.X. **Mutational analysis of the C-terminal region of AREA, the transcription factor mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans***. *Mol Gen Genet*, v. 250, p. 106–114, 1996.
- Puccia, R.; Vallejo, M.C.; Longo, L.V.G. **The cell wall-associated proteins in the dimorphic pathogenic species of *Paracoccidioides***. *Curr Protein Pept Sci*, v. 18, p. 1074–1089, 2016.

- Ramachandra, S.; Linde, J.; Brock, M.; et al. **Regulatory networks controlling nitrogen sensing and uptake in *Candida albicans***. *PLoS One*, v. 9, n. 3, 2014.
- Rappleye, C.A.; Eissenberg, L.G.; Goldman, W.E. **Histoplasma capsulatum alpha-(1,3)-glucan blocks innate immune recognition by the beta-glucan receptor**. *PNAS*, v. 104, n. 4, p. 1366–1370, 2007.
- Ravagnani, A.; Gorfinkiel, L.; Langdon, T.; Arst, H.N. Jr.; Caddick, M.X. **Subtle hydrophobic interactions between the seventh residue of the zinc finger loop and the first base of an HGATAR sequence determine promoter-specific recognition by the *Aspergillus nidulans* GATA factor AreA**. *EMBO J*, v. 16, p. 3974–3986, 1997.
- Restrepo, A. **The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: A puzzle still unsolved**. *Sabouraudia*, v. 23, n. 5, p. 323–334, 1985.
- Restrepo, A.; McEwen, J.G.; Castañeda, E. **The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: How far from solving the riddle?** *Med Mycol*, v. 39, n. 3, p. 233–241, 2001.
- Richards, A., Veses, V., & Gow, N. A. R. **Vacuole dynamics in fungi**. *Fungal Biology Reviews*, v. 24, n. 3–4, p. 93–105, 2010.
- Ries, L.N.A.; Beattie, S.; Cramer, R.A.; Goldman, G.H. **Overview of carbon and nitrogen catabolite metabolism in the virulence of human pathogenic fungi**. *Molecular Microbiology*, v. 107, n. 3, p. 277–297, 2018.
- Roon, R.J.; Even, H.L.; Larimore, F. **Glutamate synthase: Properties of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide-dependent enzyme from *Saccharomyces cerevisiae***. *J. Bacteriol*, v. 118, p. 89–95, 1974.
- San-Blas, G.; Niño-Vega, G.; Iturriaga, T. ***Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: Molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy, and genetics**. *Med Mycol*, v. 40, n. 3, p. 225–242, 2002.
- San-Blas, G.; San-Blas, F.; Ormaechea, E.; Serrano, L.E. **Cell wall analysis of adenine requiring mutant of the yeast-like form of *Paracoccidioides brasiliensis* strain IVICPb9**. *Sabouraudia*, v. 15, p. 297–303, 1977.
- Saliba, E.; Evangelinos, M.; Gournas, C.; Corrillon, F.; Georis, I.; André, B. **The yeast H⁺-ATPase Pma1 promotes Rag/Gtr-dependent TORC1 activation in response to H⁺-coupled nutrient uptake**. *Elife*, v. 7, 2018.
- Santos, L.A.; Grisolia, J.C.; Burger, E.; Freitas, L.F.; Soares, F.M.; Passos, G.A.; Puccia, R.; Ferreira, R.C.; Moraes, M.R.; Almeida, S.R. **Virulence factors of *Paracoccidioides brasiliensis* as therapeutic targets: A review**. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 113, p. 593–604, 2020.
- Schreve, J.L.; Sin, J.K.; Garrett, J.M. **The *Saccharomyces cerevisiae* YCC5 (YCL025c) gene encodes an amino acid permease, Agp1, which transports asparagine and glutamine**. *J Bacteriol*, v. 180, p. 2556–2559, 1998.
- Silva, L.O.S.; Moreira, T.R.; Gonçalves, R.A.; Tomazett, M.V.; Parente-Rocha, J.A.; Mattos, K.; Pancez, J.D.; Ruiz, O.H.; Pereira, M.; Soares, C.M.A.; Weber, S.S.; Cruz-Leite, V.R.M.; Borges, C.L. ***Paracoccidioides lutzii* formamidase contributes to fungal survival in macrophages**. *Microorganisms*, v. 10, n. 10, p. 2011, 2022.

- Sophianopoulou, V.; Scazzocchio, C. **The proline transport protein of *Aspergillus nidulans* is very similar to amino acid transporters of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Mol Microbiol*, v. 3, p. 705–714, 1989.
- Stanbrough, M.; Magasanik, B. **Transcriptional and post-translational regulation of the general amino acid permease of *Saccharomyces cerevisiae*.** *J Bacteriol*, v. 177, p. 94–102, 1995.
- Tavoularis, S.N.; Tazebay, U.H.; Diallinas, G.; Sideridou, M.; Rosa, A.; Scazzocchio, C.; Sophianopoulou, V. **Mutational analysis of the major proline transporter (PrnB) of *Aspergillus nidulans*.** *Mol Membr Biol*, v. 20, p. 285–297, 2003.
- Tazebay, U.H.; Sophianopoulou, V.; Cubero, B.; Scazzocchio, C.; Diallinas, G. **Post-transcriptional control and kinetic characterization of proline transport in germinating conidiospores of *Aspergillus nidulans*.** *FEMS Microbiol Lett*, v. 132, p. 27–37, 1995.
- Teixeira, M.M.; Theodoro, R.C.; de Carvalho, M.J.; et al. **Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus.** *Mol Phylogenet Evol*, v. 52, p. 273–283, 2009.
- Teixeira, M.M.; Theodoro, R.C.; Niño-Vega, G.; et al. ***Paracoccidioides* species complex: Ecology, phylogeny, sexual reproduction, and virulence.** *PLoS Pathog*, v. 10, n. 10, p. e1004397, 2014.
- Ter Schure, E. **The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*.** *FEMS Microbiology Reviews*, v. 24, n. 1, p. 67–83, 2000.
- Todd, R.B.; Fraser, J.A.; Wong, K.H.; et al. **Nuclear accumulation of the GATA factor AreA in response to complete nitrogen starvation by regulation of nuclear export.** *Eukaryot Cell*, v. 4, p. 1646–1653, 2005.
- Minguetti, G.; Queiroz Telles, F.; Hofmeister, R.M.; et al. **Scanning electron microscopic studies of *Paracoccidioides brasiliensis* in the yeast phase.** *Sabouraudia*, v. 23, n. 6, p. 443–446, 1985.
- Vangelatos, I.; Vlachakis, D.; Sophianopoulou, V.; Diallinas, G. **Modelling and mutational evidence identify the substrate binding site and functional elements in APC amino acid transporters.** *Mol Membr Biol*, v. 26, p. 356–370, 2009.
- Veses, V., Richards, A., and Gow, N. A. **Vacuoles and fungal biology.** *Curr. Opin. Microbiol.*, v. 11, n. 6, p. 503–510, 2008.
- Vilela, R.; de Hoog, S.; Bensch, K.; Bagagli, E.; Mendoza, L. **A taxonomic review of the genus *Paracoccidioides*, with focus on the uncultivable species.** *PLoS Negl Trop Dis*, v. 17, n. 4, p. e0011220, 2023.
- Wagner, D.; Wiemann, P.; Huß, K.; Brandt, U.; Fleißner, A.; Tudzynski, B. **A Sensing Role of the Glutamine Synthetase in the Nitrogen Regulation Network in *Fusarium fujikuroi*.** *PLOS ONE*, v. 8, n. 11, 2013.
- Weber, R. W. S. **Vacuoles and the fungal lifestyle.** *Mycologist*, v. 16, p. 10–20, 2002.
- Wiame, J.-M.; Grenson, M.; Arst Jr., H.N. **Nitrogen catabolite repression in yeast and filamentous fungi.** *Adv. Microb. Physiol*, v. 26, p. 1–88, 1985.
- Zhu, X.; et al. **GNP1, the high-affinity glutamine permease of *S. cerevisiae*.** *Curr Genet*, v. 30, n. 2, p. 107–114, 1996.