



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

LUCAS BARROS FERNANDES

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICRORNAS NO FUNGO
DIMÓRFICO *HISTOPLASMA CAPSULATUM***

GOIÂNIA – GO

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES
E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 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 das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) 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 material bibliográfico

Dissertação Tese

2. Nome completo do autor

Lucas Barros Fernandes

3. Título do trabalho

"Identificação e caracterização de microRNAs no fungo dimórfico *Histoplasma capsulatum*"

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[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) autor(a) e ao(à) orientador(a);
- b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

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;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

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



Documento assinado eletronicamente por Celia Maria De Almeida Soares, Professor do Magistério Superior, em 30/04/2020, às 16:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por LUCAS BARROS FERNANDES, Discente, em 30/04/2020, às 17:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



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 1306068 e o código CRC A5F88E38.

LUCAS BARROS FERNANDES

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICRORNAS NO FUNGO
DIMÓRFICO *HISTOPLASMA CAPSULATUM***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal de Goiás como requisito para a obtenção do título de mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Célia Maria de Almeida Soares
Co-orientadora: Juliana Santana de Curcio

GOIÂNIA – GO

2020

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

Fernandes, Lucas Barros

Identificação e caracterização de microRNAs no fungo dimórfico *Histoplasma capsulatum* [manuscrito] / Lucas Barros Fernandes. - 2020.

53 f.

Orientador: Profa. Dra. Célia Maria de Almeida Soares; co orientadora Dra. Juliana Santana de Curcio.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Goiânia, 2020.

Bibliografia. Apêndice.

Inclui siglas, abreviaturas, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. MicroRNA. 2. Regulação pós-transcricional. 3. *Histoplasma capsulatum*. 4. Fungo dimórfico. I. Soares, Célia Maria de Almeida, orient. II. Título.

CDU 577.2



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº 083 da sessão de Defesa de Dissertação de LUCAS BARROS FERNANDES, que confere o título de Mestre(a) em GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR, na área de concentração em Genômica funcional, Estrutural e Proteômica.

Ao/s seis dias do mês de março de dois mil e vinte, a partir da(s) 14 horas, no(a) auditório do Instituto de Ciências Biológicas II, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada “Identificação e caracterização de microRNAs no fungo dimórfico *Histoplasma capsulatum*”. Os trabalhos foram instalados pelo(a) Orientador(a), Professor(a) Doutor(a) Célia Maria de Almeida Soares (ICB/UFV) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Doutor(a) Mariana Vieira Tomazett (ICB/UFV), membro titular externo; Professor(a) Doutor(a) Maristela Pereira (ICB/UFV), membro titular interno. Durante a arguição os membros da banca não fizeram sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido o candidato aprovado pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo(a) Professor(a) Doutor(a) Dra. Célia Maria de Almeida Soares, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, ao(s) seis dias do mês de março de dois mil e vinte.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por Celia Maria De Almeida Soares, Professor do Magistério Superior, em 06/03/2020, às 15:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Maristela Pereira, Professor do Magistério Superior, em 06/03/2020, às 15:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Mariana Vieira Tomazett, Usuário Externo, em 06/03/2020, às 16:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufv.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 1208526 e o código CRC 4B63703C.

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR
DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno (a): Lucas Barros Fernandes

Orientador (a): Prof.^a Dr.^a Célia Maria de Almeida Soares

Membros:

Dr.^a Mariana Vieira Tomazett – Universidade Federal de Goiás (UFG)

Prof.^a Dr.^a Maristela Pereira – Universidade Federal de Goiás (UFG).

Data: 06/03/2020

Horário: 14:00

AGRADECIMENTOS

À professora Célia Maria de Almeida Soares pela confiança e paciência, além dos preciosos ensinamentos compartilhados ao longo destes dois anos.

À Juliana Santana de Curcio, minha co-orientadora, por ter me orientado com grande diligência ao longo de toda a minha jornada. Sua contribuição foi fundamental para a realização desta pesquisa.

Ao professor Evandro Novaes, pelo auxílio prestado nas análises bioinformáticas, sem o qual este projeto não teria sido possível.

Ao professor Alexandre Melo Bailão, pela oportunidade de estágio docência, durante o qual pude aprender várias lições a respeito da comunicação do conhecimento científico.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFG, pelas disciplinas ministradas e pelo auxílio prestado em diversos momentos. À Lília Fernandes, por garantir o bom funcionamento da Secretaria de pós-graduação.

À Mariana Vieira Tomazett e a Maristela Pereira por participarem da banca de defesa e avaliarem a dissertação.

À CAPES, por seu financiamento que possibilitou a execução deste projeto.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1 <i>Histoplasma capsulatum</i> e histoplasmose	9
1.2 Classificação filogenética	12
1.3 Características gerais e mecanismos de ação de miRNAs e descrição em representantes do Reino Fungi	13
1.4 MicroRNAs na interação patógeno hospedeiro	21
2. JUSTIFICATIVA	24
3. OBJETIVOS	25
3.1 Objetivo geral	25
3.2 Objetivos Específicos	25
4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 Condições de cultura e extração de RNA	26
4.2 Detecção dos transcritos codificadores de dicers e argonautas por RT-PCR	26
4.3 Predição <i>in silico</i> de miRNAs em <i>H. capsulatum</i> G217B e H88	27
4.4 Determinação da estrutura secundária dos potenciais precursores de miRNAs	27
4.5 Caracterização dos alvos e classificação funcional	28
5. RESULTADOS	30
5.1 Caracterização da expressão dos transcritos codificadores de Dicers e Argonautas no genoma de <i>H. capsulatum</i> G217B	30
5.2 Determinação dos potenciais miRNAs contidos no genoma de <i>H. capsulatum</i>	30
5.3 Determinação dos alvos e processos potencialmente regulados por miRNAs em <i>H. capsulatum</i>	38
6. DISCUSSÃO	39
7. CONCLUSÃO	43
8. REFERÊNCIAS	44
9. ANEXOS	50

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1-Características microscópicas de *H. capsulatum*.

Figura 2-Modelo do processo infeccioso de *H. capsulatum*.

Figura 3-Representação da filogenia de *H. capsulatum*.

Figura 4-Diagrama representando o processamento de microRNAs em animais.

Figura 5-Representação das vias de produção de microRNAs em *N. crassa*.

Figura 6-Fluxograma do processo de busca por microRNAs no genoma de *H. capsulatum* através da bioinformática.

Figura 7-Reação de RT-PCR em *H. capsulatum* G217B.

Figura 8-Estruturas secundárias dos pre-miRNAs identificados em *H. capsulatum* H88 e G217B.

Figura 9-Genes e processos biológicos possivelmente regulados por microRNA em *H. capsulatum*.

Tabela 1-Sequências dos oligonucleotídeos utilizados na reação de RT-PCR.

Tabela 2-MicroRNAs identificados em *H. capsulatum* G217B.

Tabela 3-MicroRNAs identificados em *H. capsulatum* H88.

Tabela suplementar 1-MicroRNAs identificados em *H. capsulatum* G217B, incluindo repetições.

Tabela suplementar 2-MicroRNAs identificados em *H. capsulatum* H88, incluindo repetições.

Tabela Suplementar S1-Alvos de microRNA em *H. capsulatum* G217B.

Tabela Suplementar S2-Alvos de microRNA em *H. capsulatum* H88.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

3'-UTR: região 3' não traduzida do RNA mensageiro

DCL: proteína Dicer

Exp5: Exportina 5

FET-3: fator de alongamento da transcrição 3

HIV: vírus da imunodeficiência humana

MFE: energia livre de dobramento

microRNA ou miRNA: microRNA maduro

milRNA ou milR: microRNA-like maduro

MPRL-3: Proteína mitocondrial ribossomal 3

pre-miRNA: microRNA precursor

pri-miRNA: microRNA primário

QDE-2: proteína *quelling-deficient-2*

RISC: complexo silenciador induzido por RNA

RT-PCR: transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da DNA polimerase

SOD2: superóxido dismutase 2

RESUMO

MicroRNAs são pequenos transcritos não-codificantes envolvidos no fenômeno de interferência por RNA. Estes transcritos possuem entre 18 e 25 nucleotídeos e derivam de precursores com uma estrutura de grampo (*hairpin*). Sua biogênese e seu mecanismo de ação são bem compreendidos em plantas e animais, porém em fungos a biossíntese destes RNAs regulatórios ainda é pouco compreendida. Entretanto, pequenos RNAs já foram identificados em espécies de fungos, como *Neurospora crassa*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Penicillium marneffei*, *Trichoderma reesei* e *Paracoccidioides brasiliensis*. Embora os dados sobre estas moléculas no reino *Fungi* estejam aumentando, até o momento não existem descrições de microRNAs em importantes patógenos humanos como *Histoplasma capsulatum*. Portanto, devido à ausência da caracterização deste mecanismo regulatório neste patógeno humano, o presente trabalho visou identificar miRNAs neste fungo e inferir os possíveis processos biológicos regulados por esses RNAs de interferência. Para tal fim a metodologia empregada neste estudo foi a busca por sequências de microRNAs descritos em outros fungos e análises *in silico* para prever a homologia destas sequências com regiões do genoma das linhagens de *H. capsulatum* H88 e G217B. Após as análises de bioinformática, identificamos seis microRNAs em H88 e quatro microRNAs em G217B. Destes, um microRNA era conservado em ambas as linhagens. Este microRNA foi selecionado para investigação de potenciais alvos. Foram identificados 551 alvos para este microRNA na linhagem H88 e 495 na linhagem G217B. Processos biológicos identificados como regulados por este microRNA incluem a síntese e a degradação de componentes de parede, o metabolismo energético e o processamento de DNA. Os resultados indicam a presença de microRNAs neste fungo e um grande número de alvos para cada microRNA, o que sugere uma complexa rede de regulação pós-transcricional efetuada por microRNAs em *H. capsulatum*.

Palavras-chave: microRNA; regulação pós-transcricional; *Histoplasma capsulatum*; fungo dimórfico.

ABSTRACT

MicroRNAs are small non-coding RNA molecules involved in the RNA interference phenomenon. These small RNAs contain between 18 and 25 nucleotides and are derived from precursors containing a hairpin structure. Their biogenesis and mode of action are well understood in plants and animals, but in fungi their biogenesis is still poorly understood. However, small RNAs similar to microRNAs (miRNAs-like) have been identified in various fungi, such as *Neurospora crassa*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Penicillium marneffei*, *Trichoderma reesei* and *Paracoccidioides brasiliensis*. Even though the amount of data on these molecules in the Fungi kingdom has been increasing, up to now there are no descriptions of microRNAs in important human pathogens such as *Histoplasma capsulatum*. Therefore, due to the absence of the characterization of this regulatory mechanism in this human pathogen, this study aimed to identify microRNAs in this pathogen and to infer the biological processes regulated by these interference RNAs in this fungus. In order to do so, the methodology employed in this study was the search for published microRNAs sequences for other fungi in the literature and *in silico* analysis to predict the homology of these known sequences to genome regions of two *H. capsulatum* strains H88 and G217B. After the bioinformatics analysis, we identified six microRNAs in *H. capsulatum* H88 and four microRNAs in *H. capsulatum* G217B. One of the microRNAs was conserved in both strains. This microRNA was selected for target investigation. We identified 551 targets in the H88 strain and 495 targets in the G217B strain. Biological processes identified as being regulated by this microRNA comprise the synthesis and the degradation of cell wall components, the energetic metabolism and DNA processing. The results imply the presence of microRNAs in this fungi and a high number of targets for each microRNA, which hints on the existence of a complex network of microRNA post-transcriptional regulation in *H. capsulatum*.

Keywords: microRNA; post-transcriptional regulation; *Histoplasma capsulatum*; dimorphic fungus.

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Histoplasma capsulatum* e histoplasmose

O fungo *Histoplasma capsulatum* é o agente causador da Histoplasmose, descrito por Samuel Taylor Darling em 1906, na América Central, tendo sido isolado durante a autópsia de um carpinteiro que apresentava sintomas similares àqueles causados pela tuberculose (DARLING, 1906). *H. capsulatum* é um fungo encontrado em todos os continentes do globo terrestre, com exceção da Antártida (KASUGA et al., 2003). O continente americano é o local onde o fungo é mais abundante e também onde constitui o maior problema de saúde pública. Apresenta como característica o dimorfismo térmico, possuindo uma fase micelial, que cresce entre 20°C e 30°C e uma fase leveduriforme, que cresce a 37°C (Figura 1) (BONIFAZ et al., 2011; SIL, 2019). O micélio é a fase infecciosa e existe de forma livre no solo, normalmente associado à matéria fecal de pássaros e morcegos (guano). A levedura é a forma patogênica e normalmente a transição micélio-levedura se dá quando o fungo infecta um hospedeiro mamífero (KAUFFMAN et al., 2007).

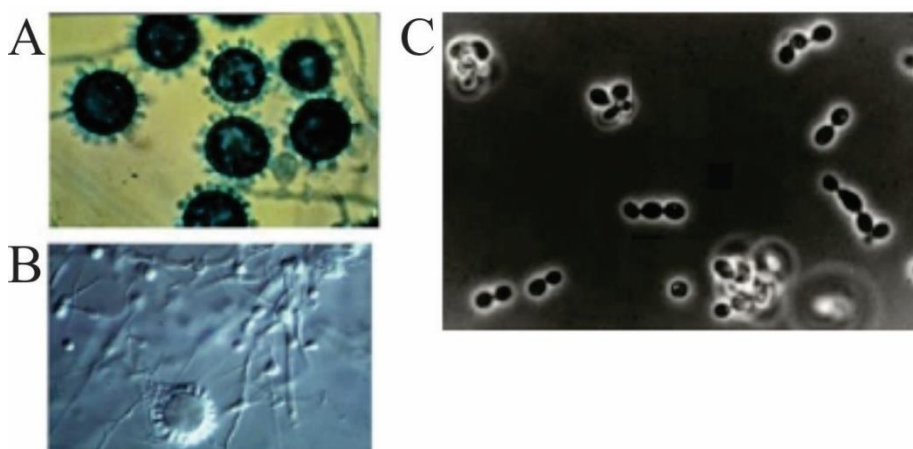


Figura 1. Micrografias das fases miceliana e de levedura de *Histoplasma capsulatum*. (A) Micrografia de contraste de fase de cultura micelial. (B) Micrografia de interferência de Nomarski de cultura micelial. (C) Micrografia de contraste de fase de cultura de levedura (adaptado de WOODS, 2016).

Durante a fase micelial, *H. capsulatum* produz dois tipos de conídios: micro-conídios ovóides, medindo de 2 a 4 micrômetros, e macro-conídios globosos de 8 a 15 micrômetros. Eles desenvolvem-se sobre ramos miceliais curtos. A infecção ocorre quando o hospedeiro inala os

conídios. Uma vez dentro dos alvéolos, os conídios são fagocitados pelos macrófagos adquirindo a morfologia de leveduras, que multiplicam-se no interior destas células de defesa (Figura 2) (WOODS, 2016).

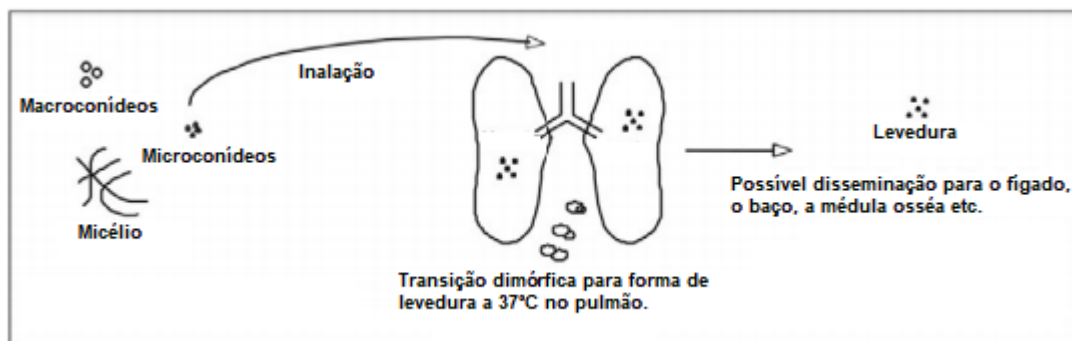


Figura 2. Modelo da infecção e transição dimórfica em *H. capsulatum*. Macro-conídeos e micro-conídeos são inalados pelo hospedeiro. Dentro dos alvéolos, adquirem a morfologia de levedura e podem se disseminar para outros órgãos (adaptado de WOODS, 2016).

H. capsulatum pode permanecer latente durante um longo período de tempo no corpo do hospedeiro e começar a se proliferar caso o sistema imune seja comprometido. Estudos com ratos demonstraram que a diminuição dos níveis de linfócitos CD4 ou CD8 pode provocar um quadro de histoplasmose em um organismo previamente exposto a este fungo (DURKIN et al., 2001). Caso a levedura se propague para outros órgãos, o quadro recebe o nome de histoplasmose disseminada progressiva, sendo potencialmente letal. Em pacientes imunocompetentes, a infecção é normalmente assintomática. A histoplasmose é mais comum em pacientes imunocomprometidos. Ainda assim, o risco que essa doença representa para pacientes saudáveis não deve ser desprezado, uma vez que estes também podem desenvolver a forma letal da doença, principalmente se uma grande quantidade de conídios for inalada (DE & NATH, 2015).

Existem várias formas clínicas da histoplasmose. A histoplasmose pulmonar aguda se caracteriza por perturbações no sistema respiratório similares àsquelas provocadas pela gripe ou por pneumonia bacteriana e normalmente dura menos de duas semanas (MCKINSEY & MCKINSEY, 2011). A histoplasmose pulmonar crônica é mais comum em idosos e fumantes e tem como características a cavitação, a fibrose intersticial e o espessamento da pleura (WHEAT et al., 2004). A histoplasmose disseminada progressiva consiste na disseminação da infecção para órgãos que não compõem o sistema respiratório. Os locais para onde a histoplasmose se

dissemina mais frequentemente são o fígado, o baço, o trato gastrointestinal e o sistema nervoso central (AZAR & HAGE, 2017; KAUFFMAN, 2007).

A histoplasmose não é uma doença de notificação compulsória no Brasil e é de difícil diagnóstico, sendo frequentemente confundida com a tuberculose. Além disso, não há um estudo epidemiológico a nível nacional. Por isso, acredita-se que sua incidência e taxa de mortalidade sejam subestimadas (FALCI et al, 2019). Em uma revisão sistemática da literatura abrangendo o período de 1939 a 2018, Almeida e colaboradores (2019) encontraram 3530 casos de histoplasmose publicados. Dentre os casos analisados por Almeida, a taxa de mortalidade média é de 33,1. Após a década de 1980 houve um grande aumento no número de casos registrados da doença devido ao surgimento do vírus da imunodeficiência humana (HIV). Um estudo de Falci e colaboradores (2019) recente investigou a incidência de histoplasmose entre pessoas vivendo com AIDS, hospitalizadas apresentando sintomas comuns à histoplasmose e a diversas outras condições patológicas. A incidência de histoplasmose entre esses pacientes foi de 21,6%. A mortalidade encontrada neste grupo foi de 22%. Verificou-se uma prevalência maior da doença nos estados do Nordeste e Centro-oeste do que do Sul e Sudeste. Adenis e colaboradores (2018) constataram que a histoplasmose provocou pelo menos 671 mortes na América Latina entre pessoas vivendo com HIV no ano de 2012. Esta estimativa coloca a histoplasmose como uma das principais causas de morte entre pessoas portadoras do HIV na América Latina, ao lado da tuberculose.

O método mais empregado para o diagnóstico de histoplasmose no Brasil é a cultura celular a partir de amostras de pacientes. Um problema desse método é que a cultura pode demorar até seis semanas para revelar a presença de *H. capsulatum*, o que atrasa o início do tratamento. Outros métodos diagnósticos incluem a observação de células fúngicas ao microscópio, testes de detecção de antígenos e testes imunológicos. A resposta imunológica à histoplasmose pode ser aferida através do teste de imunodifusão em ágar duplo, teste de fixação de complemento ou ensaio imunoenzimático. Os testes imunológicos são mais ágeis que a cultura celular. Uma desvantagem dessa metodologia é que sua sensibilidade é reduzida em pacientes imunocomprometidos devido a sua quantidade reduzida de anticorpos (WHEAT, 2006). O teste de detecção de antígenos foi desenvolvido em 1986 e tem sido amplamente utilizado nos Estados Unidos. Este teste, porém, não estava disponível comercialmente fora dos EUA, o que impede

sua utilização na América Latina e dificultava o diagnóstico. Recentemente, a empresa Immuno-Mycolytics tornou disponível um teste de detecção de antígenos com boa sensibilidade e especificidade (ambas acima de 95%) (FALCI et al., 2019).

Já o tratamento da micose emprega diferentes estratégias de administração de antimicóticos, por exemplo, casos mais brandos de histoplasmose são tratados com itraconazol, sendo administradas três doses diárias de 200 mg ao paciente por três dias e em, seguida, administrando-se duas doses diárias de 200 mg por seis a doze semanas. Voriconazol e posaconazol podem ser usados em pacientes que não estejam melhorando com o tratamento com itraconazol. Casos mais graves são tratados com anfotericina B, na dosagem diária de 3 a 5 mg por quilograma durante sete a catorze dias (TABORDA et al., 2018).

1.2 Classificação filogenética

O gênero *Histoplasma* faz parte da família Ajellomycetaceae, da ordem Onygenales, da classe Eurotiomycetes e do filo Ascomycota. Os fungos da família Ajellomycetaceae se distinguem por ascomas globosos com apêndices espiralados, ascósporos globosos ou oblongos e ausência de atividade queratinolítica. Essa família inclui outros patógenos importantes, como *Paracoccidioides brasiliensis* e *Blastomyces dermatitidis*. (UNTEREINER et al., 2004). Um estudo molecular com indivíduos infectados demonstrou a existência de sete clados distintos de *H. capsulatum* (KASUGA et al., 2003). Os clados identificados são: norte-americano I, norte-americano II, latino americano A, eurasiático mais latino americano B, australiano, holandês e africano. (VITE-GARIN et al., 2014) (Figura 3). Atualmente, o genoma de cinco linhagens de *H. capsulatum* já foi sequenciado e anotado: G186AR, G217B, H88, H143 e NAm1. G217B e NAm1 fazem parte do clado América do Norte. G186AR é proveniente de uma amostra do Panamá e pertence ao clado América Latina A. As linhagens H88 e H143 pertencem ao clado África (KASUGA et al., 2003). Dentre as linhagens, a diferença mais marcante, sob os aspectos clínicos e morfológicos, ocorre entre as linhagens africanas (H88 e H143) e as demais. As células leveduriformes das linhagens H88 e H143 possuem cerca de 10 µm de diâmetros, o que é duas vezes o diâmetro das linhagens não-africanas. O quadro clínico se diferencia pela possibilidade da disseminação do fungo para o tecido ósseo, provocando osteomielite (KATCHY et al., 2019).

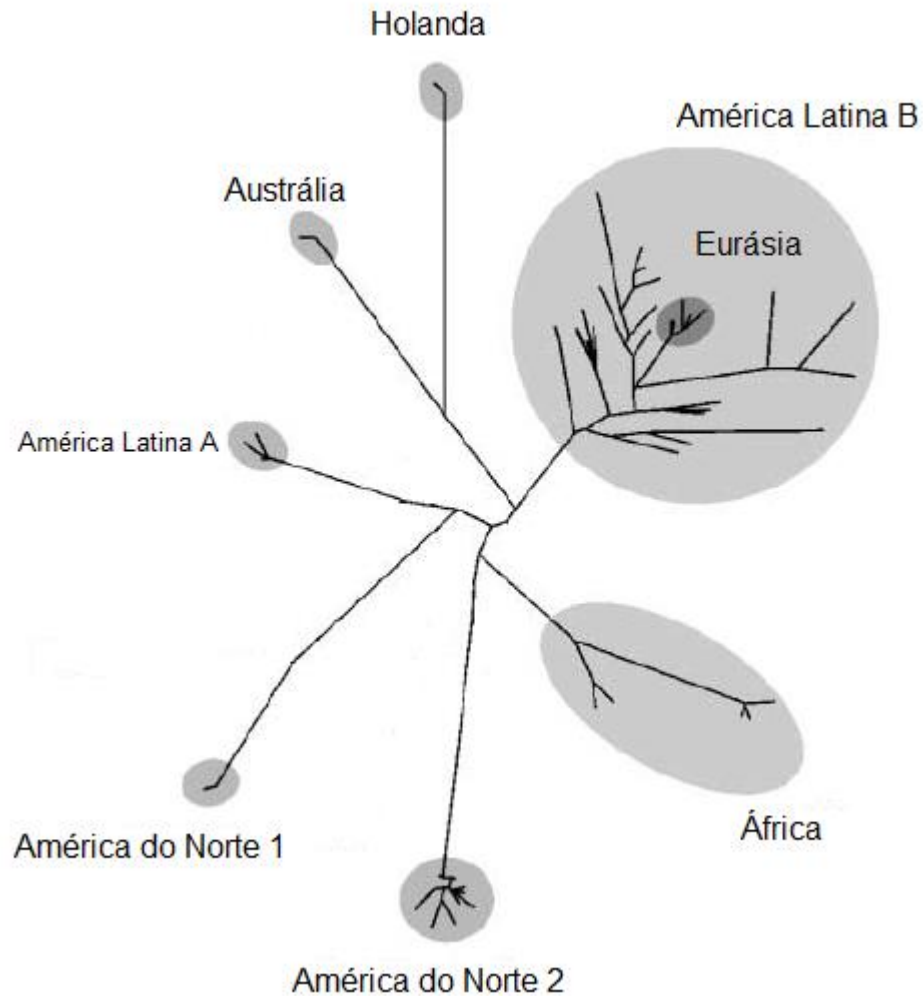


Figura 3. Representação gráfica das relações filogenéticas de *H. capsulatum*. Sete clados filogenéticos foram identificados: América do Norte 1, América do Norte 2, África, Eurásia + América Latina B, Holanda e Austrália. (adaptado de KASUGA et al., 2003).

1.3 Características gerais, mecanismos de ação de miRNAs e descrição em representantes do Reino Fungi

Interferência por RNA é o processo pelo qual a expressão gênica é inibida por pequenas moléculas de RNAs não codificantes (WANG & DEAN, 2020). O RNA de interferência tem como alvo dentro da célula RNAs mensageiros que são complementares à sua sequência. Neste mecanismo de regulação da expressão gênica a molécula de mRNA poderá ser submetida ao processo de clivagem ou inibição da tradução proteica (FIRE et al., 1998; FULCI & MACINO, 2007). De acordo com sua biogênese e seu mecanismo de ação, os RNAs de interferência são divididos em três classes principais: microRNA (miRNA), pequenos RNAs de interferência

(siRNA) e RNAs associados às proteínas Piwi (piRNA) (JIANG et al., 2012). Todos estes três tipos de RNA atuam se associando ao complexo RISC. SiRNAs distinguem-se de miRNAs por serem derivados de precursores mais longos e por possuírem 100% de complementaridade com seus alvos, o que os torna reguladores mais específicos. PiRNAs, por sua vez, distinguem-se de miRNAs por serem ligeiramente maiores e por seu processamento ser independente de enzimas dicers (SETO et al., 2007).

MiRNAs podem ser identificados por possuírem de 18 a 25 nucleotídeos e serem processados pela enzima dicer a partir de um RNA precursor de fita dupla com estrutura de grampo (*hairpin*) (LAU et al., 2013). O primeiro microRNA foi descrito por Lee e colaboradores (1993) em *Caenorhabditis elegans*; tratava-se do microRNA lin-4. O desenvolvimento de *C. elegans* é controlado por vários genes cujas taxas de expressão variam em função do tempo. A transição do primeiro estágio larval, L1, para o segundo, L2, é determinada pela diminuição dos níveis celulares de LIN-14, uma proteína codificada pelo gene *lin-14*. A redução dos níveis de LIN-14 é causada pelo aumento dos níveis do microRNA lin-4, que funciona como um regulador pós-transcricional da expressão desta proteína. Este microRNA, portanto, é fundamental para o desenvolvimento larval de *C. elegans* (LEE et al., 2003). Posteriormente, foi descrito um segundo microRNA em *C. elegans*, o microRNA let-7. Demonstrou-se que este miRNA regula negativamente não apenas um, mas vários genes diferentes (REINHART et al., 2000). Recentemente um pequeno RNA secretado, denominado mir-83 foi descrito neste organismo. Tal RNA é relacionado ao processo de senilidade e de autofagia. Neste sentido, a incapacidade de realizar autofagia eficientemente provoca, neste organismo, a alteração da homeostase proteica nas células, provocando o envelhecimento celular (HU et al., 2019). Com o passar do tempo, Mir-83 é regulado positivamente no intestino em função da expressão aumentada de *hsf-1*, que é um fator de transcrição relacionado à resposta ao calor (CARRANZA et al., 2020). Mir-83, por sua vez, regula negativamente os genes *atg-4.2* e *cup-5*, relacionados à autofagia, e, desta forma, promove o envelhecimento. A deleção de mir-83 em *C. elegans* provoca uma redução nos traços fenotípicos associados ao envelhecimento, além de prolongar seu tempo de vida (ZHOU et al., 2019).

Os genes que codificam um miRNA situam-se normalmente em regiões intergênicas e possuem seu próprio promotor. Outras vezes, localizam-se em regiões intrônicas e sua transcrição

pode estar acoplada à transcrição do gene em que se insere. Na maioria dos casos, a transcrição é realizada pela enzima RNA polimerase II (LEE et al., 2004). O transcrito primário denomina-se pri-miRNA e pode chegar a possuir vários kilobases de extensão. Por complementaridade de bases, o transcrito primário forma RNA dupla fita, com *hairpins* em algumas regiões (LEE et al., 2003). Ribonucleases III estão envolvidas na maturação de vários tipos de RNA (FORTIN et al., 2002). Em animais, o transcrito primário pri-miRNA é processado no núcleo celular pela enzima ribonuclease III Drosha, a qual se associa a seu cofator DGCR8 para compor o complexo microprocessador. Além de Drosha e DGCR8, participam do complexo microprocessador de miRNAs enzimas helicases da família Dead-box e ribonucleoproteínas (SIOMI & SIOMI, 2010).

O complexo microprocessador cliva o pri-miRNA e produz uma fita de RNA de cerca de 70 nucleotídeos de comprimento, com estrutura de grampo, denominada pre-miRNA (DENLI et al., 2004; LEE et al., 2003). O pre-miRNA é transportado para o citoplasma pela enzima exportina 5 (Exp5) (LUND et al., 2004). No citoplasma, o pre-miRNA é processado por enzimas Dicers para gerar uma dupla fita miRNA-miRNA de cerca de 22 nucleotídeos. Uma das fitas é, então, degradada e a outra é incorporada a um complexo ribonucleoprotéico denominado complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) (Figura 4) (HE & HANNON, 2004). Este complexo associa-se ao RNA mensageiro alvo por complementaridade de bases. A proteína argonauta, que faz parte do complexo, modifica o mRNA de forma a inibir sua tradução ou promover a clivagem desta molécula (PAWLICA et al., 2020).

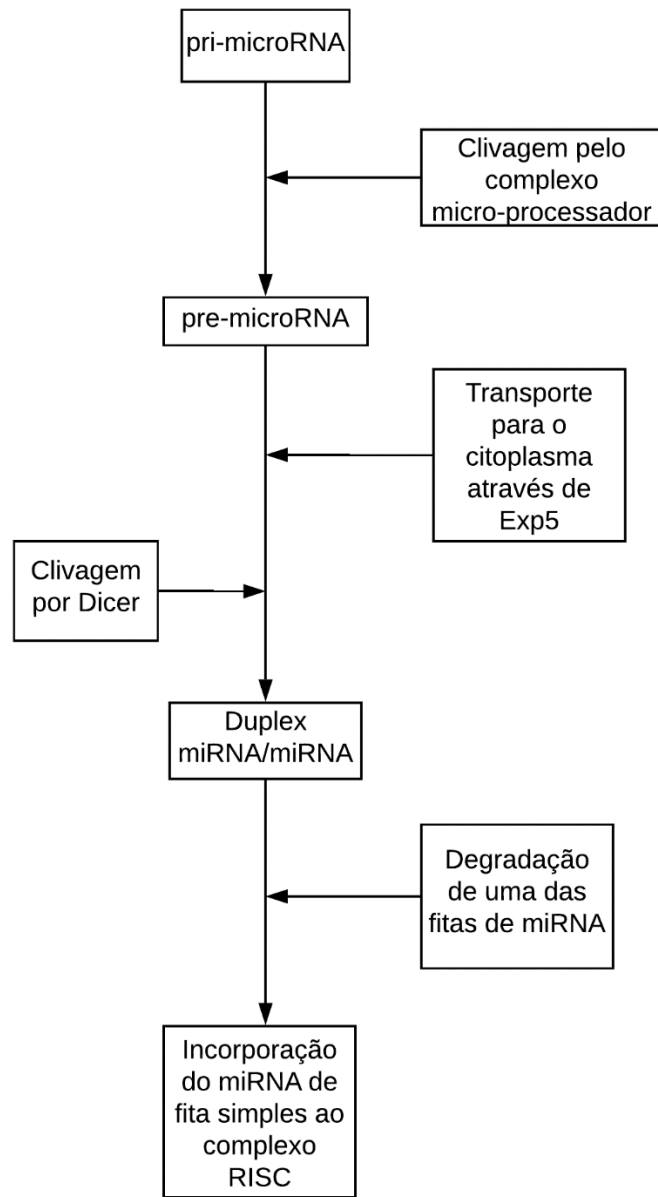


Figura 4. Diagrama representando o processamento de microRNAs em animais. O transcrito é inicialmente denominado pri-microRNA. Após ser clivado pelo processo micro-processador, é exportado para o citoplasma, onde é clivado por Dicer. A molécula resultante é um duplex miRNA/miRNA. Uma das duas fitas é degradada e a fita restante se associa ao complexo de silenciamento induzido por RNA (adaptado de HE & HANNON, 2004).

Em fungos foram demonstradas quatro diferentes vias para produção de microRNAs no organismo modelo *Neurospora crassa* (LEE et al., 2010). A produção de miLR-1 inicia-se pela transcrição do gene, gerando um pri-miRNA. Este pri-miRNA é processado pelas enzimas Dicer, DCL-1p e DCL-2p, dando origem a uma fita dupla de cerca de 38 nucleotídeos denominada pre-miRNA. Um complexo proteico é formado pela associação das proteínas *Quelling-deficient-2*

(QDE-2), que é uma proteína argonauta, e proteína de interação com QDE-2 (QIP), que é uma exonuclease (LEE et al., 2010). O pre-miRNA é processado nesse complexo e se torna um microRNA-like maduro. A síntese de miLR-3 acontece independentemente de QDE-2 e requer a presença de enzimas Dicer, indicando uma via de processamento semelhante àquela encontrada em plantas. Em miLR-4 o processamento independe de QDE-2 e continua a ocorrer de forma reduzida na ausência das proteínas Dicers, sugerindo o envolvimento de uma nuclease desconhecida no processo. O miLR-2 é atípico por ser independente de enzimas Dicer. Seu processamento depende de QDE-2, mas não de QIP. A proteína mitocondrial ribossomal 3 (MRPL3) contém um domínio putativo de RNase III e um motivo de reconhecimento de RNA fita dupla, o que a permitiria agir no lugar de Dicer, sugerindo seu envolvimento na síntese de microRNAs em *N. crassa* (LEE et al., 2010) (Figura 5).

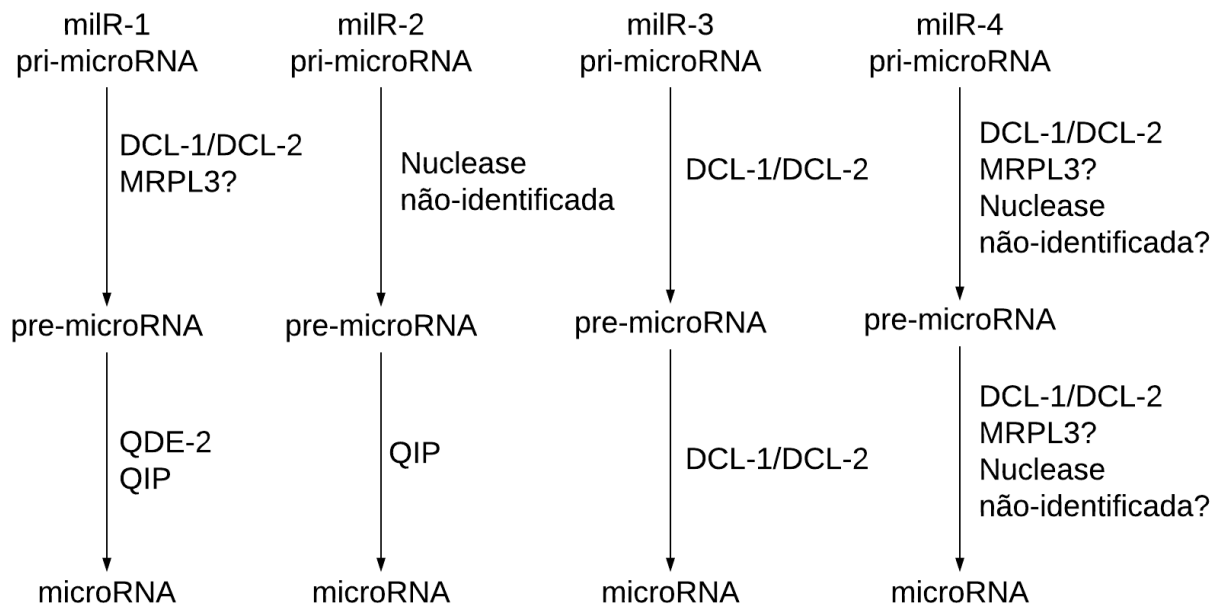


Figura 5. Quatro diferentes vias para a síntese de microRNAs em *N. crassa*. Dcl-1/Dcl-2: Dicer-1, Dicer-2. QDE-2: *Quelling-deficient-2*, proteína argonauta. QIP: Proteína de interação com QDE-2, uma exonuclease. MRPL3: Proteína Mitocondrial Ribossomal 3, proteína contendo um domínio putativo de RNase III. (adaptado de LEE et al, 2010).

O estudo de Lee e colaboradores (2010) foi também o responsável pela identificação dos primeiros microRNAs fúngicos. Proteínas envolvidas na síntese e na ação de microRNAs, como DCL-1 (Dicer-1), DCL-2 (Dicer-2), QDE-1 (RNA polimerase dependente de RNA), QDE-2 (proteína argonauta) e QDE-3 (DNA helicase), haviam sido previamente identificadas no genoma

de *N. crassa* (CATALANOTTO et al., 2004). A proteína QDE-2 faz parte do complexo silenciador induzido por RNA denominado (RISC) e se liga ao microRNA. Após a imunoprecipitação da proteína QDE-2, os pequenos RNAs associados à QDE foram analisados. Notou-se que essa proteína se ligava a RNAs de cerca de 20 nucleotídeos e que havia uma forte preferência por uridina na extremidade 5'. Os pequenos RNAs obtidos foram mapeados no genoma de *N. crassa*. Para identificar possíveis microRNAs, inicialmente foram identificados *loci* altamente enriquecidos em pequenos RNAs; posteriormente foram selecionados os *loci* que produzem pequenos RNAs preferencialmente a partir de uma fita específica e finalmente, foi analisada a capacidade destes pequenos RNAs de formarem estruturas de grampo-volta com as sequências adjacentes. Esta análise identificou 25 *loci* no genoma de *N. crassa* que possivelmente produzem microRNAs. Os 4 microRNAs mais abundantes, segundo os dados de sequenciamento, foram selecionados para confirmação experimental e investigação de sua síntese, o que revelou 4 distintas vias para produção de microRNAs nesse fungo, como mostrado na figura anterior.

A metodologia de sequenciamento de alto desempenho se tornou um padrão para a investigação de microRNAs em fungos. Jiang e colaboradores (2012) investigaram microRNAs no fungo patógeno *Cryptococcus neoformans*. Após as análises de bioinformática dois microRNAs foram identificados no genoma deste fungo, com tamanhos de 22 nucleotídeos e 18 nucleotídeos; estes microRNAs foram denominados miR1 e miR2, respectivamente. Tais microRNAs demonstraram serem capazes de silenciar genes que possuem uma sequência complementar à sua na região 3'UTR. As sequências de nucleotídeos dos dois microRNAs foram então inseridas na região 3'UTR dos genes repórter *Orotate phosphoribosyltransferase 5* (URA5) e *Chloride channel protein* (CLC1). Observou-se que as células em que um dos microRNAs havia sido inserido na região 3'-UTR de URA5 exibiam um fenótipo auxotrófico para uracila, assim como as células em que um dos microRNAs havia sido inserido na região 3'-UTR exibiam um fenótipo albino, demonstrando que estes microRNAs são capazes de silenciar genes que possuam uma sequência complementar ao microRNA em sua região 3'-UTR. Este estudo confirmou ainda que o silenciamento induzido por microRNAs neste fungo depende de enzimas implicadas no funcionamento do complexo RISC, como Argonauta-1, Dicer-1, Dicer-2 e uma RNA polimerase dependente de RNA (HE & HANNON, 2004; LEE et al, 2010).

Análises por bioinformática predisseram a existência de proteínas Dicer e Argonauta no genoma de *Sclerotinia sclerotiorum*. O sequenciamento de pequenos RNAs e análises bioinformáticas identificaram quarenta e quatro candidatos a microRNAs no genoma de *S. sclerotiorum*. A expressão de miRNAs em condição de formação de esclerócios foi comparada com a expressão de miRNAs na condição de crescimento vegetativo. Verificou-se que sete microRNAs eram diferencialmente expressos entre estas duas fases do desenvolvimento. Este resultado indica um possível envolvimento de microRNAs na regulação destes processos biológicos em *S. sclerotiorum* (ZHOU et al., 2012).

O sequenciamento de pequenos RNAs foi realizado no fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*, com o objetivo de investigar a função de microRNAs no desenvolvimento tanto na fase de crescimento micelial, quanto na fase de conidiogênese. Quinze microRNAs foram identificados, sendo cinco microRNAs específicos da fase de crescimento micelial, quatro microRNAs específicos da fase de conidiogênese e seis microRNAs comuns a ambas as fases. Dos seis microRNAs comuns a ambas as fases, três foram mais expressos na fase de conidiogênese, dois na fase de micélio e um deles não demonstrou variação significativa entre as duas fases. Foram investigados também os alvos dos microRNAs, ou seja, os genes regulados. O número de alvos para cada microRNA variou entre três e quatorze. Notavelmente, alguns dos genes regulados eram fatores de transcrição relacionados ao desenvolvimento. Alguns dos genes regulados codificavam enzimas com função metabólica (ZHOU et al., 2012).

Penicillium marneffei foi o primeiro fungo dimórfico no qual microRNAs foram identificados. Os experimentos foram realizados tanto com a fase micelial, quanto com a fase de levedura. Vinte e quatro microRNAs foram identificados, sendo dezessete na fase micelial e sete na fase de levedura. Foram construídos mutantes para as proteínas Dicer-1, Dicer-2 e QDE-2. Verificou-se para os dois microRNAs testados que Dicer-2, mas não Dicer-1 e QDE-2, eram necessários para a síntese de ambos microRNAs. Foram identificados alvos para vinte e um dos vinte e quatro microRNAs analisados. A análise filogenética da proteína Dicer-2 de *P. marneffei* mostrou ser a proteína mais próxima aos demais fungos dimórficos, como *P. brasiliensis* e *H. capsulatum*, do que a *Penicillium chrysogenum*, sugerindo uma co-evolução dessa proteína nos fungos dimórficos. Dicer-1 e QDE-2, por sua vez, são mais relacionadas a Dicer-1 e QDE-2 de *P. chrysogenum* do que às proteínas homólogas dos demais fungos dimórficos (LAU et al., 2013).

Em *P. chrysogenum*, foram identificados trinta e quatro microRNAs, o número de alvos identificados para cada microRNA variou entre 1 e 118. Os processos biológicos regulados por microRNAs neste microorganismo incluem o reparo do DNA e a própria síntese de microRNAs (DAHLMANN & KÜCK., 2015).

MicroRNAs foram investigados também no fungo *Trichoderma reesei*. Foram sequenciados pequenos RNAs em condição de indução com celulose e não-indução com celulose. No total, foram identificados treze microRNAs, sendo que seis eram específicos da condição de indução com celulose, um microRNA era específico da condição de não-indução por celulose e seis microRNAs eram comuns a ambas as condições. Dentre os seis microRNAs comuns às duas condições, quatro eram mais abundantes na condição de indução por celulose e dois na condição de não-indução por celulose. Os processos biológicos de que participam os genes regulados por microRNAs incluem ligação ao substrato, regulação transcricional e traducional de enzimas, crescimento e pigmentação. Um dos alvos de Tre-milR-4 um miRNA identificado neste fungo é *Cre1*, um regulador transcricional que inibe a produção de celulasas em presença de fontes alternativas de carboidratos. A produção de Tre-milR-4, então, possivelmente induz a produção de celulasas através da repressão da tradução de *Cre1* (KANG et al., 2013).

Em 2019, de Curcio e colaboradores identificaram microRNAs no fungo dimórfico *P. brasiliensis*. Análises *in silico* predisseram a existência de proteínas Dicers e Argonautas nesse fungo, cuja expressão foi posteriormente confirmada. A análise dos genomas disponíveis de outros fungos mostrou que essas proteínas são conservadas em diversas espécies deste reino, como *H. capsulatum*, *C. neoformans*, *Aspergillus fumigatus* e *N. crassa*. A busca por homólogos de microRNAs descritos e a avaliação da estrutura secundária das regiões homólogas permitiu a identificação de dezessete microRNAs no genoma de *P. brasiliensis*. Os microRNAs de *P. brasiliensis* foram também investigados por sequenciamento de alto desempenho. Essa estratégia resultou na identificação de quarenta e oito microRNAs. A identificação de alvos foi realizada pela busca por sequências homólogas aos microRNAs identificados nas regiões 3' não-traduzidas dos genes de *P. brasiliensis*. A maior parte dos microRNAs analisados possuíam entre 18 e 150 alvos. Constatou-se que processos biológicos importantes para a transição de fases e a sobrevivência do fungo no hospedeiro são regulados por microRNAs, como o metabolismo

energético e a síntese e degradação de componentes da parede celular (CURCIO et al., 2018; CURCIO et al., 2019).

No organismo modelo para o estudo dos dermatófitos, *Tricophyton rubrum*, foram identificados 170 microRNAs, um número significativamente superior àquele normalmente encontrado em fungos (DAHLMAN et al., 2015; KANG et al., 2013; WANG et al., 2018). 25 microRNAs são diferencialmente expressos entre as fases de conídio e de micélio. Estes microRNAs regulam 1526 genes, dos quais 137 são diferencialmente expressos entre as duas fases analisadas. Os genes diferencialmente expressos relacionam-se principalmente aos processos de transcrição e de processamento de RNA, sugerindo que microRNAs participam de uma rede complexa de regulação gênica neste fungo, controlando a expressão de genes através de mecanismos pré-transcricionais e pós-transcricionais. Dez microRNAs são conservados em todo o grupo dos dermatófitos, que inclui os gêneros *Microsporum*, *Epidermophyton* e *Trychophyton*. Uma análise dos alvos destes microRNAs conservados mostrou que eles tendem a regular genes homólogos entre os fungos dermatófitos, indicando a conservação deste mecanismo regulatório entre os fungos destes gêneros (WANG et al., 2018).

1.4 MicroRNAs na interação patógeno hospedeiro

Já foi demonstrado que microRNAs regulam diversos processos biológicos, como diferenciação celular, apoptose, tumorigênese e resposta imune. Tais moléculas também desempenham um importante papel na interação patógeno-hospedeiro. Neste sentido, Wang e colaboradores (2013), elucidaram a importância do microRNA miR-155 na resposta de *Mus musculus* à infecção por *Mycobacterium tuberculosis*. MiR-155 é regulado positivamente nos macrófagos, após a infecção e tem como um de seus alvos a proteína Rheb, que inibe o processo de autofagia. MiR-155, então, promove a eliminação do patógeno através da indução do processo de autofagia. Patógenos podem também alterar o perfil de expressão de microRNAs de seus hospedeiros como uma estratégia de sobrevivência. Pires e colaboradores (2017) demonstraram, ainda, que *M. tuberculosis*, regulam positivamente, nos macrófagos, a expressão de miR-106b, que tem como alvo o mRNA codificante da enzima catepsina. Esta enzima lisossomal poderia degradar a bactéria e, portanto, sua repressão aumenta as chances de sobrevivência do patógeno.

Mycobacterium avium, quando dentro de macrófagos humanos modula o perfil de expressão de miRNAs produzidos por estas células de defesa. Neste sentido, a expressão de let-

7e e miR-29a é induzida após a infecção por esta bactéria. Tais microRNAs, tem como alvo as enzimas caspase 3 e caspase 7, respectivamente. Estas enzimas fazem parte da família BCL2 e estão envolvidas no processo de ativação da via de apoptose celular, mecanismo empregado para a eliminação de patógenos intracelulares. Portanto, através da indução da expressão de let-7e e miR-29a, *M. avium* consegue inibir a apoptose das células do hospedeiro e conseqüentemente sobreviver e replicar no interior destas células, durante o desenvolvimento da infecção (SHARBATI et al., 2011). Em parasitas como *Leishmania donovani*, a modulação da expressão de miRNAs do hospedeiro também é um mecanismo caracterizado. Durante o desenvolvimento da leishmaniose visceral, o quadro de dislipidemia no hospedeiro favorece o estabelecimento da infecção. Neste sentido *L. donovani* possui uma glicoproteína de superfície chamada gp63, que degrada a enzima Dicer1 do hospedeiro presente no fígado, inibindo a síntese de miR-122. Este miRNA é exclusivo deste órgão e controla toda a homeostase lipídica, portanto a ausência deste pequeno RNA ocasiona uma desregulação da homeostase lipídica no hospedeiro, diminuindo os níveis de colesterol sérico, promovendo assim um quadro de dislipidemia o que favorece a infecção por *L. donovani* (GHOSH et al., 2013).

A infecção por *Candida albicans* e *A. fumigatus* provoca uma mudança no perfil de expressão de microRNAs em células dendríticas humanas. Dentre os microRNAs diferencialmente expressos estão miR-132-5p e miR-212-5p, que tem como alvo genes importantes para a resposta imune, como *FKBP1B*, que está relacionado à proliferação de células T, *KLF4* que é necessário para a diferenciação dos monócitos durante a resposta inflamatória e *SPN*, que codifica uma proteína de superfície encontrada em várias células do sistema imune, como, por exemplo, monócitos, neutrófilos e linfócitos T (ALDER et al., 2008; DIX et al., 2017; DUBOIS et al., 2003; REMOLD-O'DONELL et al., 1987;). A alteração do perfil de expressão de microRNAs do hospedeiro também foi observada durante a infecção por *P. brasiliensis*. Alguns dos processos possivelmente regulados pelos microRNAs diferencialmente expressos incluem a apoptose, a resposta imune e a adesão do fungo às células do hospedeiro (MARIOTO et al., 2017).

No soro de pacientes diagnosticados com paracoccidiodomicose crônica, oito microRNAs foram diferencialmente expressos, em comparação com o soro de pacientes não infectados por *P. brasiliensis*. Os microRNAs diferencialmente expressos relacionam-se aos processos de apoptose

e resposta imune (SINGULANI et al., 2017). Alterações nos níveis de microRNAs são facilmente detectáveis pela técnica de RT-PCR, o que possibilita que microRNAs diferencialmente expressos após a infecção do hospedeiro sejam utilizados como biomarcadores. De fato, microRNAs já são reconhecidos como biomarcadores para várias patologias, como câncer (LIU et al., 2012) e doenças cardíacas (GORETTI et al., 2015). Portanto, devido à importância destes miRNAs para sobrevivência de microrganismo assim como durante a progressão de doenças infecciosas, faz-se necessário a identificação e caracterização de microRNAs em *H. capsulatum*..

2. JUSTIFICATIVA

RNAs não-codificantes tem atraído atenção crescente nos últimos anos, pois estas moléculas atuam como reguladores da expressão gênica tanto em animais, plantas e fungos. Dentro da classe dos fungos alguns trabalhos já elucidaram a função destas moléculas em diferentes fases morfológicas, assim como durante o processo de transição dimórfica, evento essencial para o estabelecimento da micose. Embora os dados sobre o mecanismo regulatório mediado por miRNAs nesta classe de microrganismos estejam crescendo, a função deste pequenos RNAs regulatórios na controle da expressão gênica pós-transcricional, ainda é escassa em vários patógenos fúngicos.

Dentre estes patógenos encontra-se *H. capsulatum* o agente etiológico da histoplasmose, uma doença que apresenta altas taxas de mortalidade principalmente em indivíduos imunocomprometidos. *H. capsulatum* apresenta como característica a capacidade de realizar a transição dimórfica durante o processo infeccioso. Neste sentido, vários trabalhos apontam para a expressão diferencial de genes entre as fases parasitárias, infectantes e durante o processo de transição dimórfica, evidenciando uma fina regulação da expressão gênica neste patógeno, durante a colonização em diferentes ambientes.

Portanto, devido à presença desta regulação diferencial de genes entre os diferentes estágios morfológicos, assim como o fato deste patógeno conservar todas as enzimas necessárias para promover o silenciamento gênico induzido por microRNAs é possível que estes pequenos RNAs possam participar da regulação da expressão de gênica. Sendo assim, a descrição pela primeira vez de regiões codificadoras de miRNAs no genoma deste fungo, abre portas para elucidar como pequenos RNAs poderiam influenciar na sobrevivência e adaptação a diferentes condições como aquelas impostas pelo hospedeiro, através do mecanismo de regulação gênica pós-transcricional.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Identificar e caracterizar microRNAs em duas linhagens de *H. capsulatum*, G217B e H88, e inferir os possíveis processos regulados por estes pequenos RNAs, descritos em ambas as linhagens.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a expressão dos transcritos que codificam para as enzimas Dicers e Argonautas em *H. capsulatum* G217B;
- Obter as sequências de miRNAs descritas em outros fungos;
- Identificar miRNAs que apresentem homologia à regiões no genoma de *H. capsulatum* G217B e H88 utilizando ferramentas de bioinformática;
- Caracterizar a estrutura secundária dos possíveis precursores de miRNAs;
- Identificar os alvos dos miRNAs comuns a ambas as linhagens através de ferramentas de bioinformática;
- Inferir os processos biológicos possivelmente regulados por estes RNAs.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Condições de cultura e extração de RNA

A linhagem *H. capsulatum* G217B foi escolhida para os experimentos de RT-PCR para validar a expressão dos transcritos codificadores de dicers e argonautas. O experimento foi realizado em duplicata. As células *H. capsulatum* G217B foram cultivadas na fase de levedura em meio *Histoplasma macrophage medium* por 18 h a 37°C a 150 rpm (WORSHAM & GOLDMAN, 1988). Posteriormente, as células foram coletadas por centrifugação a 10000 x g durante 10 min. O sedimento contendo as células foram utilizados para extração de RNA pelo método de TRIzol (Tri Reagent, Sigma).

4.2 Detecção dos transcritos codificadores de dicers e argonautas por RT-PCR

Após a obtenção dos RNAs, as amostras foram tratadas com DNase (RQ1 RNase free DNase, Promega) e subsequentemente submetidas a transcrição reversa utilizando o kit da SuperScript III First-Strand Synthesis (Invitrogen, Life Technologies), conforme as descrições do fabricante. Os cDNAs obtidos foram empregados na reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), para detecção dos transcritos codificadores de dicers e argonautas. A reação foi feita nas seguintes condições: 2 min a 94 °C, seguidos de 40 ciclos a 45 °C por 15 segundos, 62°C por 20 segundos e 72 °C por 20 segundos e uma etapa final de alongamento a 72°C por 5 minutos. Os produtos da reação foram observados em gel de agarose 1.5 % (p/v). As sequências dos oligonucleotídeos para os genes *Dicer-1* (número de acesso: XM_001542438.1), *Dicer-2* (número de acesso: XM_001541790.1), *Argonauta-1* (número de acesso: XM_024228661.1), *Argonauta-2* (número de acesso: XM_001538543.1) e para o controle endógeno *Fator de Elongamento da Tradução 3 (FET-3)* (número de acesso: XM_001541845.1) são descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Sequências *forward* e *reverse* dos oligonucleotídeos.

Gene	Nº de acesso	Oligonucleotídeo <i>forward</i>	Oligonucleotídeo <i>reverse</i>
<i>FET-3</i>	XM_001541845.1	TGAAGAAGCACTCGCAAACAA	GACAAGGGCAACAGCGGCAGC
<i>Dicer-1</i>	XM_001542438.1	CCCCTCAGGTGAACTACTTC	CATCGCCAGCCTTTTG
<i>Dicer-2</i>	XM_001541790.1	GGCTTACATCTCCACCACAC	GCTTATCGCAGTGATGACAAC
<i>Ago-1</i>	XM_024228661.1	CAATTGACGTGACCGACAGG	CGCTTGGACGAGTGACTGC
<i>Ago-2</i>	XM_024228661.1	GTACAACCATATAAAGTATAGGG	CTGGGGCTGGATGTGTCAC

4.3 Predição *in silico* de miRNAs em *H. capsulatum* G217B e H88

Todas as etapas empregadas na caracterização de miRNAs no genoma de *H. capsulatum* G217B e H88 são demonstradas no fluxograma abaixo. Inicialmente foram obtidas na literatura sequências de miRNAs maduros em outros fungos. 210 microRNAs foram descritos em nove espécies de fungos: *F. oxysporum*, *P. marneffei*, *T. reesei*, *N. crassa*, *P. chrysogenum*, *C. neoformans*, *P. brasiliensis*, *S. sclerotiorum* e *M. anisopliae* (CHEN et al., 2014; DAHLMANN & KÜCK, 2015; FULCI & MACINO, 2007; JIANG et al., 2012; KANG et al., 2013; LAU et al., 2013; LEE et al., 2010; ZHOU et al., 2012; ZHOU et al., 2012). As sequências de miRNAs foram submetidas ao blastn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch) contra o genoma de *H. capsulatum* H88 e *H. capsulatum* G217B com um valor de *threshold* $E < 0,10$. Foram selecionados alinhamentos de, no mínimo, 16 pares de base e identidade de no mínimo, 95% (DEHURY et al., 2013). Os resultados foram convertidos em um arquivo GFF contendo informação sobre a posição dos genes no genoma. A ferramenta IntersectBED do pacote BEDTools (QUINLAN & HALL, 2010) foi empregada para determinar a posição dos alinhamentos em relação aos genes. Os alinhamentos que ocorreram dentro de regiões codificadoras de genes foram descartados e somente foram utilizados os alinhamentos ocorrendo em regiões intergênicas. As regiões de alinhamento foram consideradas possíveis sequências de microRNAs maduros.

4.4 Determinação da estrutura secundária dos potenciais precursores de miRNAs

Trabalhos anteriores em fungos identificaram que os pre-microRNAs contém, normalmente, de 35 a 50 nucleotídeos, antes do início e depois do final da sequência do microRNA (CHEN et al., 2014; DAHLMANN & KÜCK, 2015). Portanto, a partir da lista de microRNAs hipotéticos identificados foram geradas duas listas de possíveis pre-microRNAs,

uma delas contendo 35 nucleotídeos antes do início e depois do final da sequência do microRNA maduro e a outra contendo 50 nucleotídeos antes do início e depois do final da sequência do microRNA. A estrutura secundária destes possíveis precursores de microRNAs foi predita com o uso da plataforma RNAFold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>) (LORENZ et al., 2011). Uma vez obtidas as figuras das estruturas secundárias dos pre-microRNAs, verificou-se de forma manual se os precursores possuíam as seguintes características: (i) se o pre-microRNA se dobrava na forma de *hairpin*; (ii) se o valor da energia mínima de dobramento (MFE) era inferior a -7 kcal/mol; (iii) se a região contendo o duplex milRNA/milRNA possuía no máximo 6 nucleotídeos não-complementares. As sequências que possuíam estas características foram consideradas pre-microRNAs válidos (DEHURY et al., 2013). As etapas das análises bioinformáticas são ilustradas na Figura 6.

4.5 Caracterização dos alvos e classificação funcional

O microRNA comum às linhagens H88 e G217B foi selecionado para a investigação de seus alvos. Procurou-se regiões complementares ao microRNA na extremidade 3'-UTR dos genes. A busca foi realizada através do *software* RNAHybrid (REHMSMEIER, 2004) com a utilização dos seguintes parâmetros: -f 2, 7 para exigir complementariedade total na região entre os nucleotídeos 2 e 7 (região *seed*); -e -20 requerendo uma energia livre mínima da molécula hibridizada inferior a -20 kcal/mol e -p 0,05 para definir como significativo um p-valor $< 0,05$ (LEWIS et al., 2005). A anotação funcional dos alvos foi realizada através da consulta ao *site* <https://fungidb.org/fungidb/> (STAJICH et al., 2012) e ao banco de dados Gene Ontology (ASHBURNER et al., 2000; THE GENE ONTOLOGY CONSORTIUM, 2018).

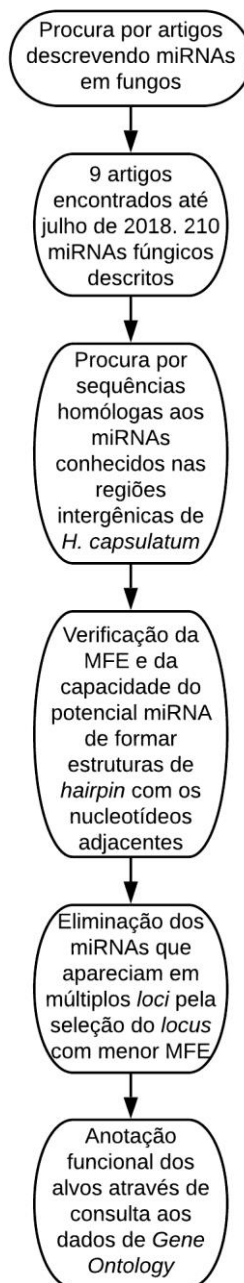


Figura 6. Fluxograma da busca por regiões do genoma de *H. capsulatum* homólogas a microRNAs já descritos em outros fungos. As etapas para predição de miRNAs em *H. capsulatum* G217B e H88, empregam buscas por sequências homólogas de miRNAs e ferramentas de bioinformática como Blast, RNAFOLD e RNAhybrid.

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização da expressão dos transcritos codificadores de Dicers e Argonautas no genoma de *H. capsulatum* G217B

Alguns trabalhos na literatura já demonstraram a conservação de proteínas dicers e argonautas no genoma de *H. capsulatum*, caracterizando *in silico* a presença de domínios nestas proteínas essenciais para o processamento de miRNAs e clivagem no mRNA alvo (LAU et al., 2013; CURCIO et al., 2019). Portanto, devido a conservação da maquinaria de silenciamento gênico pós transcricional, no genoma deste fungo, as análises de RT-PCR foram realizadas para validar se estas regiões gênicas de fato eram transcritas. Observa-se no gel de agarose bandas correspondentes às proteínas Dicer-1, Dicer-2 e Argonauta-1 (Figura 7), indicando que *H. capsulatum* possui e expressa os transcritos codificadores das proteínas necessárias para síntese de microRNAs. A expressão de Argonauta-2 não pôde ser observada através da reação.

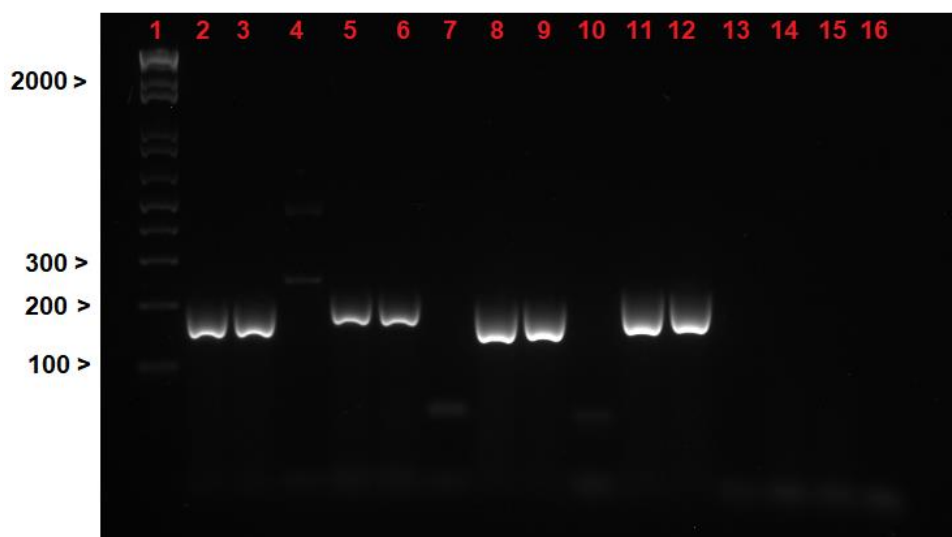


Figura 7. Reação de RT-PCR em *H. capsulatum* G217B. Linha 1: marcador 1 kb; linhas 2 e 3: FET-3, em *H. capsulatum* G217B; linha 4: controle negativo; linhas 5 e 6: Dicer-1, em *H. capsulatum* G217B; linha 7: Dicer-1, controle negativo; linhas 8 e 9: Dicer-2, em *H. capsulatum* G217B; linha 10: Dicer-2, controle negativo; linhas 11 e 12: Argonauta-1, em *H. capsulatum* G217B; linha 13: Argonauta-1, controle negativo; linhas 14 e 15: Argonauta-2, em *H. capsulatum* G217B; linha 16: Argonauta-2, controle negativo.

5.2 Determinação dos potenciais miRNAs contidos no genoma de *H. capsulatum*

O alinhamento das sequências de miRNAs fúngicos descritos na literatura utilizando a ferramenta BLAST com as regiões intergênicas de *H. capsulatum* G217B e H88 resultou em 114 regiões de alinhamento em G217B e 100 em H88. Após a avaliação da estrutura secundária dos

possíveis microRNAs pela plataforma RNAFold conforme os critérios descritos por Dehury et al. (2013), foram obtidos 31 microRNAs hipotéticos em G217B (Tabela suplementar 1) e 27 em H88 (Tabela suplementar 2). Destes alguns eram repetidos, ou seja, possuíam a mesma sequência madura. Após a remoção das repetições, seguindo o critério da escolha do pre-microRNA com a menor MFE, obtivemos o número de 4 microRNAs em G217B e 6 microRNAs em H88. Os microRNAs de G217B são homólogos aos microRNAs man-miR-4, de *M. anisopliae*, Tre-miR-5, de *T. reesei* e SS-miR-2 e SS-miR-C17, de *S. sclerotiorum*. Os miRNAs apresentam uma média de MFE de -28,02 kcal/mol e o maior valor de MFE foi de -22,75 kcal/mol, em Super.:1078715-1078833(-), e o menor foi de -41,19 kcal/mol, em Super.:1078715-1078833(-) (Tabela 2).

Tabela 2. MicroRNAs identificados no genoma de *H. capsulatum* G217B.

MicroRNA ^A	Sequência precursora ^B	Sequência madura ^C	Fungo de origem/MFE (kcal/mol) ^D	E-valor
Super65.:659470-659586(-)	TCTGACTGTTATGATAAGTATTTTCTTAACTATTTTCATATACTATTTCAAGCAGAAAGCTG ATCTTCTCACTTCTGTCTGTGTGCTTGCTGACTGTGTGCAGCCACTGTATCAGA	AGCAGAAGCT GATCTT	<i>Metarhizium anisopliae</i> -man- milR-4/(-25,25)	0,063
Super1161.:1078715-1078833(-)	AAGAGTCAACCCGACGAGCAGCTCTCTCGAGGTGAAAAGGTGTCATATCAGGAGCTGGA GGAGGACTGGTCGGCGGGCGGGCGTGGTGAAAAGTGTCTTGCTCCTCCAGCCTTTTTGTTC	GGAGCTGGAG GAGGACTG	<i>Trichoderma reesei</i> - Tre- milR-6/(-41,19)	0,004
Super47.:496012-496128(-)	TGGATTCCCTAACAAATTGTACTGTACCTATCTATGCTCAAAGATGGTTGAGGATTCCTTT ATATACAATTGGTGAAATGTGGCGGTATTGAGATTGGGTTAGTTACAAACTTCGC	GGATTTCCTT TATATA	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> -SS- milR-2/(-22,75)	0,047
Super134.:98790-98907(-)*	CTCAGATCCCCATTGAACTGAGACAATGAACTTGTCAGCCCCGCGTAGTGGATGGATG GATGGATGGATGGATGGACTTGAATTGAATTTCTCAAGATAAAAAAGTATGACATTA	TGGATGGATG GATGGAT	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> -SS- milR-C17(-22,88)	0,014

A: O asterisco (*) indica o microRNA comum às duas linhagens analisadas;

B: Sequência do pre-miRNA predita por análises *in silico*;

C: Sequência do miRNA maduro predita por análises *in silico*;

D: Nome dos microRNAs descritos em outros fungos/ Energia livre de dobramento (MFE) predita pela plataforma RNAFold.

Os microRNAs de H88 são homólogos de man-miR-4, de *M. anisopliaei*, SS-miR-C17, de *S. sclerotiorum*, e miR-8, miR-12, miR-14 e miR-28, de *P. chrysogenum*. A média da MFE dos pre-miRNAs de H88 é -26,71 kcal/mol. Os valores da energia livre de dobramento estão entre -16,69 kcal/mol, em DS990642.1:862036-862152(-), e -36,17 kcal/mol, em DS990637.2:504872-504990(+). Os únicos microRNAs possuindo a mesma sequência madura em ambas as linhagens são homólogos de SS-miR-C17. São denominados Super.:98790-98907(-), em G217B, e DS990642.1:1693465-1693582(-), em H88. Por este motivo, foram escolhidos para a investigação de seus alvos.

Tabela 3. MicroRNAs identificados no genoma de *H. capsulatum* H88.

MicroRNA ^A	Sequência precursora ^B	Sequência madura ^C	Fungo de origem/MFE (kcal/mol) ^D	E-valor
DS990638.1:4536 694-4536811(+)	CTGCTGTCAGATTCTCAATGAACCTCTCTTCTGTGGTCTTCAGTTCAGCAGAGCAGAAGC TGATCTTTGTAAGAAGATCAATTCAATTCTTATGAAGATCACCCTTACCCTGA	GAGCAGAAG CTGATCTT	<i>Metarhizium anisopliae</i> -man- milR-4/(-31,06)	0,015
DS990637.2:5048 72-504990(+)	CTCCAGTGCTATTTCCGCCATGGTTCAGGCCGCCGACGCCGATTGCAGGTGTCGTAGC ATCGAAGTATCAACGTATCGAAGTTTCGCAGTTCGCCAGTCTCACGGTGCAGGGTCCG	GTGTCGTAG CATCGAAGT	<i>Penicillium chrysogenum</i> -milR- 14/(-32,07)	0,005
DS990642.1:8620 36-862152(-)	ATGTTGTCTAGATGGAAATTCTGTACTAAACAATCAATATAGCATCTCAATATCAATTTT ATACAGTCATTAGAGTGATATTCAATCTCTATATCTAAGTATTTAAAGATTCTTT	TATCAATTTT ATACAG	<i>Penicillium chrysogenum</i> -milR- 12/(-16,69)	0,053
DS990642.1:1693 465-1693582(-)*	GACGTAGATAGCGATCAGCCAGATCGTCCCACGGGCAGCACATATGTCTGGATGGAT GGATGGATGGATGGATTGATGCACCGAGTCTGTACGTATGCAGTCTGGATGTACTGCA	TGGATGGAT GGATGGAT	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> -SS- milR-C17/(-36,17)	0,014
DS990636.1:2505 793-2505909(-)	GTGTGGAAGAGTTTGAGGGAATGGCTACTTTGACTGAAGCATAGAGAAGGTGTCAAGAT TGATGATTCTGCTTTGGATGAACTATGATTACTGTCTGGATGTTCTTGCATTGTGTG	TGTCAAGAT TGATGAT	<i>Penicillium chrysogenum</i> -milR- 8/(-21,98)	0,053
DS990640.1:3100 579-3100666(+)	ACCGATGAAGACTGAGTGCTGTGGTGATAGTACTTTTAGCATGCATGGTATTTTCGTGTC TTGGCTATATGTAAGGGTTGAGCTGACT	TTAGCATGC ATGGTATT	<i>Penicillium chrysogenum</i> -milR- 28/(-21,74)	0,012

A: O asterisco (*) indica o microRNA comum às duas linhagens analisadas;

B: Sequência do pre-miRNA predita por análises *in silico*;

C: Sequência do miRNA maduro predita por análises *in silico*;

D: Nome dos microRNAs descritos em outros fungos/ Energia livre de dobramento (MFE) predita pela plataforma RNAFold.

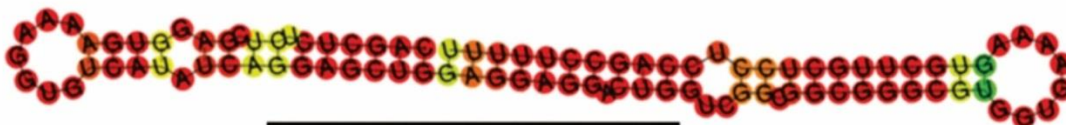
As imagens geradas pela plataforma RNAFold demonstram que todos os precursores microRNA possuem a forma característica de *hairpin*. Os microRNAs identificados no genoma de *H. capsulatum* G217B possuem uma sequência madura cujo número de nucleotídeos varia de dezesseis a dezoito (Figura 8A). Os microRNAs identificados no genoma de *H. capsulatum* H88 possuem uma sequência madura cujo número de nucleotídeos varia, também, de dezesseis a dezoito (Figura 8B). O tamanho dos microRNAs identificados neste estudo é ligeiramente inferior àquele relatado para a maior parte dos fungos, como *S. sclerotiorum*, cujos miRNAs possuem de 20 a 24 nucleotídeos (ZHOU et al., 2012), *P. marneffei*, cujos miRNAs possuem de 17 a 24 nucleotídeos (LAU et al., 2013), e *M. anisopliae*, que possui miRNAs constituídos de 20 a 23 nucleotídeos (ZHOU et al., 2012). No entanto, os microRNAs identificados por análises bioinformáticas em *P. brasiliensis*, exibem o mesmo tamanho daqueles identificados no presente trabalho, variando de 16 a 18 nucleotídeos (CURCIO et al., 2019).

A

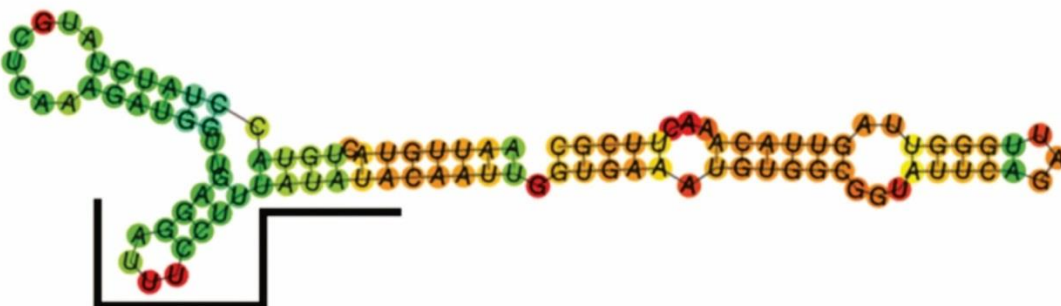
1) Super65.654970-659586(-)



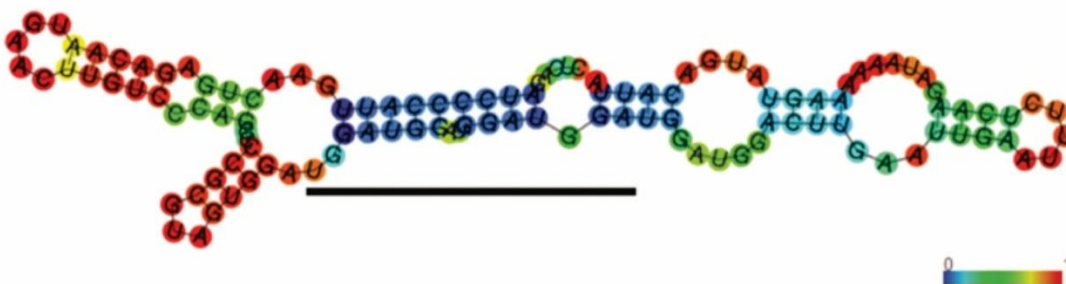
2) Super.1161:1078715-1078833(-)



3) Super.47:496012-496128(-)



4) Super.134:98790-98907(-)

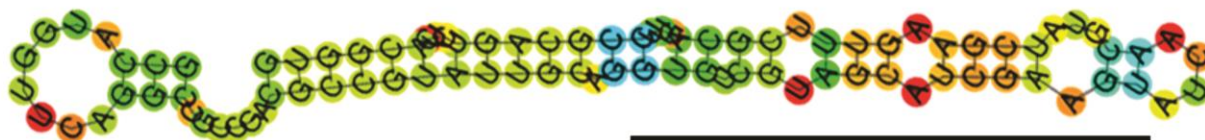


B

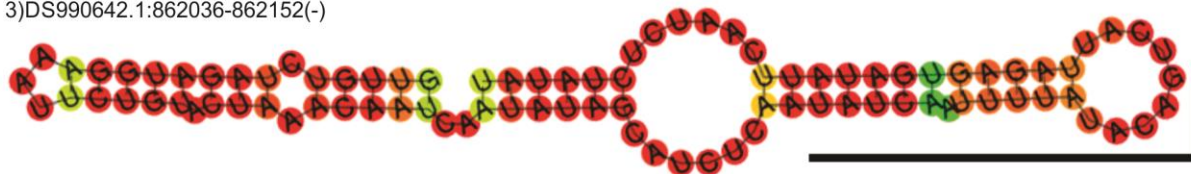
1)DS990638.1:4536694-4536811(+)



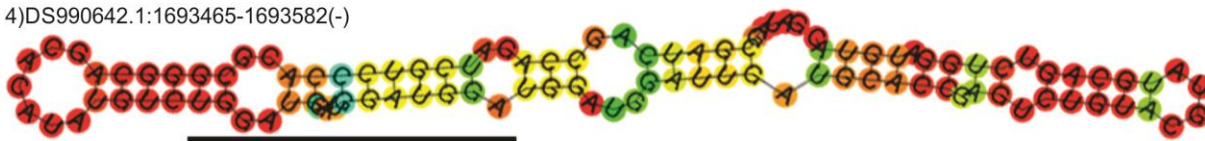
2)DS990637.2:504872-504990(+)



3)DS990642.1:862036-862152(-)



4)DS990642.1:1693465-1693582(-)



5)DS990636.1:2505793-2505909(-)



6)DS990640.1:3100579-3100666(+)

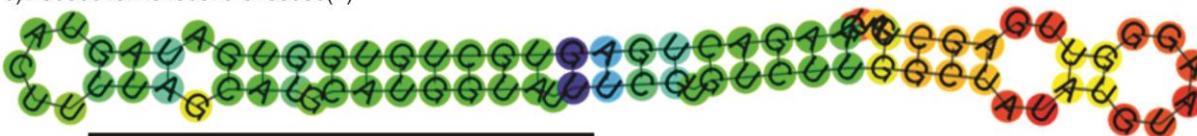


Figura 8. Representação das estruturas secundárias de microRNAs em *H. capsulatum* G217B (A) e H88 (B). A barra preta indica a sequência do microRNA maduro. As estruturas dos pre-microRNAs reais podem ser um pouco maiores ou menores do que mostrado nas imagens. As bases são coloridas de acordo com a probabilidade de que sejam complementares, de menos provável (azul) a mais provável (vermelho). As imagens foram geradas pela plataforma RNA fold.

5.3 Determinação dos alvos e processos potencialmente regulados por miRNAs em *H. capsulatum*

Foram encontrados 495 genes regulados por microRNAs na linhagem de *H. capsulatum* G217B (Tabela Suplementar S1) e 551 na linhagem H88 (Tabela Suplementar S2). Estudos prévios demonstraram que microRNAs fúngicos podem regular um grande número de genes (LAU et al., 2013; CURCIO et al., 2019). Foram feitas tabelas contendo a classificação funcional de todos os alvos identificados a partir da base de dados *Gene Ontology* (ASHBURNER et al., 2000). Os alvos preditos para o microRNA comum às duas linhagens incluem genes importantes para o processo infeccioso, como aqueles que codificam a quitinase e a β -1,3-glucana-sintase, envolvidas no metabolismo de componentes da parede. Também foram preditos os genes codificantes da citocromo c peroxidase e da superóxido dismutase dependente de manganês, envolvidos na resposta ao estresse oxidativo (Tabela 4).

Tabela 4. Processos biológicos preditos como regulados por microRNA nas linhagens H88 e G217B relevantes para o processo infeccioso de *H. capsulatum*.

Gene	<i>H. capsulatum</i> H88 ^A	<i>H. capsulatum</i> G217B ^B
Síntese/degradação de componentes da parede		
<i>Quitinase</i>	HCEG_05378	HISTO_GL.Contig.fgenes_h_plus.11
<i>Quitina sintase</i>	HCEG_07186	-
<i>β-1,3-glucana-sintase</i>	HCEG_01797	-
<i>Glicosiltransferase</i>	HCEG_01533	HISTO_EA.Contig33.fgenes_histo.230
Resposta ao estresse oxidativo		
<i>Citocromo c peroxidase</i>	HCEG_00837	-
<i>Superóxido dismutase 2 (SOD2)</i>	HCEG_01927	HISTO_ZZ.Contig127a.Fgenes_h_Aspergillus.87
Transporte de metais		
<i>Transportador de cobre de baixa afinidade (ctr2-like)</i>	HCEG_09121	-
<i>Transportador de níquel de alta afinidade</i>	HCEG_01116	-

A: Número de acesso do gene no *site* fungidb.org/;

B: Nome do gene atribuído pelo *Washington University Genome Sequencing Center* (2005). O hífen (-) indica que o gene não foi identificado como regulado por microRNA nesta linhagem.

6. DISCUSSÃO

Trabalhos anteriores já demonstraram a presença de proteínas Dicers e Argonautas no genoma de *H. capsulatum* sendo dois genes parálogos de Dicer (Dicer-1 e Dicer-2) e dois genes parálogos de Argonauta (Argonauta-1 e Argonauta-2). A conservação e a quantidade destas proteínas está de acordo como os dados apresentados para outros fungos patogênicos como *A. fumigatus* (JANBON et al., 2010), *C. neoformans* (JIANG et al., 2012) e *P. brasiliensis* (CURCIO et al., 2019), os quais também possuem dois genes parálogos para Dicers e dois genes parálogos para Argonautas. Neste sentido, no presente trabalho a expressão dos transcritos codificadores de dicer 1 e 2 e de Ago-1 foram detectados. Entretanto, o transcrito codificador para proteína Argonauta-2, não pôde ser amplificado, mesmo após a repetição do experimento em diferentes condições de temperatura de anelamento. Estes resultados demonstram que além de conservar proteínas envolvidas no processamento de miRNAs, os transcritos codificadores destas proteínas são expressos neste patógeno.

Após a confirmação inicial da expressão dos transcritos codificadores das proteínas envolvidas no processamento de miRNAs, uma segunda análise foi realizada para predizer possíveis regiões no genoma de dois isolados de *H. capsulatum* que potencialmente seriam regiões codificadoras de miRNAs. Neste sentido, as análises *in silico* permitiram a identificação de quatro microRNAs em *H. capsulatum* G217B e seis microRNAs em *H. capsulatum* H88. A estrutura no formato característico de *hairpin* foi observada em todos os microRNAs preditos. Além disso, trabalhos anteriores relataram uma energia mínima livre de precursores de microRNA entre -17,86 kcal/mol, em *P. marneffei*, e -105,32 kcal/mol, em *M. anisopliae* (LAU et al., 2013; ZHOU et al., 2012). Os valores relatados no presente trabalho, variam de -16,69 kcal/mol, em DS990642.1:862036-862152(-), a -41,19 kcal/mol, em Super1161:1078715-1078833(-), e, portanto, estão de acordo com aqueles relatados na literatura. O miRNA DS990636.1:2505793-2505909(-) apresenta uma região de alinhamento de 16 nucleotídeos com o miRNA Supercontig_2.24_41376- de *P. brasiliensis*. O miRNA DS990642.1:862036-862152(-) também possui uma região de alinhamento de 16 nucleotídeos com o miRNA Supercontig_2.22_40198+ de *P. brasiliensis*. A homologia entre estes miRNAs pode indicar uma conservação desse mecanismo regulatório entre estes dois fungos termodimórficos.

Após as análises das características estruturais destas moléculas e determinação das sequências dos potenciais miRNAs, a análise dos processos biológicos regulados por esses pequenos RNAs foi realizada. Sabe-se que a parede celular da fase de levedura contém uma quantidade maior de quitina do que a parede celular da fase de micélio (DOMER, 1971). A quitinase foi identificada como alvo em ambas as linhagens. Inglis e colaboradores (2013) demonstraram que a quitinase é induzida durante a fase de micélio em *H. capsulatum* G217B. Quitina sintase foi identificada como regulada por microRNAs na linhagem H88, mas não em G217B.

β -1,3-glucana é o componente mais abundante da parede celular de *H. capsulatum*. Esta molécula é mais abundante na fase micelial do que na fase leveduriforme (DOMER, 1971). A redução dos níveis de β -1,3-glucana na parede é uma estratégia utilizada pelo fungo para evitar o reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro (SIL, 2019). Durante a fase leveduriforme, *H. capsulatum* sintetiza α -1,3-glucanas para recobrir as moléculas de β -1,3-glucana e evitar a resposta imune (GARFOOT & RAPPLEYE, 2015). É possível que glicosiltransferase seja regulada em períodos onde o metabolismo de componente de parede seja mais intenso, como durante a transição dimórfica, e que essa regulação seja efetuada por microRNAs. Esta hipótese, no entanto, ainda precisa ser confirmada experimentalmente por estudos posteriores.

A enzima superóxido dismutase 2 (SOD2) é uma enzima dependente de manganês e se localiza na mitocôndria (CARVALHO et al., 2017). Esta enzima é importante para lidar com o estresse oxidativo proveniente das etapas do metabolismo energético que ocorrem nesta organela (NARASIPURA et al., 2005). Identificamos em ambas as linhagens esta enzima como sendo regulada por microRNAs. O papel de citocromo peroxidase C (ccp) para o processo infeccioso de *H. capsulatum* não foi elucidado por estudos, embora Inglis e colaboradores (2013) tenham observado um aumento de quatro vezes na expressão dessa enzima na fase leveduriforme, em comparação com a fase micelial. No fungo *P. brasiliensis*, pertencente à mesma família de *H. capsulatum*, demonstrou-se que ccp é responsável pela resistência ao estresse nitrosativo (PARENTE et al., 2015). Posteriormente, foi demonstrado que ccp é responsável pela resistência ao estresse oxidativo que *P. brasiliensis* sofre no interior do macrófago. A observação de que a sobrevivência de *P. brasiliensis* no macrófago depende de ccp e de que a carga fúngica em modelos murinos é atenuada em linhagens deficientes em ccp demonstram que este gene é um

fator de virulência neste fungo (PARENTE-ROCHA et al., 2015). É possível que a expressão diferencial de *ccp* entre as fases morfológicas seja regulada por miRNAs, o que poderia ser confirmado através de experimentos com a deleção do miRNA.

Um transportador de níquel de alta afinidade foi identificado como um alvo de microRNA em *H. capsulatum* H88. Níquel é um metal constituinte de várias metaloproteínas envolvidas no metabolismo energético e de nitrogênio (MULROONEY e HAUSINGER, 2003). Sabe-se que transportadores de alta afinidade são necessários para a obtenção de níquel em vários microorganismos que vivem no solo, uma vez que este metal é encontrado somente em quantidades vestigiais em ambientes naturais (RODIONOV et al., 2006). No fungo *N. crassa* a obtenção de níquel depende do transportador de níquel de alta afinidade TNC. Linhagens mutantes para este transportador exibem defeitos no seu crescimento, confirmando que um transportador de níquel de alta afinidade é necessário para a obtenção de níveis fisiológicos deste micronutriente (TIWARI et al., 2011). A regulação deste transportador pode relacionar-se a diferentes condições de privação e disponibilidade deste metal, o que pode ser verificado posteriormente através da comparação dos níveis do miRNA em fungos crescidos sob estas condições. O transportador de cobre identificado é uma proteína ainda não caracterizada experimentalmente. Análises bioinformáticas revelaram que esta proteína é homóloga de transportadores de cobre de baixa afinidade de diversos fungos, como *Cenococcum geophilum* e *Metarhizium rileyi*. Verificamos também que ela possui três domínios transmembrana, o que é uma característica encontrada em todos os transportadores *ctr-2*, de baixa afinidade. Estas informações sugerem que esta proteína não caracterizada poderia atuar como um transportador *ctr-2*. Altas concentrações de cobre são tóxicas para os fungos patogênicos (REES et al., 2004). Uma estratégia utilizada por fungos para resistir à toxicidade do cobre consiste em armazenar este metal em vacúolos, impedindo, assim, que ele interaja com moléculas na célula. Quando o fungo não encontra mais um excesso de cobre no ambiente, as reservas vacuolares de cobre podem ser disponibilizadas para a células através da ação de *ctr-2*, que se localiza na membrana vacuolar (PORTNOY et al., 2001). É razoável supor que a expressão de *ctr-2* varie em função da disponibilidade de cobre, embora essa hipótese ainda não tenha sido confirmada em nenhum fungo patogênico. Caso *ctr-2* seja de fato diferencialmente expresso sob diferentes concentrações de cobre, a interação do microRNA analisado com o mRNA de *ctr-2* poderia ser um mecanismo regulatório. A figura 9 ilustra processos biológicos importantes para o processo infeccioso de *H.*

capsulatum que possivelmente são regulados pelo microRNA Super134.:98790-98907(-) em *H. capsulatum* G217B e DS990642.1:1693465-1693582(-) em *H. capsulatum* H88.

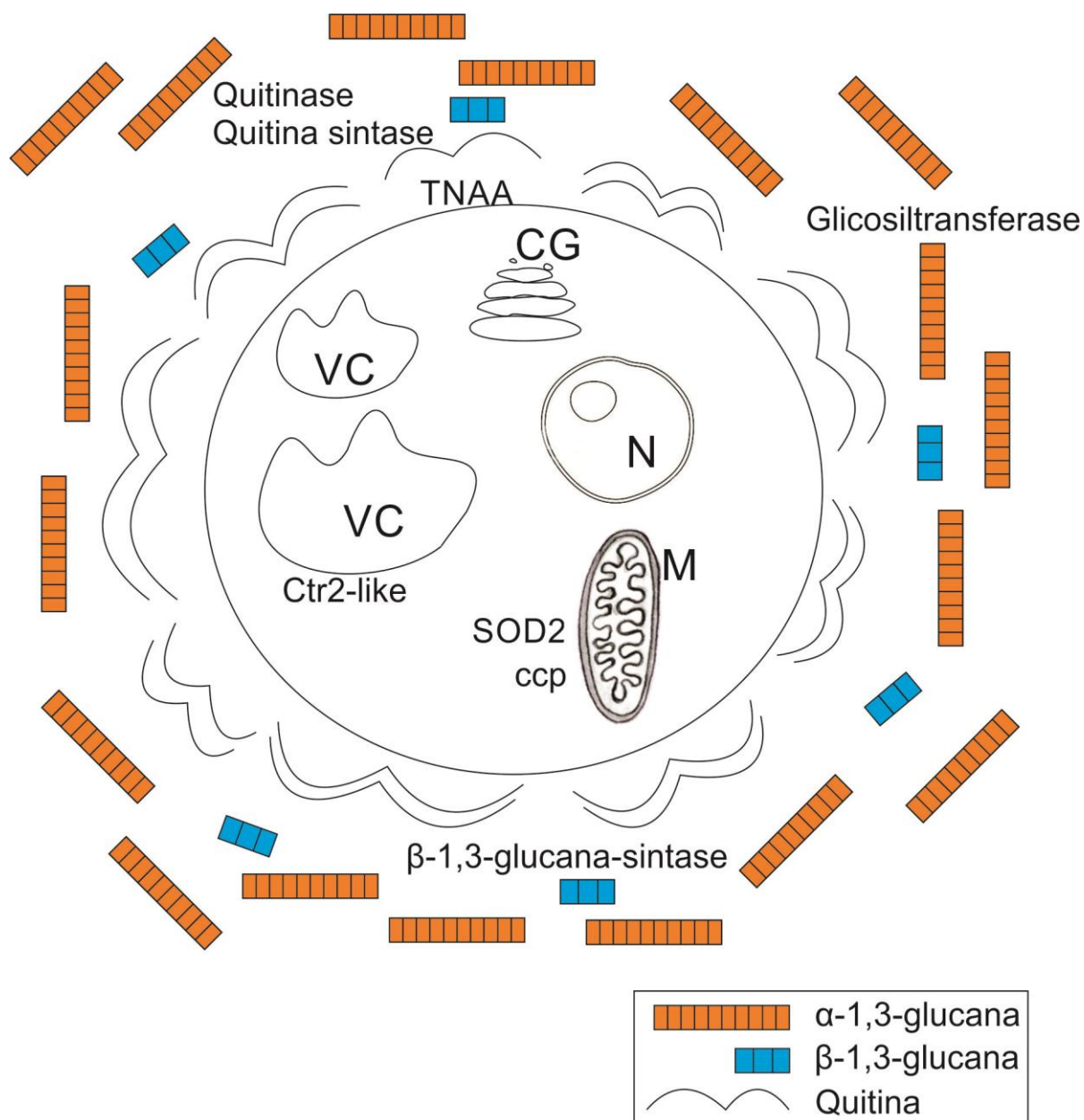


Figura 9. Genes preditos como regulados pelo microRNA Super134.:98790-98907(-), em *H. capsulatum* G217B, e DS990642.1:1693465-1693582(-), em *H. capsulatum* H88. Alguns dos processos biológicos possivelmente regulados pelo microRNA homólogo de SS-milR-C17 são a síntese e a degradação de componentes da parede celular, a resposta ao estresse oxidativo e o transporte de metais. Ccp = citocromo c peroxidase. Ctr2-like: transportador similar a Ctr2. CG = complexo de Golgi. M = mitocôndria. N = núcleo. VC = vacúolo. SOD2 = superóxido dismutase 2. TNAA = Transportador de níquel de alta afinidade.

7- CONCLUSÃO

De maneira geral, estes resultados indicam a conservação de uma complexa rede de regulação pós-transcricional efetuada por microRNAs neste fungo, possivelmente envolvidas com processos importantes para a transição dimórfica, assim como se demonstrou para o fungo dimórfico *P. brasiliensis*.

Portanto, este trabalho abre perspectivas para uma melhor compreensão da fisiologia de *H. capsulatum* através da confirmação experimental da interação dos microRNAs identificados com seus alvos preditos por esta análise de bioinformática. A interação do microRNA conservado com os genes transportadores de metais pode ser investigada através da comparação do perfil de expressão de miRNAs de células de *H. capsulatum* crescendo sob diferentes concentrações de metais; a interação com fatores de resistência ao estresse oxidativo poderia ser investigado pela comparação do perfil de microRNAs em condições normais e de estresse oxidativo; e a interação com proteínas do metabolismo de componentes da parede celular poderia ser investigada através de estudos comparativos entre ambas as fases morfológicas, quando ocorrem mudanças significativas na composição da parede celular. Além disso o silenciamento gênico de regiões codificadoras destes miRNAs poderiam elucidar se realmente a regulação destes transcritos está sob o controle pós-transcricional mediado por estes pequenos RNAs.

8. REFERÊNCIAS

ALDER, Jonathan K. et al. Kruppel-Like Factor 4 Is Essential for Inflammatory Monocyte Differentiation In Vivo. **The Journal Of Immunology**, [s.l.], v. 180, n. 8, p.5645-5652, 2008.

AZAR, M.; HAGE, C.. Clinical Perspectives in the Diagnosis and Management of Histoplasmosis. **Clinics In Chest Medicine**, [s.l.], v. 38, n. 3, p.403-415, 2017.

ASHBURNER, M. et al. Gene Ontology: tool for the unification of biology. **Nature Genetics**, [s.l.], v. 25, n. 1, p.25-29, 2000.

ADENIS, A. et al. Burden of HIV-associated histoplasmosis compared with tuberculosis in Latin America: a modelling study. **The Lancet Infectious Diseases**, [s.l.], v. 18, n. 10, p.1150-1159, 2018.

BONIFAZ, A.; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, D.; PERUSQUÍA-ORTIZ, A.. Endemic systemic mycoses: coccidioidomycosis, histoplasmosis, paracoccidioidomycosis and blastomycosis. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, [s.l.], v. 9, n. 9, p.705-715, 2011.

CARRANZA, A. et al. Effects of chlorogenic acid on thermal stress tolerance in *C. elegans* via HIF-1, HSF-1 and autophagy. **Phytomedicine**, [s.l.], v. 66, p.13-18, 2020.

CARVALHO, M.; MESQUITA, J.; ELEUTHERIO, E. In Vivo Characterization of I91T Sod2 Polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal Of Cellular Biochemistry**, [s.l.], v. 118, n. 5, p.1078-1086, 2017.

CATALANOTTO, C. et al. Redundancy of the Two Dicer Genes in Transgene-Induced Posttranscriptional Gene Silencing in *Neurospora crassa*. **Molecular And Cellular Biology**, [s.l.], v. 24, n. 6, p.2536-2545, 2004.

CHEN, R. et al. Exploring MicroRNA-Like Small RNAs in the Filamentous Fungus *Fusarium oxysporum*. **Plos One**, [s.l.], v. 9, n. 8, p.104-122, 2014.

CURCIO, J. et al. Cell Wall Synthesis, Development of Hyphae and Metabolic Pathways Are Processes Potentially Regulated by MicroRNAs Produced Between the Morphological Stages of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 9, p.1-13, 2018.

CURCIO, J. et al. In silico characterization of microRNAs-like sequences in the genome of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Genetics And Molecular Biology**, [s.l.], v. 42, n. 1, p.95-107, 2019.

DAHLMANN, T.; KÜCK, U.. Dicer-Dependent Biogenesis of Small RNAs and Evidence for MicroRNA-Like RNAs in the Penicillin Producing Fungus *Penicillium chrysogenum*. **Plos One**, [s.l.], v. 10, n. 5, 2015.

DARLING, S.. Protozoan general infection producing pseudotubercles in the lungs and focal necrosis in the liver, spleen, and lymph nodes. **Journal of the American Medical Association**, [s.l.], v. 46, p.1283-1285, 1906.

DE, D.; NATH, U.. Disseminated Histoplasmosis in Immunocompetent Individuals- not a

so Rare Entity, in India. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.3–7, 2015.

DEHURY, B. et al. In silico identification and characterization of conserved miRNAs and their target genes in sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) Expressed Sequence Tags (ESTs). **Plant signaling & behavior**, [s.l.], v. 8, n. 12, p. 1–13, 2013.

DENLI, A. et al. Processing of primary microRNAs by the microprocessor complex. **Nature**, [s.l.], v. 432, n. 7014, p. 231–235, 2004.

DIX, A. et al. Specific and Novel microRNAs Are Regulated as Response to Fungal Infection in Human Dendritic Cells. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 8, fev. 2017.

DOMER, J.. Monosaccharide and chitin content of cell walls of *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces dermatitidis*. **Journal Of Bacteriology**, [s.l.], v. 107, n. 3, p.870-877, 1971.

DUBOIS, S. et al. Distinct pathways involving the FK506-binding proteins 12 and 12.6 underlie IL-2-versus IL-15-mediated proliferation of T cells. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 100, n. 24, p.14169-14174, 2003.

DURKIN, M. et al. Chronic infection and reactivation in a pulmonary challenge model of histoplasmosis. **The Journal of infectious diseases**, [s.l.], v. 183, n. 12, p. 1822–1824, 2001.

FALCI, D. et al. Histoplasmosis, An Underdiagnosed Disease Affecting People Living With HIV/AIDS in Brazil: Results of a Multicenter Prospective Cohort Study Using Both Classical Mycology Tests and Histoplasma Urine Antigen Detection. **Open Forum Infectious Diseases**, [s.l.], v. 6, n. 4, p.1-10, 2019.

FIRE, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, [s.l.], v. 391, n. 6669, p. 806–811, 1998.

FORTIN, K.; NICHOLSON, R.; NICHOLSON, A.. Mouse ribonuclease III. cDNA structure, expression analysis, and chromosomal location. **BMC Genomics**, [s.l.], v. 9, p. 1–9, 2002.

FULCI, V.; MACINO, G.. Quelling: post-transcriptional gene silencing guided by small RNAs in *Neurospora crassa*. **Current Opinion in Microbiology**, [s.l.], v. 10, n. 2, p. 199–203, 2007.

GARFOOT, A.; RAPPLEYE, C.. Histoplasma capsulatum surmounts obstacles to intracellular pathogenesis. **Febs Journal**, [s.l.], v. 283, n. 4, p.619-633, 2015.

GENE ONTOLOGY CONSORTIUM, The. The Gene Ontology Resource: 20 years and still GOing strong. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 47, n. 1, p.330-338, 2018.

GHOSH, J. et al. Leishmania donovani targets dicer1 to downregulate miR-122, lower serum cholesterol, and facilitate murine liver infection. **Cell Host and Microbe**, [s.l.] v. 13, n. 3, p. 277–288, 2013.

GORETTI, E. et al. Unity is strength - a panel of 4 microRNAs decreases cardiomyocyte hypertrophy. **International Journal of Cardiology**. [s.l.], v. 182, p. 62–64, 2015.

HE, L.; HANNON, G.. MicroRNAs: Small RNAs with a big role in gene regulation.

Nature Reviews Genetics, [s.l.], v. 5, n. 7, p. 522–531, 2004.

HU, Y.; HAN, X.; JING, Q.. Autophagy in Development and Differentiation. **Biology and Diseases**, [s.l.], v. 1206, p.469-487, 2019.

INGLIS, D. et al. Comparative Transcriptomics of Infectious Spores from the Fungal Pathogen *Histoplasma capsulatum* Reveals a Core Set of Transcripts That Specify Infectious and Pathogenic States. **Eukaryotic Cell**, [s.l.], v. 12, n. 6, p.828-852, 2013.

JANBON, G. et al. Characterizing the role of RNA silencing components in *Cryptococcus neoformans*. **Fungal Genetics And Biology**, [s.l.], v. 47, n. 12, p.1070-1080, 2010.

JIANG, N. et al. Identification and Functional Demonstration of miRNAs in the Fungus *Cryptococcus neoformans*. **Plos One**, v. 7, n. 12, p. 20–25, 2012.

KANG et al. Identification of microRNA-Like RNAs in the Filamentous Fungus *Trichoderma reesei* by Solexa Sequencing. **Plos One**, [s.l.], v. 8, n. 10, p.76-93, 2013.

KASUGA, T. et al. Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. **Molecular Ecology**, v. 12, n. 12, p.3383-3401, 2003.

KATCHY, A. et al. *Histoplasma duboisii* of the femoral bone. **Journal Of Research In Medical Sciences**, [s.l.], v. 24, n. 5, p.19-25, 2019.

KAUFFMAN, C.. Histoplasmosis: A clinical and laboratory update. **Clinical Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 20, n. 1, p.115-132, 2007.

LAU, S. et al. Identification of MicroRNA-Like RNAs in Mycelial and Yeast Phases of the Thermal Dimorphic Fungus *Penicillium marneffeii*. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v. 7, n. 8, 2013.

LEE, H. et al. Diverse Pathways Generate MicroRNA-like RNAs and Dicer-Independent Small Interfering RNAs in Fungi. **Molecular Cell**, [s.l.], v. 38, n. 6, p.803-814, 2010.

LEE, R.; FEINBAUM, R.; AMBROS, V.. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, [s.l.], v. 75, n. 5, p.843-854, 1993.

LEE, Y. et al. The nuclear RNase III Droscha initiates microRNA processing. **Nature**, [s.l.], v. 425, n. 6956, p. 415–419, 2003.

LEE, Y. et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. **The EMBO Journal**, [s.l.], v. 23, n. 20, p. 4051–4060, 2004.

LIU, X. et al. MicroRNA as a novel drug target for cancer therapy. **Expert Opinion On Biological Therapy**, [s.l.], v. 12, n. 5, p.573-580, 2012.

LORENZ, R. et al. ViennaRNA Package 2.0. **Algorithms For Molecular Biology**, [s.l.], v. 6, n. 1, 2011.

LUND, E. et al. Nuclear Export of MicroRNA Precursors. **Science**, [s.l.], v. 303, n. 5654, p. 95–98, 2004.

MARIOTO, D. et al. Study of differential expression of miRNAs in lung tissue of mice

submitted to experimental infection by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Medical Mycology**, [s.l.], v. 55, n. 7, p. 774–784, 2017.

MCKINSEY, D.; MCKINSEY, J.. Pulmonary Histoplasmosis. **Seminars In Respiratory And Critical Care Medicine**, [s.l.], v. 32, n. 06, p.735-744, 2011.

MEDOFF, G. et al. Irreversible Block of the Mycelial-to-Yeast Phase Transition of *Histoplasma capsulatum*. **American Association for the Advancement of Science**, v. 231, n. 4737, p. 476–479, 1986.

MULROONEY, S.; HAUSINGER, R.. Nickel uptake and utilization by microorganisms. **Fems Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 27, n. 2-3, p.239-261, 2003.

NARASIPURA, S.; CHATURVEDI, V.; CHATURVEDI, S.. Characterization of *Cryptococcus neoformans* variety *gattii* SOD2 reveals distinct roles of the two superoxide dismutases in fungal biology and virulence. **Molecular Microbiology**, [s.l.], v. 55, n. 6, p.1782-1800, 2005.

PARENTE, A. et al. The response of *Paracoccidioides* spp. to nitrosative stress. **Microbes And Infection**, [s.l.], v. 17, n. 8, p.575-585, 2015.

PARENTE-ROCHA, J. et al. Macrophage Interaction with *Paracoccidioides brasiliensis* Yeast Cells Modulates Fungal Metabolism and Generates a Response to Oxidative Stress. **Plos One**, [s.l.], v. 10, n. 9, 2015.

PAWLICA, P. et al. How Complementary Targets Expose the microRNA 3' End for Tailing and Trimming during Target-Directed microRNA Degradation. **Cold Spring Harbor Symposia On Quantitative Biology**, [s.l.], v. 84, p.21-29, 2020.

PIRES, D. et al. Mycobacterium tuberculosis Modulates miR-106b-5p to Control Cathepsin S Expression Resulting in Higher Pathogen Survival and Poor T-Cell Activation. **Frontiers In Immunology**, [s.l.], v. 8, 2017.

PORTNOY, M. et al. Metal transporters that contribute copper to metallochaperones in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Genetics And Genomics**, [s.l.], v. 265, n. 5, p.873-882, 2001.

REES, E.; LEE, J.; THIELE, D.. Mobilization of Intracellular Copper Stores by the Ctr2 Vacuolar Copper Transporter. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 279, n. 52, p.54221-54229, 2004.

REINHART, B. et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 901–906, 2000.

REMOLD-O'DONELL E. et al. Expression on blood cells of sialoporphin, the surface glycoprotein that is defective in Wiskott-Aldrich syndrome. **Blood**, [s.l.], v. 70, p.104–109, 1987.

REHMSMEIER, M.. Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. **Rna**, [s.l.], v. 10, n. 10, p.1507-1517, 1 out. 2004. Cold Spring Harbor Laboratory.

RODIONOV, D. et al. Comparative and Functional Genomic Analysis of Prokaryotic Nickel and Cobalt Uptake Transporters: Evidence for a Novel Group of ATP-Binding Cassette Transporters. **Journal Of Bacteriology**, [s.l.], v. 188, n. 1, p.317-327, 2005.

SHARBATI, J. et al. Integrated microrna-mrna-analysis of human monocyte derived macrophages upon mycobacterium avium subsp. hominissuis infection. **Plos One**, v. 6, n. 5, 2011.

SHARMA, R. et al. Gastrointestinal Histoplasmosis: A Case Series. **International Journal Of Surgical Pathology**, [s.l.], v. 25, n. 7, p.592-598, 2017.

SETO, A.; KINGSTON, R.; LAU, N.. The Coming of Age for Piwi Proteins. **Molecular Cell**, [s.l.], v. 26, n. 5, p.603-609, 2007.

SIL, A.. Molecular regulation of *Histoplasma* dimorphism. **Current Opinion In Microbiology**, [s.l.], v. 52, p.151-157, 2019.

SIL, A.; ANDRIANOPOULOS, A.. Thermally Dimorphic Human Fungal Pathogens—Polyphyletic Pathogens with a Convergent Pathogenicity Trait. **Cold Spring Harbor Perspectives In Medicine**, [s.l.], v. 5, n. 8, p.23-44, 2014.

SINGULANI, J. et al. Preliminary evaluation of circulating microRNAs as potential biomarkers in paracoccidioidomycosis. **Biomedical Reports**, [s.l.], v. 6, n. 3, p.353-357, 2017.

SIOMI, H.; SIOMI, M.. Posttranscriptional Regulation of MicroRNA Biogenesis in Animals. **Molecular Cell**, v. 38, n. 3, p. 323–332, 2010.

STAJICH, J. et al. FungiDB: an integrated functional genomics database for fungi. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 40, n. 1, p.675-681, 2011.

TABORDA, C. et al. *Paracoccidioides* spp. and *Histoplasma capsulatum*: Current and New Perspectives for Diagnosis and Treatment. **Current Topics In Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 18, n. 15, p.1333-1348, 2018.

TIWARI, A. et al. Expression and functional characterisation of TNC, a high-affinity nickel transporter from *Neurospora crassa*. **Fungal Genetics And Biology**, [s.l.], v. 48, n. 11, p.1020-1026, 2011.

UNTEREINER, W. et al. Mycological Society of America. **Mycologia**, v. 96, n. 4, p. 812–821, 2004.

VITE-GARÍN, T. et al. The importance of molecular analyses for understanding the genetic diversity of *Histoplasma capsulatum*: An overview. **Revista Iberoamericana de Micología**, [s.l.], v. 31, n. 1, p.11-15, 2014.

WANG, J. et al. MicroRNA-155 Promotes Autophagy to Eliminate Intracellular Mycobacteria by Targeting Rheb. **Plos Pathogens**, [s.l.], v. 9, n. 10, p.1-12, 2013.

WANG, L. et al. Integrated microRNA and mRNA analysis in the pathogenic filamentous fungus *Trichophyton rubrum*. **BMC Genomics**, [s.l.], v. 19, n. 1, p.124-133, 2018.

WANG, M.; DEAN, R.. Movement of small RNAs in and between plants and fungi. **Molecular Plant Pathology**, [s.l.], v. 21, n. 4, p.589-601, 2020.

WHEAT, L.. Histoplasmosis: A review for clinicians from non-endemic areas. **Mycoses**, v. 49, n. 4, p. 274–282, 2006.

WHEAT, L.. Improvements in diagnosis of histoplasmosis. **Expert Opinion On Biological Therapy**, [s.l.], v. 6, n. 11, p.1207-1221, 2006.

WHEAT, L. Joseph et al. Pulmonary Histoplasmosis Syndromes: Recognition, Diagnosis, and Management. **Seminars In Respiratory And Critical Care Medicine**, [s.l.], v. 25, n. 02, p.129-144, 2004.

WOODS, Jon P.. Revisiting old friends: Developments in understanding *Histoplasma capsulatum* pathogenesis. **Journal Of Microbiology**, [s.l.], v. 54, n. 3, p.265-276, 2016.

WORSHAM, P.; GOLDMAN, W.. Quantitative plating of *Histoplasma capsulatum* without addition of conditioned medium or siderophores. **Medical Mycology**, [s.l.], v. 26, n. 3, p. 137-143, 1988.

ZHOU, J. et al. Identification of microRNA-like RNAs in a plant pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* by high-throughput sequencing. **Molecular Genetics And Genomics**, [s.l.], v. 287, n. 4, p.275-282, 2012.

ZHOU, Q. et al. Genome-wide identification and profiling of microRNA-like RNAs from *Metarhizium anisopliae* during development. **Fungal Biology**, [s.l.], v. 116, n. 11, p.1156-1162, 2012.

ZHOU, Y. et al. A secreted microRNA disrupts autophagy in distinct tissues of *Caenorhabditis elegans* upon ageing. **Nature Communications**, [s.l.], v. 10, n. 1, p.1-14, 23 out. 2019.

9. ANEXOS

Tabela suplementar 1. MicroRNAs hipotéticos identificados no genoma de *H. capsulatum* G217B, incluindo repetições.

MiRNA ^A	Sequência Precursora ^B	Sequência madura ^C	MFE (kcal/mol) ^D	Fungo de origem
Super65.:659470-659586(-)	<u>TCTGACTGTTATGATAAGTATTTTCTTA</u> ACTATTTTCATATACTATTTCAAGCAGAAAGCTG <u>ATCTTCTCACTTCTGTCTGTGTCTTGTCTGACTGTGTGCAGCCACTGTATCAGA</u>	AGCAGAAGCUGAU CUU	-25,25	<i>Metarhizium anisopliae</i> - man-miR-4
Super47.:496012-496128(-)	TGGATTCTAACAATTTGTACTGTACCTATCTATGCTCAAAGATGGTTGAGGATTTCCCTTT <u>ATATACAATTGGTGAATGTGGCGGTATTCAGATTGGGTTAGTTACAACTTCGC</u>	GGATTTCTTTATA TA	-22,75	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> - SS-miR-2
Super19.:379203-379322(+)	ATGCTGGGGATTATTGGCCAAGCATAATCCTGAACATGTCCACGTACATGGATGGATGGGA <u>TGGATGGATGGATGGATGGATGGATACGACACACTCCGTCGAGTTTGTGTGCGAGGATC</u>	GAUGGAUGGAUG GAUGGAU	-35,72	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> - SS-miR-C17
Super19.:379207-379326(+)	TGGGGATTATTGGCCAAGCATAATCCTGAACATGTCCACGTACATGGATGGATGGGA <u>TGGATGGATGGATGGATGGATACGACACACTCCGTCGAGTTTGTGTGCGAGGATCAACC</u>	GAUGGAUGGAUG GAUGGAU	-34,48	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> - SS-miR-C17
Super19.:554112-554229(-)	TTTCATCGAGTTTTTAGGTAGACATCTACCATTTGTTTCAGGGATGAATGAATGGATGGAT <u>GGATGGAGGAAAAAAGAGCAAACCAACAATGTTGTTGTTGTCAGTGGGAGGTTGACA</u>	AUGGAUGGAUGG AUGGA	-32,21	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> - SS-miR-C17
Super19.:379200-379318(+)	AAAATGCTGGGGATTATTGGCCAAGCATAATCCTGAACATGTCCACGTACATGGATGGAT <u>GGATGGATGGATGGATGGATGGATACGACACACTCCGTCGAGTTTGTGTGCGGAG</u>	AUGGAUGGAUGG AUGGAU	-31,04	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> - SS-miR-C17
Super65.:1098811-1098930(+)	ACGCTTCTAGGTATTGTTTAGTGGTGATTGTTGAGATAGATAGATAGATGGATGGATGGGA <u>TGGATGGATGGATGATGATGCTACTGAAAATTTCTAATATCTCTTCGTCCTCTTTT</u>	GAUGGAUGGAUG GAUGGAU	-30,54	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> - SS-miR-C17
Super65.:1098815-1098934(+)	TTCTAGGTATTGTTTAGTGGTGATTGTTGAGATAGATAGATAGATGGATGGATGGATGGGA <u>TGGATGGATGATGATGCTACTGAAAATTTCTAATATCTCTTCGTCCTCTTTTACTC</u>	GAUGGAUGGAUG GAUGGAU	-30,37	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> - SS-miR-C17
Super158.:93865-93984(+)	TTAAATTGTTTGAAGTGCTAATCAAAACTTTTCGAGAGGATCCTCCGTATGGATGGATGGGA <u>TGGATGGATGGATGTAGGGGATGTGTGTCTGTAGAGAGTATGCAGTATGCATCGAGCAT</u>	GAUGGAUGGAUG GAUGGAU	-29,56	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> - SS-miR-C17
Super36.:588123-588240(-)	TTTTTTGCTATTGATCCCTCGACAAGCAGACAGAACACAGACGATGGATGGATGGATGGGA <u>TGGATGGTAGAAAGGAGATCAAATTTGACAGAGGGCCGGCCTCCTTGTGCATACGTG</u>	GAUGGAUGGAUG GAUGG	-29,09	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> - SS-miR-C17
Super65.:1098807-1098926(+)	ATGTACGCTTCTAGGTATTGTTTAGTGGTGATTGTTGAGATAGATAGATAGATGGATGGGA <u>TGGATGGATGGATGGATGATGCTACTGAAAATTTCTAATATCTCTTCGTCCTCTCC</u>	GAUGGAUGGAUG GAUGGAU	-29,04	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> - SS-miR-C17
Super65.:1098819-1098935(+)	AGGTATTGTTTAGTGGTGATTGTTGAGATAGATAGATAGATGGATGGATGGATGGATGGGA <u>TGGATGATGATGCTACTGAAAATTTCTAATATCTCTTCGTCCTCTTTTACTCT</u>	GAUGGAUGGAUG GAUG	-27,88	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> - SS-miR-C17
Super1131.:229388-229504(+)	CACATCTCTCTCGCTGTGATGCATGCCAAGTAAAAGCCACATAAGGGGATGGATGGGA <u>TGGATGATTTGGCCATCATGAACCAAGTTCGCCATGCTTTTTCTCTTCCCCGACC</u>	GAUGGAUGGAUG GAUG	-27,57	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> - SS-miR-C17
Super359.:229714-229832(+)	GGCGCTTATTGCAGGATTTTGTGTTTTCTCTTTTTATTTTCGTTTTTCAGGAATGGATGGATGG <u>ATGGATGCAACGAGATGCAGCTCTGTAATTGCAGGTTTTTTTGTGAATAGTTAGCT</u>	AUGGAUGGAUGG AUGGAU	-26,93	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> - SS-miR-C17
Super33.:229717-229833(+)	GCTTATTGCAGGATTTTGTGTTTTCTCTTTTTATTTTCGTTTTTCAGGAATGGATGGATGGATG <u>GATGCAACGAGATGCAGCTCTGTAATTGCAGGTTTTTTTGTGAATAGTTAGCTA</u>	GAUGGAUGGAUG GAUG	-26,54	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> - SS-miR-C17

Tabela suplementar 2. MicroRNAs hipotéticos identificados no genoma de *H. capsulatum* H88, incluindo repetições.

MiRNA ^A	Sequência precursora ^B	Sequência madura ^C	MFE (kcal/mol) ^D	Fungo de origem
DS990642.1:86203 6-862152(-)	<u>ATGTTGTCTAGATGGAAATTCTGTACTAAACAATCAATATAGCATCTCAATATCAATTTTA</u> <u>TACAGTCATTAGAGTGATATTCAATCTCTATATCTAAGTATTTTAAAGATTCTTT</u>	TATCAATTTTATAC AG	-16,69	<i>Metarhizium anisopli-</i> <i>man-milR-12</i>
DS990637.2:50487 2-504990(+)	<u>CTTCCAGTGCTATTTCCGCCATGGTTCAGGCCGCCGACGCCGATTGCAGGTGTCGTAGC</u> <u>ATCGAAGTATCAACGTATCGAAGTTTCGCAGTTCGCAGTCTCACGGTGCAGGGTCCG</u>	GTGTCGTAGCATC GAAGT	-32,07	<i>Metarhizium anisopli-</i> <i>man-milR-14</i>
DS990638.1:45366 94-453681(+)	<u>CTGCTGTCAGATTCTCAATGAACCTTCTCTCTGTGGTCTTCAGTTCAGCAGAGCAGAAGCT</u> <u>GATCTTTGTAAGAAGATCAATTCAATTCTCTTATGAAGATCACCACTTACCCTGA</u>	GAGCAGAAGCTGA TCTT	-31,06	<i>Metarhizium anisopli-</i> <i>man-milR-4</i>
DS990640.1:31005 79-3100666(+)	<u>ACCGATGAAGACTGAGTGTCTGTGGTGATAGTACTTTTAGCATGCATGGTATTTTCGTGTCTT</u> <u>GGCTATATGTAAGGGTTGAGCTGACT</u>	TTAGCATGCATGG TATT	-21,74	<i>Penicillium</i> <i>chrysogenum-milR-28</i>
DS990636.1:25057 93-2505909(-)	<u>GTGTGGAAGAGTTTGAGGGAATGGCTACTTTGACTGAAGCATAGAGAAGGTGTC AAGAT</u> <u>TGATGATTCTGCTTTGGATGAACATGATTACTGTCTGGATGTTCTTGCATTGTGTG</u>	TGTC AAGATTGAT GAT	-21,98	<i>Penicillium</i> <i>chrysogenum-milR-8</i>
DS990639.1:30280 63-3028181(+)	<u>TTTCATCGAGTTTTTGGGTAGACATCTACCATTTGTTTCAGGGCATGATGAATGGATGGATG</u> <u>GATGGATGGAAAAAACAACCAACAATGTTGTCAAGTGGGAGGTTGACAAGAATGCC</u>	GATGGATGGATGG ATGGAT	-32,01	<i>Sclerotinia sclerotiorum-</i> <i>SS-milR-C17</i>
DS990639.1:30280 66-3028184(+)	<u>CATCGAGTTTTTGGGTAGACATCTACCATTTGTTTCAGGGCATGATGAATGGATGGATGGA</u> <u>TGGATGGAAAAAACAACCAACAATGTTGTCAAGTGGGAGGTTGACAAGAATGCCAGC</u>	ATGGATGGATGGA TGGAT	-32,01	<i>Sclerotinia sclerotiorum-</i> <i>SS-milR-C17</i>
DS990636.1:10058 46-1005962(-)	<u>TTTTGAGTTGGTCCCACAGATTGCACTGGCGGTTGGCCACGCTGTGTATGGATGGATGGA</u> <u>TGGATGTATACTAGTATTTCATGCCATACCTACACTTTTCCAATGGTTGAATGGAGC</u>	GATGGATGGATGG ATGGA	-31,88	<i>Sclerotinia sclerotiorum-</i> <i>SS-milR-C17</i>
DS990636.1:10058 47-1005965(-)	<u>GTGTTTTGAGTTGGTCCCACAGATTGCACTGGCGGTTGGCCACGCTGTGTATGGATGGAT</u> <u>GGATGGATGTATACTAGTATTTCATGCCATACCTACACTTTTCCAATGGTTGAATGGAG</u>	TGGATGGATGGAT GGAT	-31,81	<i>Sclerotinia sclerotiorum-</i> <i>SS-milR-C17</i>
DS990644.1:58855 7-588676(+)	<u>TTTTTGGATTGTGGCGTCCATGAGGACATGCTGATTTGTATATATATATGGATGGATGGAT</u> <u>GGATGGATGATTCGATCGTCACTCGTTGTCCGAAGACTTTGCGGTAATCGGTTGGTCA</u>	GGATGGATGGATG GAT	-29,93	<i>Sclerotinia sclerotiorum-</i> <i>SS-milR-C17</i>
DS990644.1:58856 1-588677(+)	<u>TGGATTGTGGCGTCCATGAGGACATGCTGATTTGTATATATATATGGATGGATGGATGGA</u> <u>TGGATGATTCGATCGTCACTCGTTGTCCGAAGACTTTGCGGTAATCGGTTGGTCAA</u>	ATGGATGGATGGA TGGAT	-29,73	<i>Sclerotinia sclerotiorum-</i> <i>SS-milR-C17</i>
DS990644.1:58855 4-588672(+)	<u>TTTTTTTTGGATTGTGGCGTCCATGAGGACATGCTGATTTGTATATATATATGGATGGATG</u> <u>GATGGATGGATGATTCGATCGTCACTCGTTGTCCGAAGACTTTGCGGTAATCGGTTG</u>	ATGGATGGATGGA TGGAT	-27,85	<i>Sclerotinia sclerotiorum-</i> <i>SS-milR-C17</i>
DS990636.1:13414 46-1341562(-)	<u>GCACTGGTTTCGATTTGATGTTAAGCTACCCCATTTCCAAAAATGGTGAGGATGGATGGA</u> <u>TGGATGATTGATAAGAGACGTGCTTTTTTTAAGCATTGCTGCCTATCTCTCATTCC</u>	GATGGATGGATGG ATGGA	-27,59	<i>Sclerotinia sclerotiorum-</i> <i>SS-milR-C17</i>
DS990642.1:16934 76-1693565(-)	<u>GCCAGATCGTCCCACGCGGCAGCACATATGTCTGGATGGATGGATGGATGGATGGATT</u> <u>GATGCACCGAGTCTGTACGTATGCAGTCTG</u>	GATGGATGGATGG ATGGAT	-26,67	<i>Sclerotinia sclerotiorum-</i> <i>SS-milR-C17</i>
DS990636.1:57546 49-5754766(+)	<u>CCATTGAACTGAGACAACGAATGCACAGTCTTGTCCACGCCGCGCTAGTGGATGGATG</u> <u>GATGGATGGACTTGAATTGAATTTCTGAAGATAAAAAAGTATGACATCAGGGTAACT</u>	TGGATGGATGGAT GGA	-24,24	<i>Sclerotinia sclerotiorum-</i> <i>SS-milR-C17</i>
DS990640.1:31005 79-3100666(+)	<u>ACCGATGAAGACTGAGTGTCTGTGGTGATAGTACTTTTAGCATGCATGGTATTTTCGTGTCTT</u> <u>GGCTATATGTAAGGGTTGAGCTGACT</u>	TTAGCATGCATGG TATT	-21,74	<i>Sclerotinia sclerotiorum-</i> <i>SS-milR-C17</i>

DS990638.1:11463 61-1146449(+)	GTCGTGTGCATCGGATAGAGATTCGTGGATGATTCATGGATGGATGGATGGATGGATGAT AAGCCATGAGCATGATGTGATGGTATGT	ATGGATGGATGGA TGGAT	-21,64	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> - SS-miR-C17
DS990642.1:13334 64-1333550(+)	GGCAACAACGTCTGGGCTTTTGTCTGTATTATACGATGGATGGATGGATGAATGCAGAG GCAGGCTCTCTACAAGCAGCTGCGTG	GATGGATGGATGG ATG	-21,47	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> - SS-miR-C17
DS990639.1:23438 31-2343917(-)	GTCGTCTGAGTGAGATTTAGGTTACAATGCGCATTGGATGGATGGATGGAAAGATATGCG TTTCGCTGTGGCTGGCCGTCAAGCGA	TGGATGGATGGAT GGA	-21,43	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> - SS-miR-C17
DS990645.1:29794 8-298037(+)	AAAGGCACGTTTTCTTCCCTTCCTTTTGAAGGACGATGGATGGATGGATGGATGGATGG AGCGAGAGAAGAGGGATGGCTTGCTGCAG	GATGGATGGATGG ATGGAT	-20,95	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> - SS-miR-C17
DS990645.1:29795 2-298041(+)	GCACGTTTTCTTCCCTTCCTTTTGAAGGACGATGGATGGATGGATGGATGGATGGAGCG AGAGAAGAGGGATGGCTTGCTGCAGAAAA	GATGGATGGATGG ATGGAT	-20,95	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> - SS-miR-C17
DS990641.1:13462 47-1346335(+)	AGAGTGTA AAAATCTATCTCTGGTCTGGTGGATGGATGGATGGATGGATGGAGTTTCAA AATTCGTCGTCACCAAAAAGCAACAGCAA	GATGGATGGATGG ATGGA	-20,94	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> - SS-miR-C17
DS990639.1:19570 81-1957200(+)	GTAGGTTTTTATTATTGTTATTTTATTATATATAACTATATATAGATAAGATGGATGGAT GGATGGATGTATGTAACATATTTAAAAAGATTTACAGATTTACAGAAACATGAACTG	GATGGATGGATGG ATG	-20,62	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> - SS-miR-C17
DS990640.1:37814 75-3781591(+)	GTAGGTTTTTATTATTGTTATTTTATTATATATAACTATATATAGATAAGATGGATGGAT GGATGGATGTATGTAACATATTTAAAAAGATTTACAGATTTACAGAAACATGAACTG	GATGGATGGATGG ATG	-20,32	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> - SS-miR-C17
DS990645.1:29795 6-298044(+)	GTAGGTTTTTATTATTGTTATTTTATTATATATAACTATATATAGATAAGATGGATGGAT GGATGGATGTATGTAACATATTTAAAAAGATTTACAGATTTACAGAAACATGAACTG	GATGGATGGATGG ATGGA	-19,85	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> - SS-miR-C17
DS990639.1:19570 85-1957201(+)	GTAGGTTTTTATTATTGTTATTTTATTATATATAACTATATATAGATAAGATGGATGGAT GGATGGATGTATGTAACATATTTAAAAAGATTTACAGATTTACAGAAACATGAACTG	GATGGATGGATGG ATG	-18,7	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> - SS-miR-C17
DS990639.1:12960 81-1296168(+)	GGAATTTGTAGAAATTGGGCGTATGGACAGATCGTTGGATGGATGGATGGATGGATTGG GACGTTTGATCTATGTTTTTAAATGTGA	TGGATGGATGGAT GGAT	-13,98	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> - SS-miR-C17

A: Região de alinhamento;

B: Sequência do pre-miRNA predita por análises *in silico*;

C: Sequência do miRNA maduro predita por análises *in silico*;

D: Energia livre de dobramento (MFE) predita pela plataforma RNAFold.

Tabela suplementar S1. Alvos de microRNA em *H. capsulatum* G217B.

https://drive.google.com/file/d/1PWFSnOzOfWXo8LpVTTI_7sbfDnmZM7Aw/view?usp=sharing

Arquivo xlsx, 36 KB.

Tabela suplementar S2. Alvos de microRNA em *H. capsulatum* H88.

https://drive.google.com/file/d/14CcS8ARhNEICwusZsJALYF_c0uTtLNo1/view?usp=sharing

Arquivo xlsx, 39 KB.