

Comparação entre o processo de virulência em *Paracoccidioides brasiliensis* e *P. lutzii* com utilização de modelo alternativo de bioensaio e *knockdown* gênico

Gabriel Capella Machado

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Comparação entre o processo de virulência em *Paracoccidioides brasiliensis* e *P. lutzii* com utilização de modelo alternativo de bioensaio e *knockdown* gênico

Gabriel Capella Machado

Prof. Dr. Eduardo Bagagli

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética).

BOTUCATU – SP

2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Machado, Gabriel Capella.

Comparação entre o processo de virulência em
Paracoccidioides brasiliensis e P. lutzii com utilização
de modelo alternativo de bioensaio e knockdown gênico /
Gabriel Capella Machado. - Botucatu, 2015

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de
Botucatu

Orientador: Eduardo Bagagli

Capes: 20202008

1. Paracoccidioides brasiliensis. 2. Virulência
(Microbiologia). 3. Paracoccidioidomicose. 4. Bioensaio.
5. Técnicas de silenciamento de genes.

Palavras-chave: Galleria mellonella; Paracoccidioides
spp.; PbGP43; PlP43; RNA antisense.

Dedicatória

Ao Prof. Eduardo Bagagli, meu orientador, incentivador e um grande exemplo como pessoa e professor. Pelos conselhos dados, ensinamentos transmitidos e convívio proporcionado. Por respeitar todas as minhas opiniões e por ter me dado autonomia total para trabalhar em seu laboratório. Obrigado por esses mais de 6 anos de parceria.

Agradecimentos

Aos meus pais, Suzete e Aguinaldo, por terem me apoiado em cada momento da minha caminhada, pelo amor incondicional, pela minha criação e por serem meus grandes admiradores e exemplos.

À minha família, meus tios José e Humberto, minha tia Sirlene, meu irmão Victor, meus avós Aguinaldo e Thereza e minhas primas Luiza e Luísa pelo exemplo, amor e por terem sido a base de minha formação pessoal. Em especial ao meu avô José e minha avó Mavil, importantíssimos na minha formação e dos quais eu sinto muita saudade.

Ao Laboratório de Biologia de Fungos e aos seus atuais e ex integrantes Prof^a Sandra Bosco, Prof^a Raquel Theodoro, Severino Assis, Ariane Nascimento, Thales Arantes, Tâmara Prandini, Mariana Fernandes, Marcelo, Tarsila Franklin, Juliana Rizzo, Juliana Giacobino, Juliana Azanha, Hans García e Marluce Hrycyk, entre outros, pela amizade, excelente convívio diário e pela importantíssima contribuição de cada um no meu aprendizado.

Ao Departamento de Microbiologia e Imunologia e aos seus alunos, docentes e servidores pela estrutura oferecida e pelo trabalho realizado, o que possibilitou a realização dessa tese.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética, ao Departamento de Genética e aos seus docentes e servidores, pelo conhecimento transmitido e pela oportunidade de ministrar duas disciplinas como professor bolsista.

À Prof^a Silvia Regina Siciliano Wilcken e sua orientada Andressa de Brida, da Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP, pela concessão de exemplares de *Galleria mellonella* bem como pela experiência transmitida em relação à criação deste inseto.

Aos alunos Edson e Samir Kadri, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, pela doação de favos de mel para a alimentação de *Galleria mellonella*.

Ao servidor Valdir Paniguel, do Departamento de Parasitologia e à Associação dos Apicultores de Botucatu “Casa do Mel”, pela doação de favos de mel para a alimentação de *Galleria mellonella*.

Ao Prof. Chad Rappleye, da Ohio State University, pela concessão do plasmídeo pCR498.

Ao Prof. Fernando Rodrigues e ao seu orientado João Menino, da Universidade do Minho, pelos valiosos conselhos sobre a construção dos plasmídeos utilizados nesse trabalho e o processo de ATMT.

Ao Prof. Fábio Tebaldi e ao seu orientado Eder da Silva, do Departamento de Genética, pela estrutura cedida e auxílio prestado na realização do processo de transformação por eletroporação.

Ao Prof. João Pessoa Araújo Jr. e às suas orientadas Jaqueline Kurissio, Marianna Araújo e Camila Malossi, do Departamento de Microbiologia e Imunologia, pela estrutura cedida e auxílio prestado na realização da RT-qPCR.

Ao Prof. Marcos Fontes e ao seu orientado Guilherme Salvador, do Departamento de Física e Biofísica, pelo auxílio prestado na realização e coloração do SDS-PAGE.

À Vanessa Vieira, da Universidade Federal de Minas Gerais, pelo compartilhamento de ideias e discussão deste trabalho.

Aos atuais e ex companheiros de república Lucas Recco, Victor Otayek, Renato Medeiros, Gerson Almeida, Bruno Camargo, Bruno Biaggio, Alexandre Chagas, Henrique Aldar, Iberê Conceição, Paulo Madeira, Guilherme Bulgraen, Anderson Sorgatti, João Augusto Ribeiro, Felipe Araújo, Vinícius Dael, Renan Almeida e Raphael Peres, pela amizade, ideias e experiências compartilhadas e fundamental apoio nesses meus anos vividos em Botucatu.

Ao GRUGEN, Grupo de Discussão em Genética e aos seus integrantes, pela sua importância em minha formação, pela admiração compartilhada por Genética e pela troca de experiências.

Aos meus alunos do curso de Biologia do Instituto de Biociências de Botucatu pelo conhecimento por mim adquirido e pela experiência de poder ter sido professor nas mesmas salas de aula que fui aluno.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro, sob o processo de número 143371/2011-8.

Ao Instituto de Biociências de Botucatu e à Universidade Estadual Paulista, instituições das quais eu tanto me orgulho e admiro, e todas as pessoas que fazem ou fizeram parte dessa comunidade, por minha formação acadêmica e pelos excelentes dez anos de convívio e crescimento.

Sumário

Introdução	6
O gênero <i>Paracoccidioides</i> e a paracoccidioidomicose.....	6
Variabilidade genética e espécies crípticas em <i>Paracoccidioides</i>	8
O uso de insetos como modelo experimental em estudos de virulência	10
A glicoproteína gp43 e sua variação interespecífica.....	12
Transformação fúngica e <i>Agrobacterium tumefaciens</i> mediated transformation (ATMT) ..	13
RNA de interferência e a tecnologia de RNA antisense	15
Objetivos.....	17
Capítulo único: Experimental infection of <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> and <i>P. lutzii</i> in <i>Galleria mellonella</i> using wild and knockdown <i>PbGP43</i> and <i>PIP43</i> strains.	18
Conclusões.....	41
Referências bibliográficas	42
Material suplementar	59

Resumo

A paracoccidiodomicose, uma das mais importantes micoses sistêmicas da América Latina, é causada pelas espécies crípticas *Paracoccidioides brasiliensis* e *P. lutzii*. Ainda não é claro como o processo de especiação dentro do gênero *Paracoccidioides* influi em aspectos como virulência e patogenia da doença. O objetivo deste trabalho é caracterizar algumas dessas diferenças entre as duas espécies crípticas, utilizando-se de modelo experimental alternativo, as larvas da traça de cera *Galleria mellonella*. Este modelo tem sido utilizado em estudos envolvendo outros patógenos, porém ainda é pouco explorado em *Paracoccidioides* spp. No presente estudo, *G. mellonella* refletiu diferenças entre a virulência de cargas fúngicas distintas, bem como dentre isolados variados e destes com os grupos controle. Além disso, foi possível a recuperação do patógeno a partir de larvas experimentalmente infectadas. Isolados *P. lutzii* apresentaram níveis de virulência variáveis, sendo pertencentes a esta espécie os isolados com maior e menor virulência observadas neste estudo (8334 e Pb01, respectivamente). Já os isolados pertencentes a espécie *P. brasiliensis* (Pb339, Pb192 e T15LN1) apresentaram taxas de mortalidade mais homogêneas e intermediárias. Tais resultados credenciam as larvas de *G. mellonella* como modelo de experimentação adequado para o estudo do processo de virulência em *Paracoccidioides* spp. Ainda, foi realizado *knockdown* do gene codificador da gp43 (PbGP43), o antígeno imunodominante em *P. brasiliensis* e do seu homólogo em *P. lutzii* (PIP43) utilizando-se a estratégia de RNA antisense combinada com transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Foram obtidos três transformantes *P. brasiliensis* com expressão de PbGP43 de cerca de 8%, 14% e 36% quando comparados com a expressão do isolado selvagem original Pb192. Além disso foram obtidos dois transformante *P. lutzii* com expressão de PIP43 por volta de 23% e 75% em comparação com a cepa 8334. O silenciamento de PIP43 diminuiu a virulência de *P. lutzii* aferida no modelo experimental *G. mellonella*, sugerindo importância de p43 no processo de infecção por *P. lutzii*, a despeito de sua variabilidade tanto qualitativa quanto quantitativa já observada entre isolados desta espécie.

Palavras-chave: *Paracoccidioides* spp.; *Galleria mellonella*; PbGP43; PIP43; RNA antisense

Abstract

Paracoccidioidomycosis (PCM), an important systemic mycosis in Latin America, is caused by the cryptic species *Paracoccidioides brasiliensis* and *P. lutzii*. How these species differ in their virulence factors is still unknown and needs to be properly evaluated. While the role of *PbGP43*, which codes *gp43*, as a virulence factor is relatively well established for *P. brasiliensis*, the same is not true for its ortholog in *P. lutzii*, namely *PIP43*. *PbGP43* and *PIP43* present differences in their nucleotide sequences, expression levels, epitope occurrence and influences on PCM diagnosis. Herein, we obtained *PbGP43* and *PIP43* knockdown strains by antisense RNA technology combined with ATMT, in order to comparatively evaluate their effects on virulence, employing the alternative experimental host *Galleria mellonella* larvae. Our results suggest that *p43* is important in the *P. lutzii* infectious process, as previously demonstrated by *gp43* in *P. brasiliensis*. We confirmed *G. mellonella* as a useful model for studying *P. brasiliensis* and *P. lutzii* virulence, since it reflects variation between inoculum size and different strains, as well as between wild-type and respective knockdown transformant strains. Virulence levels may vary among isolates of the same species, probably reflecting that the physiological condition is more important than the species effect. Re-isolation of *Paracoccidioides* from experimentally infected *G. mellonella* larvae is possible and might be useful for epigenetic studies related to infection.

Keywords: *Paracoccidioides* spp.; *Galleria mellonella*; *PbGP43*; *PIP43*; antisense RNA

Introdução

O gênero *Paracoccidioides* e a paracoccidioidomicose

Paracoccidioides spp. são fungos pertencentes ao filo Ascomycota (LECLERC et al., 1994; PETERSON & SIEGLER, 1998). Os ascomicetos estão presentes no cotidiano da população de diversas formas incluindo a produção de alimentos, medicamentos e combustíveis. *Saccharomyces* spp., *Penicilium* spp. e *Aspergillus* spp., são exemplos de fungos ascomicetos amplamente utilizados na produção industrial, científica e tecnológica (LIMA e MOTA, 2003). Por outro lado, o filo também compreende espécies causadoras de doenças em humanos e outros organismos, entre elas *Aspergillus* spp., *Candida* spp., e fungos da família Ajellomycetaceae, onde estão alocadas as espécies pertencentes ao gênero *Paracoccidioides* (UNTEREINER et al., 2004).

Fungos da família Ajellomycetaceae têm como característica o termodimorfismo, que os possibilita tanto infectar um hospedeiro quanto ocupar diferentes nichos saprobióticos. *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* e *Emmonsia parva* são outras espécies pertencentes a esta família (UNTEREINER et al., 2004). *Paracoccidioides* spp., à temperatura ambiente, apresentam-se na forma micelial, e a 36,5°C, temperatura de seus hospedeiros, na fase leveduriforme (FRANCO et al., 1994). A principal característica morfológica da levedura de *Paracoccidioides* sp. é a presença de brotamentos periféricos à célula-mãe, gerando uma estrutura semelhante a uma roda-de-leme. Macroscopicamente, as colônias leveduriformes são enrugadas e de cor creme, com aspecto cerebriforme. Já a fase micelial é caracterizada por colônias irregulares, com o verso pigmentado e dotadas geralmente de um micélio aéreo discreto na cor branca, apresentando aspecto de pipoca estourada. Suas hifas são delgadas e septadas, podendo apresentar esporos de resistência ambiental denominados clamidósporos intercalares (FRANCO et al., 1989; LACAZ et al., 2002).

Paracoccidioides spp. são as espécies causadoras da paracoccidioidomicose (PCM), uma das mais importantes micoses sistêmicas da América Latina sendo endêmica do México até a Argentina (FRANCO et al., 1994). Como a PCM não é uma doença de notificação compulsória, é difícil precisar sua real prevalência. Apesar disso, sabe-se que a maioria dos infectados é do sexo masculino e trabalhadores rurais do Brasil, Colômbia e Venezuela. Em regiões altamente endêmicas, a incidência estimada anual da PCM é de 1 a 3 casos em

100.000 habitantes (WANKE e LONDERO, 1994). Segundo Coutinho et al. (2002), a taxa média de mortalidade anual no Brasil no período de 1980 a 1995 foi de 1,45 a cada milhão de habitantes. No estado do Paraná, no período de 1980 a 1998, a mortalidade média anual chegou a 3,48 por milhão de habitantes (BITTENCOURT et al., 2005). Recentemente, vem sendo observado alta incidência da PCM em novas regiões, provavelmente relacionado a aberturas de fronteiras agrícolas, como no Estado de Rondônia, com média anual de 9,4 casos a cada 100.00 habitantes nas últimas duas décadas (VIEIRA et al., 2014). A importância da PCM é evidenciada pelo fato de ser a oitava causa de mortalidade por doença infecciosa/parasitária predominantemente crônica e a mais alta taxa entre as micoses sistêmicas (COUTINHO et al., 2002; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

Na forma miceliana, *P. brasiliensis* vive saprobioticamente no solo. Nesta forma, o fungo produz propágulos como os artroconídios ou aleuroconídios, que em temperatura adequada dão origem às células leveduriformes (LACAZ et al., 2002). A infecção do fungo pelos humanos se dá principalmente pela inalação desses propágulos, como já comprovado em modelos animais (McEWEN et al., 1987). É possível que outras portas de entrada para o fungo sejam a pele lesionada e mucosa do trato gastrointestinal (PALMEIRO et al., 2005). O fungo também já foi detectado e/ou isolado de cães (RICCI et al., 2004; FARIAS et al., 2005), preguiças (TREJO-CHÁVES et al., 2011) e tatus (NAIFF et al. 1986; BAGAGLI et al., 1998; CORREDOR et al., 1999; BAGAGLI et al., 2003), sendo esses últimos considerados reservatórios da espécie. Além disso, a infecção já foi também confirmada em diversos grupos de animais, silvestres e domésticos, por testes intradérmicos e sorológicos (COSTA et al., 1992; CORTE et al., 2007; SILVEIRA et al., 2008; CORTE et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2013; BELITARDO et al., 2014a; BELITARDO et al., 2014b), e detecção molecular por Nested-PCR (RICHINI-PEREIRA et al., 2008).

Os fatores que determinam a evolução da infecção são principalmente a virulência característica de cada isolado, a quantidade de esporos inalados e a integridade do hospedeiro (PALMEIRO et al., 2005), podendo gerar a forma sintomática da PCM. A infecção primária por *P. brasiliensis* se dá no pulmão, onde são gerados granulomas a fim de impedir a disseminação do patógeno (FRANCO et al., 1994; ROMANI, 1997). A manifestação da doença pode se dar na forma aguda em crianças ou jovens de ambos os sexos ou na forma crônica, geralmente em adultos do sexo masculino (RESTREPO et al., 1984). Esta forma da doença é caracterizada por um longo período de latência e formação de nódulos fibróticos nos tecidos, principalmente o pulmonar, causando problemas no funcionamento do órgão. Já na forma aguda da doença, a evolução é rápida e pode afetar o funcionamento da medula óssea e

o sistema reticuloendolial, podendo ser fatal (FRANCO et al., 1987). Quando ocorre a disseminação do fungo no organismo, podem surgir lesões nas mucosas, pele, linfonodo, glândulas adrenais, baço e fígado. As lesões mais frequentes acontecem nos lábios, soalho da boca, língua, faringe e bochechas. O paciente pode ainda se queixar de insônia, debilidade, inapetência, disfagia, dispneia, tosse, hemoptise, febre, perda de peso, prurido e ardor (PALMEIRO et al., 2005).

O diagnóstico de certeza da PCM é a demonstração direta do fungo. Além disso, as técnicas de pesquisa de anticorpos e antígenos têm importante papel no diagnóstico da paracoccidiodomicose (FRANCO et al., 1994), sendo largamente utilizadas no diagnóstico de rotina, e no monitoramento da infecção durante o tratamento (SALINA et al., 1998). O tratamento da PCM apresenta uma série de dificuldades e mesmo quando curados, os pacientes podem apresentar sequelas dermatológicas e de ordem respiratória, agravando o impacto social da doença (FRANCO et al., 1994).

Variabilidade genética e espécies crípticas em *Paracoccidioides*

A caracterização de espécies dentro do reino *Fungi* é dificultada pelo fato de algumas espécies filogenéticas dentro do mesmo gênero não possuírem caracteres morfológicos que as diferenciem. Desta forma, estudos utilizando ferramentas genéticas tornam-se essenciais para a diferenciação de espécies fúngicas (TAYLOR et al., 2000).

O agente etiológico da PCM foi observado pela primeira vez por Adolfo Lutz, em 1908, sendo a espécie descrita inicialmente como *Zymonema brasiliensis*, por Alfonso Splendore, em 1912, e mais tarde renomeada como *P. brasiliensis* por Floriano de Almeida, em 1930, permanecendo assim como uma única entidade biológica. Entretanto, devido os recentes achados de filogenia molecular, a hipótese da existência de apenas uma espécie dentro do gênero *Paracoccidioides* foi derrubada.

A partir de 1995, iniciaram-se estudos de variabilidade genética de *P. brasiliensis* com o uso de RAPD (SOARES et al., 1995; CALCAGNO et al., 1998; MOLINARI-MADLUN et al., 1999; HAHN et al., 2002; HAHN et al., 2003), RFLP (NINO-VEGA et al., 2000), cariotipagem (MONTROYA et al., 1997; CANO et al., 1998; MONTROYA et al., 1999) e microssatélites (NASCIMENTO et al., 2004). Todos esses trabalhos demonstraram que há uma grande variabilidade genética entre diferentes isolados desse fungo e alguns sugerem que grupos geneticamente isolados tenham diferenças em relação à resistência a drogas (HAHN et al., 2003) e correlação com origem geográfica (CALCAGNO et al., 1998; NINO-VEGA et

al., 2000). Molinari-Madlum et al. (1999) foram capazes de dividir 15 isolados de *P. brasiliensis* em 2 grupos pela técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). Adicionalmente os autores realizaram ensaios de virulência com camundongos B10.A e verificaram que os dois grupos apresentavam perfis diferentes de virulência. Esse estudo foi o primeiro a relacionar polimorfismos genéticos a diferentes níveis de virulência em *Paracoccidioides*.

Além de observarem uma extensa variabilidade genética dentre os isolados do patógeno, através de análises de polimorfismos de seqüências gênicas, Matute et al. (2006) estabeleceram ainda que existem pelo menos 3 espécies crípticas dentro do gênero, tendo ocorrido dois eventos de especiação. Dessas 3 espécies, uma é considerada parafilética (S1) e as outras duas monofiléticas (PS2 e PS3). S1 (contendo isolados do Brasil, Argentina, Peru, Paraguai e Venezuela) e PS2 (isolados do Brasil e Venezuela) ocorrem dentro de uma mesma área geográfica, sendo consideradas espécies simpátricas, enquanto PS3 está restrita ao território colombiano. Carrero et al. (2008), ao analisarem árvores filogenéticas de genes codificadores de proteínas, propuseram a existência de uma quarta espécie constituída por isolados (Pb01 e IFM 54648) que não podem ser agrupados com nenhuma das outras 3 espécies. Os autores postularam ainda que os ramos que separam estes isolados são maiores que os que isolam as três espécies crípticas descritas por Matute et al. (2006). O isolado Pb01 também foi analisado por Theodoro et al. (2008) em relação ao intein PRP8 e em comparação com outros isolados, não se agrupando em S1, PS2 ou PS3, corroborando a existência de um quarto grupo (*Pb01-like*, atualmente *P. lutzii*). Teixeira et al. (2009) identificaram mais 17 novos isolados, todos da Região Centro-Oeste brasileira e postularam que o evento de especiação entre *Pb01-like* e os grupos S1, PS2 e PS3 ocorreu por volta de 32 milhões de anos atrás. Apesar da provável alta incidência de *P. lutzii* na Região Centro-Oeste, existem fortes evidências da sua ocorrência também nas regiões Norte e Sudeste do Brasil (TAKAYAMA et al., 2009; ARANTES et al., 2013). Salgado-Salazar et al. (2010) analisaram genes mitocondriais e apoiaram a descrição formal de *P. lutzii* como uma diferente espécie dentro do gênero. Entretanto, os autores não concordam em definir os grupos S1, PS2 e PS3 como espécies distintas, sendo consideradas apenas variantes geográficas. Análises dos genomas completos de diferentes isolados *Paracoccidioides* spp. também confirmam a especiação entre os dois principais grupos (DESJARDINS et al., 2011). Dessa forma, Teixeira et al. (2014) descrevem formalmente a nova espécie com base em dados filogenéticos, de genômica comparativa, análises de recombinação e características morfológicas e a nomeiam de *P. lutzii*

em homenagem ao médico micologista Adolfo Lutz que caracterizou morfológicamente a espécie *P. brasiliensis*.

Apesar da variabilidade genética encontrada entre as espécies crípticas de *Paracoccidioides*, ainda não é claro como esses diferentes grupos diferem em características como virulência, potencial em gerar resposta imune no hospedeiro e patogenicidade da PCM, bem como diversas outras características biológicas, como fisiologia, morfologia e mesmo aspectos ecológicos.

Ao estudar a dinâmica da infecção causada por isolados S1 e PS2 em camundongos B10.A, Carvalho et al. (2005) verificaram que a espécie críptica PS2 estimula uma resposta imune diferenciada no hospedeiro, do tipo Th1, o que previne a progressão da PCM, podendo este grupo ser considerado menos virulento. Entretanto, isolados deste grupo apresentaram-se bastante virulentos em outros modelos experimentais, como em hamster com inoculação pela via intratesticular (HEBELER-BARBOSA et al., 2003) e camundongos suíços “outbreeds” (KUROKAWA et al., 2005). As diferenças entre as espécies *P. lutzii* e *P. brasiliensis* em seus processos de virulência ainda não são bem compreendidas. Entretanto, já foi observado que genes que codificam potenciais fatores de virulência apresentam diferentes padrões evolutivos em isolados *P. lutzii* e *P. brasiliensis* (MATUTE et al., 2008; MACHADO et al., 2013). Como pode ser observado, a questão ainda permanece longe de estar completamente elucidada. Dessa forma tornam-se necessários estudos de virulência envolvendo isolados *P. lutzii* e *P. brasiliensis*, para melhor entendimento do processo e do grau de virulência de cada uma das duas espécies.

O uso de insetos como modelo experimental em estudos de virulência

Apesar de insetos e vertebrados estarem separados a 500 milhões de anos, muitos aspectos bioquímicos e fisiológicos permaneceram similares entre os dois grupos. Insetos, assim como vertebrados, possuem componentes humorais e celulares em sua resposta imune (KAVANAGH e REEVES, 2007). As respostas imunes inatas dos dois grupos possuem vários aspectos semelhantes, como o envolvimento de hemócitos em insetos e neutrófilos em mamíferos (KAVANAGH e REEVES, 2004). Tais tipos celulares possuem funções semelhantes, incluindo fagocitose e inativação de patógenos e no caso dos neutrófilos, envolvimento central na resistência a *Paracoccidioides* sp. (FORTES et al., 2011). Além disso, as vias de produção de superóxido possuem similaridades, incluindo o envolvimento de proteínas homólogas (BERGIN et al., 2005). Também já foi demonstrado que fatores de

virulência em certos fungos são importantes tanto na infecção de modelos experimentais invertebrados quanto de vertebrados (BRENNAN et al., 2002; DUNPHY et al., 2003; KAVANAGH e REEVES, 2004; MYLONAKIS et al., 2005; LONDON et al., 2006).

Existem modelos invertebrados de virulência já bastante utilizados para o estudo de fungos patogênicos, como são os casos do nematódeo *Caenorhabditis elegans* (MYLONAKIS et al., 2002; MYLONAKIS et al., 2003; TANG et al., 2005), das larvas de traça da cera da espécie *Galleria mellonella* (BRENNAN et al., 2002; DUNPHY et al., 2003; REEVES et al., 2004; MYLONAKIS et al., 2005; JACKSON et al., 2009) e da mosca de frutas *Drosophila melanogaster* (MYLONAKIS e ABALLAY, 2005; LIONAKIS e KONTOYIANNIS, 2005; FUCHS e MYLONAKIS, 2006). As espécies fúngicas mais estudadas por esses modelos são *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* e *Cryptococcus neoformans*. Até mesmo estudos envolvendo espécies patogênicas de bactérias, como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, veem se utilizando de modelos experimentais invertebrados. As vantagens da utilização de organismos invertebrados como modelos experimentais são principalmente a facilidade e o baixo custo na aquisição e manutenção desses modelos. Adicionalmente, a crescente demanda da sociedade atual pela diminuição do uso de modelos vertebrados na pesquisa científica, motivou o uso do modelo inseto no presente estudo.

A via de inoculação fúngica em larvas de *G. mellonella* é bastante conhecida (MYLONAKIS et al., 2007). Os estágios larvais dessa espécie podem ser mantidos a 37°C, mimetizando a temperatura do hospedeiro vertebrado (KAVANAGH e REEVES, 2007). Os níveis de virulência podem ser estimados pela morte dessas larvas, processo caracterizado por forte melanização, facilitando as análises.

Galleria mellonella já demonstrou ser um modelo cuja aferição de virulência apresenta correlação com modelos roedores (BRENNAN et al., 2002; JACKSON et al., 2009), reflete variação de virulência entre isolados (REEVES et al., 2004) e entre diferentes cargas fúngicas inoculadas (MYLONAKIS et al., 2005). Thomaz et al. (2013) ao infectarem larvas de *G. mellonella* com Pb01 (isolado *P. lutzii*) e outros dois isolados *H. capsulatum* concluíram que o inseto possui potencial como modelo de estudo e comparação de virulência entre os fungos dimórficos. Pb01 apresentou resposta diferencial em relação a concentração de leveduras inoculadas apenas quando os insetos eram armazenados a 37°C após a infecção.

Diante do exposto e levando-se em consideração que não existe um estudo comparativo entre as duas espécies do gênero *Paracoccidioides* utilizando-se de modelos experimentais invertebrados, o presente estudo buscou, entre outros objetivos, a padronização

e caracterização de um ensaio de virulência envolvendo larvas de *G. mellonella*. Tal modelo, além de auxiliar na elucidação da variação de virulência entre isolados *P. brasiliensis* e *P. lutzii*, pode ser utilizado na determinação de genes envolvidos no processo de infecção das duas espécies.

A glicoproteína gp43 e sua variação interespecífica

A glicoproteína gp43, de peso molecular de 43 kDa, é o antígeno imunodominante em *P. brasiliensis*. Pacientes acometidos com forma severa da PCM apresentam altas doses de anticorpos anti-gp43, que tendem a diminuir com o tratamento da doença (MENDES-GIANNINI et al., 1990a; BLOTTA e CAMARGO, 1993). Acreditava-se que a gp43 fosse um fator de virulência por apresentar propriedades proteolíticas sobre o colágeno, a elastina e a caseína (MENDES-GIANNINI et al., 1990b). Entretanto, essa função proteolítica da gp43 não foi confirmada e estudos mais recentes indicam que o principal papel dessa glicoproteína no processo de infecção é o de adesão a laminina e fibronectina (VICENTINI et al., 1994; GESZTESI et al., 1996; MENDES-GIANNINI et al., 2006, TORRES et al., 2013). Ao silenciarem o gene codificador da gp43 em um isolado *P. brasiliensis*, Torres et al. (2013) estudaram a importância dessa molécula em modelo experimental murino e interação com macrófagos. A expressão diminuída de gp43 está relacionada com aumento da resposta inflamatória e diminuição da carga e recuperação fúngica, sugerindo importância dessa molécula na virulência de *P. brasiliensis*.

A gp43 possui diferentes isoformas (PUCCIA et al., 1986; MOURA-CAMPOS et al., 1995). Essas isoformas provavelmente estão relacionadas à grande variabilidade de seu gene codificador, estudada por Morais et al. (2000). As mutações pontuais na fase de leitura aberta (ORF) do gene que codifica a gp43, o *PbGP43*, resultam em cinco genótipos diferentes (PUCCIA et al., 2008). Segundo Matute et al., 2008, o gene está sob seleção positiva, apresentando maior número de mutações não sinônimas em relação às sinônimas. Além disso, a taxa de mutações não-sinônimas, que potencialmente causam variabilidade funcional no produto gênico final, apresenta-se mais elevada entre os isolados *P. lutzii* do que entre isolados *P. brasiliensis* (MATUTE et al., 2008; MACHADO et al., 2013). Adicionalmente, *P. lutzii* e *P. brasiliensis* possuem SNPs próprios e característicos nesse gene, que podem inclusive serem empregados para o reconhecimento das duas espécies (THEODORO et al., 2012), evidenciando variação inter-específica do *PbGP43*. Ao expressarem em *Pichia pastoris* o *rPIP43*, ortólogo de *PbGP43* em *P. lutzii*, Leitão et al. (2014) postularam que a

proteína apresenta 81% de identidade com a gp43 de *P. brasiliensis*. Foi observado que a proteína p43, expressa por *PIP43*, apresenta apenas poucos epítomos comuns a gp43, possuindo inclusive o sítio de glicosilação NRT mutado para KRT, demonstrando mudança estrutural, o que sugere que em *P. lutzii* essa proteína pode não estar glicosilada.

Aparentemente, gp43 tem grande importância imunológica em alguns isolados, porém em outras cepas seu efeito imunológico pode não ser tão determinante. Ao analisar os antígenos produzidos a partir dos isolados B-339 e 550B, Batista Jr. et al. (2010) observaram que o primeiro isolado produzia altas taxas da gp43, com uma banda bastante evidente no SDS-PAGE realizado. Em contrapartida, essa banda é inexistente no filtrado de 550B, enquanto uma banda de 60kDa é a mais evidente. B-339 é pertencente à espécie S1, enquanto o 550B é oriundo da Região Centro-Oeste, onde ocorre, segundo Teixeira et al. (2009), principalmente a espécie *P. lutzii*. Variações tanto qualitativas quanto quantitativas entre a gp43 de *P. brasiliensis* e a p43 de *P. lutzii* devem apresentar implicações não só no diagnóstico sorológico da doença (MACHADO et al., 2013; LEITÃO et al., 2014) como também no processo de infecção.

Transformação fúngica e *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation (ATMT)

Os primeiros trabalhos envolvendo transformação fúngica foram realizados com as espécies *Neurospora crassa* (MISHRA et al., 1973; MISHRA e TATUM, 1973; CASE et al., 1979) e *Saccharomyces cerevisiae* (BEGGS, 1978; HINNEN et al., 1978). A forma mais comum de transferência gênica envolvia a obtenção de protoplastos, ou seja, células fúngica sem parede celular, já que esta é a principal barreira na passagem do DNA exógeno para o interior da célula fúngica (OLMEDO-MONFIL et al., 2004). A metodologia, apesar do surgimento de outras alternativas, ainda é bastante empregada. Atualmente a eletroporação é uma técnica bastante utilizada e consiste na indução de permeabilidade das membranas biológicas através da exposição a um campo elétrico de alta amplitude por um rápido período, permitindo incorporação de DNA recombinante por bactérias e fungos, entre outros (RUIZ-DÍEZ, 2002). Ainda existem outras metodologias de transformação empregadas, como a transformação por permeabilização celular com acetato de lítio (FINCHAM, 1989) e por bombardeamento de partículas (SANFORD et al., 1987).

Uma das metodologias de transformação fúngica mais empregadas atualmente é transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT), apresentando como uma técnica rápida, de alta eficiência mesmo em espécies fúngicas de difícil transformação, além

de promover a integração de cópias únicas do DNA de interesse no genoma da célula infectada (MICHELSE et al., 2005). A técnica baseia-se na capacidade natural desta espécie de bactéria em transferir parte de seu DNA para células vegetais graças a um plasmídeo denominado Ti (“tumor inducing”). O plasmídeo Ti possui uma região de DNA de transferência (T-DNA), que contém oncogenes e é flanqueada por regiões denominadas bordas esquerda (LB) e direita (RB). Durante o processo de infecção o T-DNA é incorporado aleatoriamente no genoma da célula hospedeira. Além desta região, o plasmídeo Ti possui os chamados genes *vir*, responsáveis pela transferência do T-DNA (GELVIN, 2003; MICHELSE et al., 2005).

Para a transformação fúngica “in vitro”, as linhagens de *A. tumefaciens* devem possuir plasmídeos Ti com os oncogenes presentes no T-DNA deletados, sendo consideradas linhagens desarmadas, porém ainda capazes de realizar transferência de DNA (LACORTE e MANSUR, 1993). Desta forma, para a realização da ATMT, a bactéria deve possuir ainda um segundo plasmídeo, com os genes de interesse inseridos entre as regiões LB e RB (ROGERS et al., 1986). Esses plasmídeos, denominados vetores binários, são capazes de se replicar tanto em *E. coli* como em *A. tumefaciens* e se mantêm independentemente da presença do vetor Ti. Além do gene de interesse, o plasmídeo binário deve possuir uma região de múltiplos sítios de clonagem para a inserção das sequências gênicas desejadas, uma região promotora adequada e genes para seleção das linhagens transformantes de *E. coli*, *A. tumefaciens* (gene de resistência a um antibiótico) e do fungo a ser infectado (PALLU, 2010).

Inicialmente a técnica de ATMT era empregada exclusivamente para a transformação de células vegetais. Entretanto, Bundock et al. (1995) adaptaram a metodologia para a transformação de *S. cerevisiae* e posteriormente De Groot et al. (1998) fizeram o mesmo para fungos filamentosos. Leal et al. (2004) foram os responsáveis pelo primeiro relato de ATMT em *P. brasiliensis* e a metodologia foi posteriormente aprimorada por Almeida et al. (2007). Ambos os trabalhos utilizaram genes de resistência a canamicina e higromicina para selecionar respectivamente as linhagens de *A. tumefaciens* e *P. brasiliensis* transformantes. Além disso, Almeida et al. (2007) inseriram no vetor binário o gene GFP, regulado separadamente por regiões promotoras de *H. capsulatum*, *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus flavus* e que é responsável por conferir fluorescência às leveduras de *P. brasiliensis*. Menino et al. (2012) descreveram passo a passo a metodologia de ATMT em *P. brasiliensis* sem a necessidade de utilização de um vetor binário, sendo o T-DNA construído em *E. coli* diretamente entre as bordas LB e RB do plasmídeo de transferência pCR35.

RNA de interferência e a tecnologia de RNA antisense

RNA de interferência (RNAi) é um processo exercido por moléculas de RNA complementares a um RNA mensageiro (mRNA) a fim de inibir a expressão gênica seja na fase de tradução ou na transcrição do próprio gene. Além de regular especificamente a expressão gênica celular, os processos de RNAi estão envolvidos na defesa da célula contra a expressão de material genético exógeno, como é o caso de transposons e vírus de DNA e RNA (ALBERTS et al., 2008). Atualmente, o processo de RNAi vem sendo mimetizado em laboratório de várias formas a fim de realizar o silenciamento de genes de interesse (CURTIS e NARDULLI, 2009).

A técnica de RNA antisense (aRNA) consiste na simples complementariedade do RNA mensageiro (mRNA) alvo com essas moléculas produzidas intercelularmente por um vetor de expressão (WEISS et al., 1999). Tal complementariedade bloqueia diretamente sua tradução impedindo a ligação do ribossomo ao mRNA (MA e SIMONS, 1990), além de possivelmente ativar vias de degradação mediadas por RISC e estabelecer imprint epigenético (WERNER e SAYER, 2009). aRNA é largamente empregado em plantas (BIRD et al., 1991; SCHUCH et al., 1991) e fungos (BAUTISTA et al., 2000; DE BACKER et al., 2001; GORLACH et al., 2002; LIU e GELLI, 2008) em estudos de genética funcional. Além disso, ocorre naturalmente em células humanas (LYLE et al., 2000) e possui potencial terapêutico em humanos (WEISS et al., 1999; WERNER e SAYER, 2009).

Em *Paracoccidioides*, a técnica de aRNA combinada com ATMT (Menino et al., 2012) vem sendo empregada a fim de realizar o silenciamento de potenciais fatores de virulência. Rbt5, um captador de membrana de fontes de ferro (BAILÃO et al., 2014); a hidrolase de 32kDa que exerce o papel de adesina (HERNÁNDEZ et al., 2010); e SconC, importante na transição micélio-levedura, bem como na assimilação inorgânica de enxofre (MENINO et al., 2013) tiveram seus papéis na virulência confirmados através da obtenção de cepas knockdown para seus respectivos genes.

Em relação a gp43, tal abordagem já foi utilizada em isolado do grupo *P. brasiliensis* e foi capaz de diminuir a expressão gênica de PbGP43 em até 80% (TORRES et al., 2013). Segundo os autores, o transformante obtido não apresentou diferenças em comparação com o tipo selvagem em relação a características como aspecto morfológico e viabilidade. Sua patogenicidade, aferida em modelo camundongo, demonstrou-se diminuída, entretanto. Apenas o isolado Pb339 (*P. brasiliensis*) foi empregado nesse estudo, não havendo na atual literatura relato do silenciamento do gene ortólogo em *P. lutzii*. Utilizando-se do processo de

RNAi, Edwards et al. (2011) verificaram que o gene *AGSI*, importante na formação da parede celular, possui importância na virulência de apenas um dos dois genótipos de *H. capsulatum* estudados.

O presente trabalho buscou melhor compreender a influência da variabilidade entre *PbGP43* de *P. brasiliensis* e *PIP43* em *P. lutzii* no processo de virulência das duas espécies através de silenciamento gênico por aRNA e ATMT e posterior inoculação dos transformantes no modelo experimental alternativo *Galleria mellonella*.

Objetivos

Geral

Estabelecer comparações entre os processos de virulência em *Paracoccidioides brasiliensis* e *P. lutzii*, utilizando-se de modelos alternativos de bioensaio em *Galleria mellonella* e silenciamento gênico por RNA antisense.

Específicos

a) Padronizar ensaios para estudo da virulência de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* utilizando-se do modelo experimental alternativo *G. mellonella*;

a.1) Avaliar o efeito de diferentes concentrações do inóculo de *P. brasiliensis* na mortalidade de larvas de *G. mellonella*;

a.2) Comparar a virulência de isolados de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* em larvas de *G. mellonella*;

a.3) Reisolar *Paracoccidioides* sp. após infecção em *G. mellonella* e avaliar o efeito da passagem no hospedeiro inseto na produção de conídios;

b) Promover e confirmar silenciamento do gene codificador da gp43 e p43, potencialmente importante no processo de virulência, em *P. brasiliensis* e *P. lutzii*, respectivamente.

c) Verificar a importância da gp43 e da p43 no processo de virulência tanto de *P. brasiliensis* quanto de *P. lutzii* através da infecção de larvas de *G. mellonella* com leveduras silenciadas para os seus genes codificadores.

Capítulo único

Experimental infection of *Paracoccidioides brasiliensis* and *P. lutzii* in *Galleria mellonella* using wild and knockdown *PbGP43* and *PIP43* strains.

Experimental infection of *Paracoccidioides brasiliensis* and *P. lutzii* in *Galleria mellonella* using wild and knockdown *PbGP43* and *PIP43* strains.

Gabriel Capella Machado¹ and Eduardo Bagagli¹

¹ Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brazil

Abstract

Paracoccidioidomycosis (PCM), an important systemic mycosis in Latin America, is caused by the cryptic species *Paracoccidioides brasiliensis* and *P. lutzii*. How these species differ in their virulence factors is still unknown and needs to be properly evaluated. While the role of *PbGP43*, which codes *gp43*, as a virulence factor is relatively well established for *P. brasiliensis*, the same is not true for its ortholog in *P. lutzii*, namely *PIP43*. *PbGP43* and *PIP43* present differences in their nucleotide sequences, expression levels, epitope occurrence and influences on PCM diagnosis. Herein, we obtained *PbGP43* and *PIP43* knockdown strains by antisense RNA technology combined with ATMT, in order to comparatively evaluate their effects on virulence, employing the alternative experimental host *Galleria mellonella* larvae. Our results suggest that *p43* is important in the *P. lutzii* infectious process, as previously demonstrated by *gp43* in *P. brasiliensis*. We confirmed *G. mellonella* as a useful model for studying *P. brasiliensis* and *P. lutzii* virulence, since it reflects variation between inoculum size and different strains, as well as between wild-type and respective knockdown transformant strains. Virulence levels may vary among isolates of the same species, probably reflecting that the physiological condition is more important than the species effect. Re-isolation of *Paracoccidioides* from experimentally infected *G. mellonella* larvae is possible and might be useful for epigenetic studies related to infection.

Keywords: *Paracoccidioides* spp.; *Galleria mellonella*; *PbGP43*; *PIP43*; antisense RNA

Introduction

The dimorphic fungi *Paracoccidioides brasiliensis* and *P. lutzii* (Onygenales, Ascomycota) are the causative agents of paracoccidioidomycosis (PCM), one of the most important mycosis in Latin America, occurring from Mexico to Argentina (Franco et al., 1994). *Paracoccidioides* spp. grow on soil in its mycelial form, producing the infectious conidia. Once inhaled by a susceptible host, these structures convert to a multi-budding yeast form in the lungs and cause the disease (McEwen et al., 1987; Franco et al., 1994; Lacaz et al., 2002). The fungi may spread to other organs and tissues, affecting mainly mucous, skin, lymph nodes, adrenal glands, spleen and liver (Palmeiro et al., 2005). PCM causes high social impact; since most of infected are poor rural workers, the disease is difficult to treat and frequently causes death or important sequelae. Besides humans, *Paracoccidioides* spp. has also been isolated, and/or histopatologically detected, frequently in armadillos (Naiff et al., 1986; Bagagli et al., 1998; Corredor et al., 1999; Bagagli et al., 2003) and sporadically in dogs (Ono et al., 2001; Ricci et al., 2004; Farias et al., 2005) and sloths (Trejo-Chávez et al., 2011). In addition, it has been detected by serological and intradermic tests (Costa et al., 1992; Corte et al., 2007; Corte et al., 2009; Oliveira et al., 2013; Belitardo et al., 2014a; Belitardo et al., 2014b) and by Nested-PCR (Richini-Pereira et al., 2008) in a wide range of other vertebrates. For a century, the genus *Paracoccidioides* encompassed a single species, *P. brasiliensis*. However, phylogenetic studies in the last decade (Matute et al., 2006; Carrero et al., 2008; Theodoro et al., 2008; Teixeira et al., 2009; Salgado-Salazar et al., 2010) have indicated that *P. brasiliensis* is a complex of cryptic species. Accordingly, Teixeira et al. (2014) describes *P. lutzii* as a new species based mainly on phylogenetic and recombination analysis, together with comparative genomics data and some morphological characteristics. *P. brasiliensis* and *P. lutzii* appear to present distinct geographic distribution (Teixeira et al., 2009) and antigenic properties that affect serological diagnosis (Batista et al., 2010; Machado et al., 2013). In addition, these species might vary in their virulence factors and response to treatments, which still need be properly evaluated, demanding innovative experimental models.

The greater wax moth *Galleria mellonella* has been used as an alternative experimental model for a wide range of pathogens, including fungi (Brennan et al., 2002; Dunphy et al., 2003; Reeves et al., 2004; Mylonakis et al., 2005; Jackson et al., 2009). Innate

immune systems of insects and vertebrates have several features in common. For example, both insect hemocytes and mammalian neutrophils perform a similar function, namely engulfing and killing pathogens (Kavanagh and Reeves, 2007), whereas neutrophils play a central role in *Paracoccidioides* sp. resistance by mammalian host (Fortes et al., 2011). Fungal virulence factors exert influence in both vertebrates and invertebrate hosts (Brennan et al., 2002; Dunphy et al., 2003; Kavanagh and Reeves et al., 2004; Mylonakis et al., 2005; London et al., 2006). Moreover, the experimental model of *G. mellonella* demonstrates a virulence correlation with murine models (Brennan et al., 2002; Jackson et al., 2009) and reflects both strain and fungal burden effects (Reeves et al., 2004; Mylonakis et al., 2005). Thomaz et al. (2013) have shown that *G. mellonella* is a useful model for assessing and comparing the virulence of dimorphic fungi, by studying one *P. lutzii* and two other *Histoplasma capsulatum* isolates.

Gp43 is the main antigenic component described in *P. brasiliensis* (Puccia et al., 1986). Patients with severe PCM present high antibody titers of anti-gp43, which tend to decrease during successful treatment (Mendes-Giannini et al., 1990; Blotta and Camargo, 1993). This glycoprotein plays an important role during infection, adhering to the extracellular matrix components, namely laminin and fibronectin (Vicentini et al., 1994; Gesztesí et al., 1996; Mendes-Giannini et al., 2006, Torres et al., 2013). *PbGP43*, the gene encoding for gp43, presents different genotypes (Puccia et al., 2008), resulting in different protein isoforms (Moura-Campos, 1995; Moraes et al., 2000). *PbGP43* is under positive selection (Matute et al., 2008) presenting high rates of non-synonymous mutation, especially in *P. lutzii* isolates (Machado et al., 2013). *PIP43* gene, the ortholog of *PbGP43* in *P. lutzii*, has specific SNPs that could be used for species recognition (Theodoro et al., 2012) and its protein, p43, presents only 81% similarity with *P. brasiliensis* gp43 (Leitão et al., 2014). Many gp43 epitopes are absent in *P. lutzii* p43 protein, including the NRT glycosylation site (Leitão et al., 2014). Moreover, p43 appears to be underexpressed in *P. lutzii* strains, probably presenting consequences in serological diagnosis and infective process (Batista et al. 2010; Machado et al., 2013; Leitão et al., 2014).

Antisense RNA (aRNA) technology has been used to study gene function in several organisms, including fungi (Bautista et al., 2000; De Backer et al., 2001; Gorchach et al., 2002; Liu and Gelli, 2008). This technique consists of simple complementarity between messenger RNA (mRNA) and an aRNA encoded by an introduced gene, partially blocking (knocking

down) protein translation (Ma and Simons, 1990; Weiss et al., 1999; Werner and Sayer, 2009). In *Paracoccidioides* sp., aRNA knockdown technology has already been applied to demonstrate the role of some virulence factors, such as the membrane protein Rbt5 in iron uptake (Bailão et al., 2014), 32kDa hydrolase adherence to host cells (Hernández et al., 2010) and SconC participation in the mycelial/yeast transition (Menino et al., 2013). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (ATMT) has been used successfully in *Paracoccidioides* transformation studies to transfer the plasmids that harbor aRNA sequences and resistance genes that permit the selection of the fungal and bacterial recombinants (Leal et al., 2004; Almeida et al., 2007; Menino et al., 2012). The use of aRNA combined with ATMT, according to Torres et al. (2013), reduced *PbGP43* expression by 80% in a *P. brasiliensis* transformant, which permitted correlating *gp43* reduction with the increase in inflammatory response and the decrease in fungal recovery in a murine model. Our present work also aimed to accomplish the knocking down of *PbGP43* in *P. brasiliensis*, as well as its ortholog *PIP43* in *P. lutzii*, in order to compare their influence on virulence, using *G. mellonella* as the experimental model.

Materials and Methods

Paracoccidioides spp. isolates

Three *P. brasiliensis* isolates and two of *P. lutzii* were employed in *G. mellonella* virulence assays (Table 1), of which Pb192 and Pb8834 were used in the knockdown experiments. These strains were maintained in their yeast forms on YPDA medium (4% dextrose, 1% peptone, 0.8% agar, 0.8% yeast extract w/v), subcultured every two weeks and in mycelial form in Mycosel Agar™ (BD), subcultured every three months.

Table 1. *Paracoccidioides* spp. isolates used

Isolate	Cryptic species	Procedência	Original host	Sample
Pb339	<i>P. brasiliensis</i>	São Paulo/SP	Human	Unknown
Pb192	<i>P. brasiliensis</i>	São Paulo/SP	Human	Unknown
T15LN1	<i>P. brasiliensis</i>	Manduri/SP	Armadillo	Lymph node
Pb01	<i>P. lutzii</i>	Goiânia/GO	Human	Unknown
Pb8334	<i>P. lutzii</i>	Goiânia/GO	Human	Unknown

Construction of antisense PbGP43 and PIP43 plasmids

The plasmid utilized, pCR498, kindly donated by Prof. Chad Rappleye (Ohio State University, USA), harbors the kanamycin resistance gene APH-3 for selection in *Escherichia coli* and *A. tumefaciens*, the hygromycin resistance gene hph for selection in *Paracoccidioides* sp. and the GFP gene regulated by a *H. capsulatum* promoter P(EIFa). Following Menino et al. (2012), three primers pairs were designed for antisense oligonucleotide amplification based on the genomic sequence of *P. brasiliensis* Pb339 (Cisalpino et al., 1996; GenBank accession No. AY005437) and two others based on the PIP43 exon 2 sequence of *P. lutzii* Pb8334 (Teixeira et al., 2014; GenBank accession No. JN680100.1) (Table 2). Employing XbaI and AscI restriction enzymes and T4 ligase (NEBiolabs) and following the manufacturer's instructions, the antisense oligonucleotides were individually inserted into pCR498 plasmids in place of the GFP gene and cloned in *E.*

coli DH5 α . The *E. coli* heat shock transformations were confirmed by colony PCRs using the aRNA designed primers (Table 2).

Table 2. Primers for antisense *PbGP43* and *Plp43* oligonucleotide amplification

Primer	<i>PbGP43/PIP43</i> position	Sequence
agp1F	5'UTR <i>P. brasiliensis</i> (-302 a -283)	5'- <i>gcgctctaga</i> atgccccactcaataagggc-3'
agp1R	5'UTR <i>P. brasiliensis</i> (-6 a -25)	5'- <i>gcgcgggcgcgcc</i> cctatgaccacaaaaccttg-3'
agp2F	Exon 1 <i>P. brasiliensis</i> (13 a 32)	5'- <i>gcgctctaga</i> tctctaacctggctcttg-3'
agp2R	Exon 1 <i>P. brasiliensis</i> (396 a 415)	5'- <i>gcgcgggcgcgcc</i> aagcgccttgccaatag-3'
agp3F	Exon 2 <i>P. brasiliensis</i> (632 a 651)	5'- <i>gcgctctaga</i> ccatccatactctgcaatc-3'
agp3R	Exon 2 <i>P. brasiliensis</i> (1296 a 1315)	5'- <i>gcgcgggcgcgcc</i> catacttctagcccataatc-3'
agp4F	Exon 2 <i>P. lutzii</i> (14 a 33 do exon2)	5'- <i>gcgctctaga</i> catcgttcgtgggtagaca-3'
agp4R	Exon 2 <i>P. lutzii</i> (381 a 400 do exon 2)	5'- <i>gctgcgggcgcgcc</i> ctgctgagcggacaatttgga-3'
agp5F	Exon 2 <i>P. lutzii</i> (108 a 127 do exon 2)	5'- <i>gcgctctaga</i> ttcaagaacgtccacctgca-3'
agp5R	Exon 2 <i>P. lutzii</i> (217 a 236 do exon2)	5'- <i>gctgcgggcgcgcc</i> cttatcgactccgctaagtc-3'

***bold and italics**: restriction site for XbaI; **only bold**: restriction site for AscI

Agrobacterium tumefaciens transformation

The AGL-1 strain of *A. tumefaciens*, prepared to be in an electrocompetent condition, was used as described by Hellens et al. (2000). The cell aliquots were maintained on ice, mixed with the plasmid construction (40:1 μ l) and submitted to electroporation, by using the equipment Eletroporator 2510TM (Eppendorf), with electric pulses of 2.5 kV, 25 mF and 200 W. Transformant cells were recovered on liquid LB and selected on LB agar with 100 μ g/ml kanamycin. Transformation was confirmed by colony PCR for amplification of aRNA sequences with the specific primers (Table 2).

Agrobacterium tumefaciens-Mediated Transformation of *Paracoccidioides* sp. (ATMT)

The isolates Pb192 and Pb8334 were employed for transformation with *A. tumefaciens* containing plasmids harboring aRNA sequences complementary to *PbGP43* and *PIP43* genes of *P. brasiliensis* and *P. lutzii*, respectively. *A. tumefaciens* and *Paracoccidioides* sp. cells mixtures in variable ratios (10:1, 1:1, 1:5, and 1:10) in total volumes of 0.5ml were

applied onto a sterile Hybond-N™ membrane (Amersham Biosciences) placed on solid induction medium (Menino et al., 2012). After 3 days at 25°C, the membranes were transferred to BHI liquid medium containing 200 mg/mL cefotaxime. BHI agar selective medium containing 50 mg/mL Hygromycin B was used to select *Paracoccidioides* sp. transformants (HygR). After 6 reculturing cycles, genomic DNA was extracted (McCullough et al, 2000) and transformation confirmed by PCR for amplification of the 990bp internal fragment of Hygromycin resistance *hph* gene, using the primers *hphF* (5'-ATGCCTGAACTCACCGCGAC-3') and *hphR* (5'-CCACTATCGGCGAGTACTTC-3'). The transformants were maintained in BHI containing 75 mg/mL Hygromycin B.

Knockdown evaluation by qPCR

After ten reculturing cycles, total RNA was obtained from HygR transformants and respective wild-types *Pb192* and *Pb8334* in their exponential growth phase (72h) using TRIzol™ reagent (Invitrogen) following Menino et al. (2012) and the manufacturer's instructions. To assess sample quality, RNA was quantified and A260/280 ratios were measured in spectrophotometer. The cDNA was obtained from samples with A260/A280 ratios > 1.8 employing SuperScript III Reverse Transcriptase™ (Invitrogen) and Oligo(dT)20 primers™ (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. A qPCR was performed to assess the knockdown efficiency in *PbGP43* and *PIP43* expression. For that, a pair of degenerated primers was employed, which were designed to anneal the exon-exon junction of *PbGP43* and *PIP43* cDNA of *P. brasiliensis* and *P. lutzii* species. In parallel, the expression of the constitutive β -tubulin gene was also estimated by using the primers TUB2F (5'-AGC CTT GCG TCK GAA CAT AG-3') and TUB2R (5'-CCT CCA TCC AGG AAC TCT TC-3'), described by Michielse et al. (2005), with modifications to anneal cDNA of both species. Experiments were carried out in duplicate. Quantification was performed by comparing the threshold cycle (Ct) values for *PbGP43* and *PIP43* with Ct values for TUB2. Knockdown efficiency was evaluated by measuring the fold-change in *PbGP43* and *PIP43* gene expression in Hyg^R transformants in comparison to correspondent wild-type strain, employing the $2^{\Delta\Delta Ct}$ formula where:

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{TUB2 \text{ HygR}} - Ct_{PbGP43 \text{ HygR}}) - (Ct_{TUB2 \text{ wild-type}} - Ct_{PbGP43 \text{ wild-type}})$$

Exoantigen production and SDS-PAGE

Exoantigens were obtained from wild-types and knockdown Hyg^R strains, following Camargo et al. (1988) with modifications. A 5-day pre-inoculum was obtained in 10ml of YPD liquid medium (4% dextrose, 1% peptone, 0.8% yeast extract w/v) with orbital shaking of 200 rpm at 36°C. This pre-inoculum was transferred to 100ml of YPD liquid medium, and the culture stayed 10 days under the same conditions. After this period, yeast cells were killed by adding thimerosal at 200mg/L and separated from supernatant by centrifugation at 2400rpm. Exoantigen was concentrated in dialysis tubing against Polyethylene Glycol (PEG) 40,000 and dialyzed against nuclease-free water for 3 days. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed according to Laemmli (1970) in 10% gels and silver stained with PlusOne Silver Staining KitTM (GE Healthcare), following the manufacturer's instruction.

Galleria mellonella experimental assay

Adult specimens of the great wax-moth *G. mellonella*, kindly donated by Dr. Silvia Renata Siciliano Wilcken (FCA/UNESP), were maintained at the Animal Facility of Microbiology and Immunology Dept., at room temperature (19-23°C), in appropriate containers for breeding, oviposition and larval production, which were fed with old honeycomb. Larvae in their final stages, weighing 170-210mg, absented melanization and presenting normal motility were used for infection (Dunphy et al., 2003). They were inoculated with a Hamilton MicroliterTM syringe (model 725N, 250µL) into hemocoel through the last proleg (Kavanagh and Reeves, 2007), after a previous cuticle cleaning with cotton impregnated with alcohol 70. In the experiment to assess the burden effect, three groups of ten larvae were used: one was inoculated with 20µl of PBS per larva (control) and the other two inoculated in the same PBS volume, one with 10⁵ and the other with 10⁶ *P. brasiliensis* yeasts per larva (isolate Pb339). Infected larvae were maintained in Petri dishes at 36.5°C and mortality was observed daily. In the experiment to assess differential *Paracoccidioides* sp. strain and species effects on *G. mellonella* survival, seven groups of 24 larvae were used. The C(NT) group was not inoculated, but maintained at 36.5°C like all other groups; C(PBS) were inoculated with 20µl of PBS, while the other 5 groups were inoculated with 20µl of PBS

containing 4×10^5 yeasts of *P. brasiliensis* and *P. lutzii* wild isolates (Table 1) per larva. In the experiment to evaluate gp43 influence on *P. brasiliensis* and *P. lutzii* virulences, one group was inoculated with 4×10^5 yeasts of a *P. brasiliensis* knockdown strain in 20 μ l of PBS and the other group with the same inoculum size of a *P. lutzii* knockdown strain. Their survival curves were compared with curves obtained with respective wild-types strains.

Attempts to re-isolate *P. brasiliensis* and *P. lutzii* from infected larvae of *Galleria mellonella*

Infected larvae, after four or more days of inoculation and presenting symptoms of infections, were washed briefly in 70% alcohol solution and then in sterile PBS for external reduction of contaminants. Two seeding procedures were tested. In the first, larvae were individually macerated in sterile PBS and spread on Mycosel™ (BD) plates. In the second, larvae were fragmented into approximately five pieces directly on Mycosel™ plates, which were incubated at 35°C and observed weekly.

Conidial production evaluation before and after infection in *Galleria mellonella*

The conidial production of T15LN1 *P. brasiliensis* isolate was evaluated, before and after *G. mellonella* re-isolation, using the methodology described by Theodoro et al. (2012), with modifications. Mycelial fragments (3mm diameter) of recent cultures were inoculated on SEA medium plates (soil extract agar, Kwon-Chung, 1973) in five repetitions and incubated for 30 days at 25°C. After this period, the colonies were killed by formaldehyde vaporization. Aerial mycelia were immobilized in Durex™ (3M) and stained with lactophenol cotton blue on microscopy slides. Conidial counts were performed in four different fields per repetition, using an optical microscope with 20x objective.

Statistics

Kaplan-Meyer curves and Log-rank (Mantel-Cox) survival test were employed to compare mortality of different groups in the experimental model *G. mellonella*, using the software SPSS™ (IBM) for Windows™. Non-paired Student's *t* test, with Welch correction, was used to compare conidial production, employing the software GraphPad Instat™.

Results

PbGP43 and *PIP43* knockdown obtainment and evaluation

Five Hygromycin-resistant (Hyg^R) stable transformants were successfully obtained in Pb192 (*P. brasiliensis*) using ATMT, which were confirmed by PCR for amplification of the HPH gene using genomic DNA as template (Figure 1a). In relation to *P. lutzii*, nine Hyg^R transformants were obtained in the isolate Pb8334, of which eight were confirmed by PCR (Figure 1b).

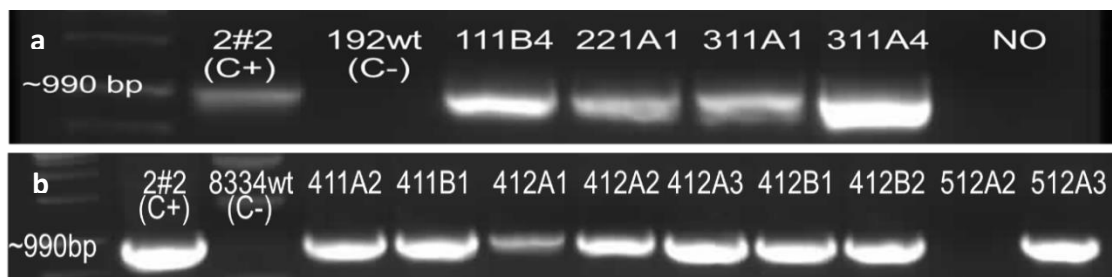


Figure 1. Agarose gel electrophoresis to confirm the transference of HPH gene to the recipient *Paracoccidioides* spp. cells by ATMT process. HPH specific primers were employed to amplify a 990bp internal fragment. As positive control (C+) we used pCR498 extracted from transformed *E. coli* and as negative control (C-) genomic DNA from wild-type strains Pb192 and Pb8334. (a) *P. brasiliensis* Hyg^R transformants; (b) *P. lutzii* Hyg^R transformants.

Three *P. brasiliensis* and two *P. lutzii* Hyg^R transformants presented knockdown efficiency confirmed at different rates by qPCR. Among *P. brasiliensis* transformants, 111B4, 311A1 and 311A4 presented expression levels of 14%, 8% and 36% of *PbGP43*, respectively, in relation to the wild-type Pb192 (Figure 2a). In *P. lutzii*, the transformants 411B1 and 412B2 presented *PIP43* expression levels of 75% and 25%, respectively, in comparison to wild-type Pb8334 (Figure 2b).

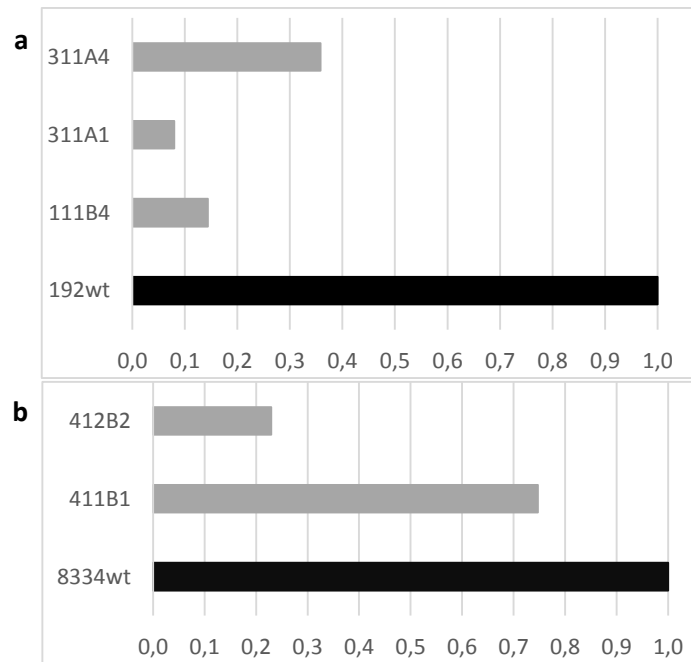


Figure 2. Expression levels assessed by qPCR of (a) *PbGP43* in *P. brasiliensis* and (b) *PIP43* in *P. lutzii* Hyg^R transformants in comparison with respective wild-type. *PbGP43* and *PIP43* expression levels were normalized to the housekeeping gene TUB2 expression.

SDS-PAGE

The amounts of gp43 and p43 exoantigens in the culture supernatants were also estimated indirectly by SDS-PAGE silver stained preparation, for the wild strains and respective transformants of *P. brasiliensis* and *P. lutzii*, respectively (Figure 3). The gp43 amounts in *P. brasiliensis* appear to be slight lower in transformants 111B4 and 311A1, when compared with the respective wild type strain Pb192; while in *P. lutzii*, the amounts of p43 in the transformants 411B1 and 412B2 displayed diminutions in relation to the wild strain 8334.

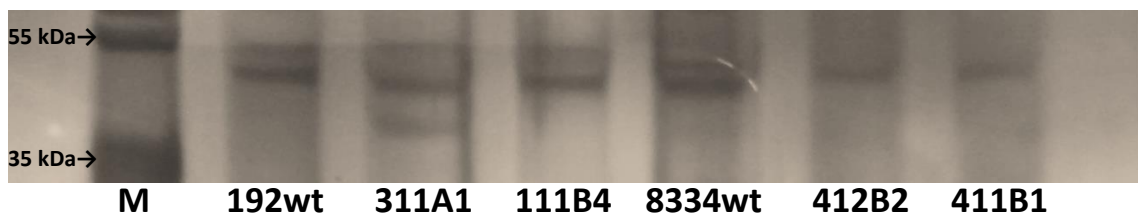


Figure 3. Silver stained SDS-PAGE of exoantigens obtained from *P. brasiliensis* and *P. lutzii* wild-types strains and respective *PbGP43* and *PIP43* knockdown transformants. M: molecular marker PageRuler Plus Prestained Protein LadderTM (Fermentas).

Virulence assay in *Galleria mellonella* with different inoculum concentrations

Ten days after infection, 9 out of 10 larvae died when infected with the highest inoculum (10^6 yeasts per larva) of *P. brasiliensis*. The lowest inoculum (10^5 yeasts per larva) killed 5 of 10 larvae in the same period. Survival curves of *G. mellonella* (Figure 4) infected with two different concentrations demonstrate that the experimental model reflects variations of inoculum size in mortality rates ($p < 0.05$). Only the group infected with the most concentrated inoculum presented a statistically significant difference in lethality when compared with the PBS-inoculated control group ($p < 0.05$).

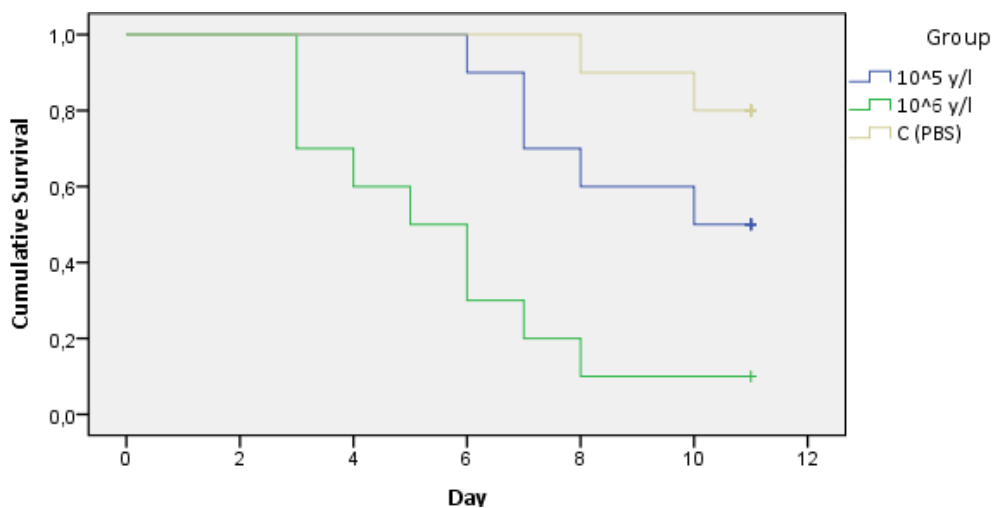


Figure 4. Kaplan-Meier plots of *G. mellonella* survival after injection of different inoculum sizes of *P. brasiliensis* strain Pb339. C(PBS) control group was inoculated with PBS. n = 10 larvae per group

Virulence assay in *Galleria mellonella* with different *Paracoccidioides* strains

P. brasiliensis strains present homogenous virulence rates against *G. mellonella* larvae (Figure 5a). Among 24 larvae inoculated with T15LN1 strain, 20 had died within three weeks after infection. Pb192 and Pb339, both *P. brasiliensis* isolates, killed 19 larvae in the same period. Control groups (uninfected larvae and PBS-inoculated larvae) presented lethality of 4 and 5 insects, respectively. All *P. brasiliensis* isolates reduced survival of *G. mellonella* larvae compared with control groups ($p < 0.001$).

Larval groups inoculated with *P. lutzii* isolates demonstrate distinct survival rates (Figure 5b). While Pb8334 was the most virulent strain in this study compared to all other

isolates ($p < 0.05$) and to control groups ($p < 0.001$), Pb01 was considered avirulent by our data, presenting mortality rates similar to control groups. At the end of third week of infection, Pb8334 inoculum had killed 22 larvae against 6 killed by Pb01. Surviving larvae in all groups that became pupae were considered alive.

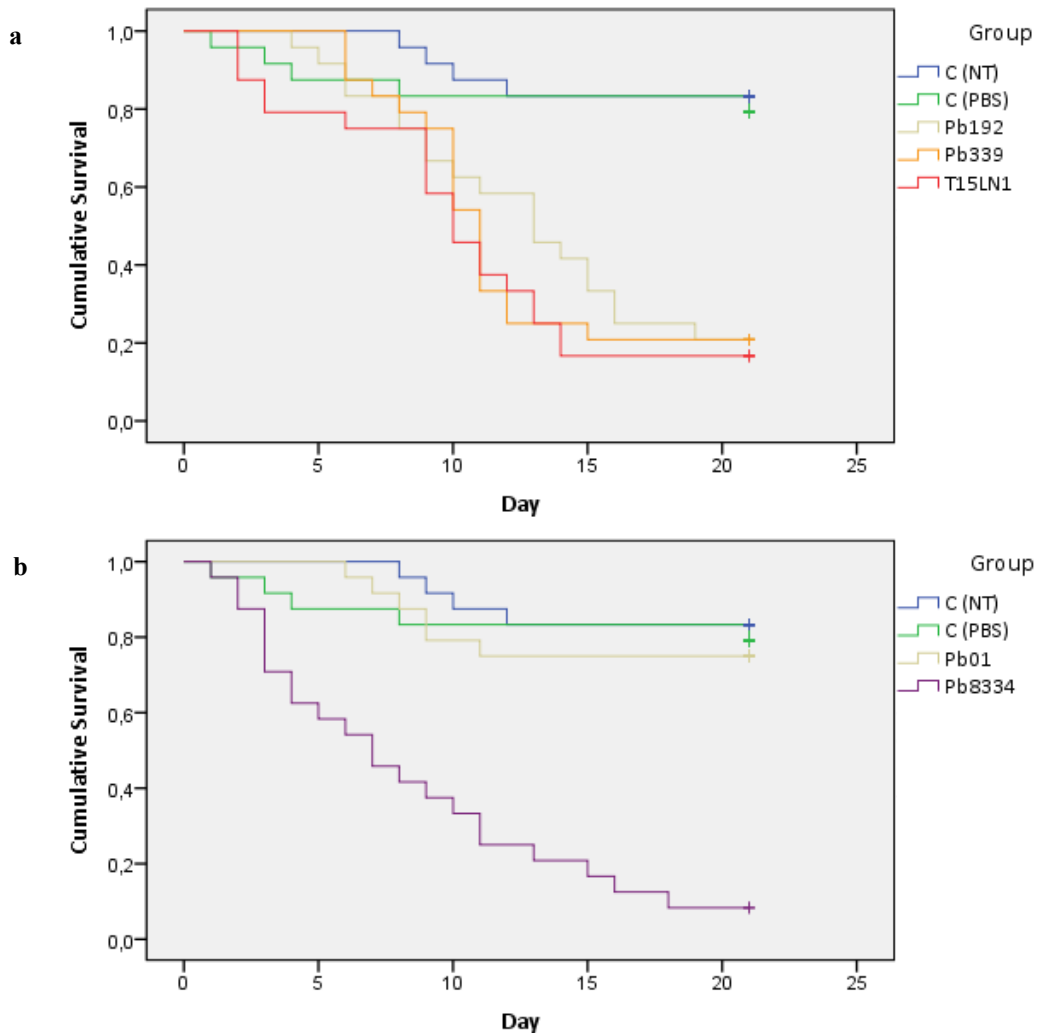


Figure 5. Kaplan-Meier plots of *G. mellonella* survival after injection of different (a) *P. brasiliensis* and (b) *P. lutzii* wild-type isolates. C(PBS) control group was inoculated with PBS, while C(NT) was not inoculated. $n = 24$ larvae per group

Virulence assay in *Galleria mellonella* with *PbGP43* knockdown strains

Transformants with higher levels of *PbGP43* or *PIP43* knockdown (311A1, for *P. brasiliensis* and 412B2, for *P. lutzii*) had their survival Kaplan-Meier curves obtained in the *G. mellonella* experimental model and compared with that plotted from their respective wild

type (Figure 6). The strain 412B2 presented reduced virulence compared with its respective wild type *P. lutzii* Pb8334 ($p < 0.05$). By the end of the third week, Pb8334 had killed 22 larvae versus 19 killed by 412B2 (Figure 6a). The larval group inoculated with *P. brasiliensis* knockdown strain 311A1 did not differ statistically from the group inoculated with the respective wild type Pb192. At the end of the period, Pb192 had killed 19 larvae against 18 killed by 311A1 (Figure 6b). Transformants of both species reduced survival of *G. mellonella* larvae when compared with control groups that received PBS or no treatment ($p < 0.001$).

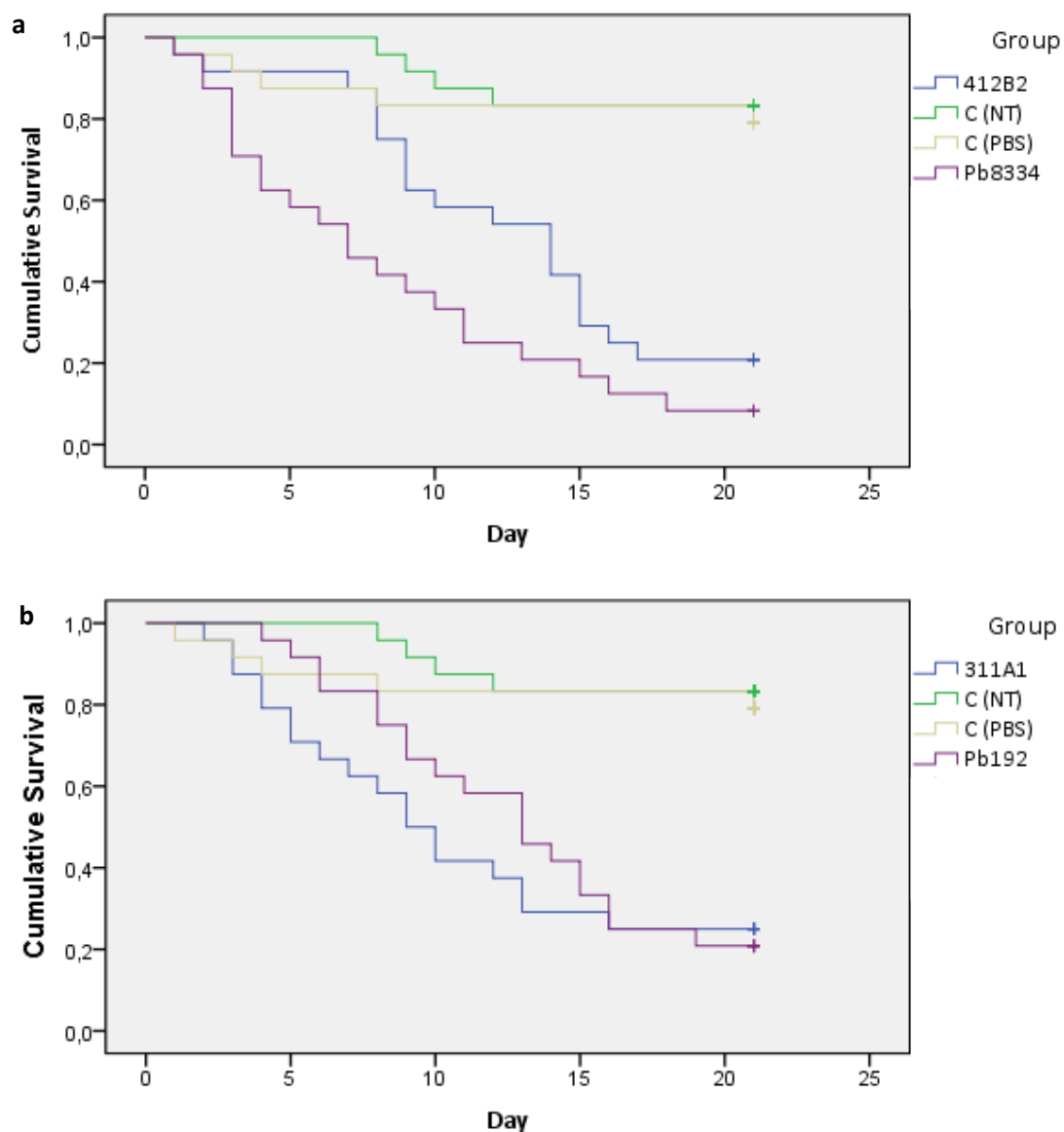


Figure 6. Kaplan-Meier plots of *G. mellonella* survival after infection with transformants knockdown for (a) *PIP43* in *P. lutzii* (412B2) and (b) *PbGP43* in *P. brasiliensis* (311A1) compared to respective wild-type isolates Pb8334 and Pb192. C(PBS) control group was inoculated with PBS, while C(NT) was not inoculated. $n = 24$ larvae per group

Paracoccidioides sp. re-isolation from *Galleria mellonella* and conidial production

Reisolation of *P. brasiliensis* was obtained in fragments of *G. mellonella* larvae killed 4 days after infection with T15LN1 strain (Figure 7). Attempts to isolate *P. brasiliensis* (knockdown strains) and *P. lutzii* (wild and knockdown strains) from infected *G. mellonella* were negative by using both macerated and fragmented larvae.

The re-isolated T15LN1Gm (in reference to re-isolation in *G. mellonella*) presented a decrease in conidial production when compared to original strain T15LN1 ($p < 0.001$). The T15LN1 original strain produced 20.44 ± 14.02 conidia per optical microscopic field, while T15LN1Gm generated 5.50 ± 2.52 .

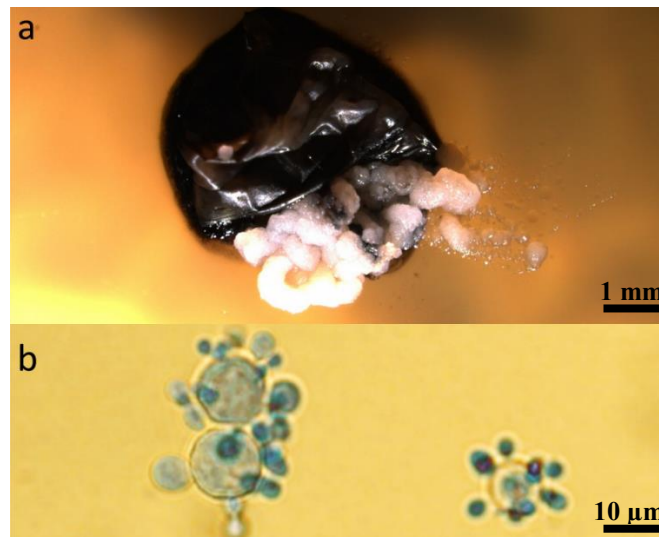


Figure 7. *P. brasiliensis* T15LN1 strain re-isolation from infected *G. mellonella*. (a) T15LN1Gm growing in a larvae fragment seeded in Mycosel™ after 23 days in culture; (b) microscopic aspect with Lactophenol cotton blue staining.

Discussion

We successfully achieved *PIP43* and *PbGP43* knockdown with a detectable level of p43 and gp43 protein diminution, mainly in *P. lutzii* strain. The ATMT approach appears to be an effective strategy to produce stable transformants in both species, as already observed with other construction vectors, promoter regions and *A. tumefaciens* strains (Leal et al., 2004; Almeida et al., 2007; Menino et al., 2012; Torres et al., 2013).

Our data reinforce *Galleria mellonella* larvae as a convenient experimental host for evaluating virulence in *Paracoccidioides* spp., since they reflect the effects of inoculum size and isolates, in concordance with results obtained with *Aspergillus fumigatus* (different strains) (Reeves et al., 2004) and *Cryptococcus neoformans* (variable inoculum) (Mylonakis et al., 2005). Furthermore, Thomaz et al. (2013) observed variation in mortality rates among different *P. lutzii* inoculum sizes when larvae were maintained at 36.5°C, but did not note this correlation when they were kept at 25°C. Our result confirms that 36.5°C is appropriate for assessing *Paracoccidioides* spp. virulence since it represents the host temperature. Progress in larval melanization, observed by Thomaz et al. (2013) was also noted throughout our assay. Survival rates of *G. mellonella* reached zero in the experiments conducted by Thomaz et al. (2013), even in control groups. In our experiments, the larvae that become pupae were considered alive, an event observed more frequently in control groups. The inoculum of 4×10^5 yeasts resuspended in 20 μ l of PBS appears to be adequate for comparing different strains, since higher concentrations may present operational troubles, such as agglomerate formation and syringe blocking.

Paracoccidioides spp. virulence is a strain-specific characteristic, varying among isolates from the same species. In addition, the biological moment of the strain (subculturing intervals, laboratory maintenance time, culture medium employed) also might be particularly important for determining virulence. For instance, the Pb01, a clinical *P. lutzii* strain that has been maintained in laboratory for a considerable time, was shown to be avirulent in the present study. Differences in virulence level had already been reported with the same isolate in different studies with other experimental models (Carvalho et al, 2005; Kurokawa et al., 2005; Macoris et al., 2006; Castilho et al., 2014). Our results suggest that virulence levels are more variable among *P. lutzii* strains than among *P. brasiliensis* strains.

Using aRNA technology, we observed that *PIP43* influences on *P. lutzii* virulence in *G. mellonella* experimental model, as previously described for *PbGP43* in *P. brasiliensis* in murine and macrophage models (Torres et al., 2013). Despite sequence variation (Moraes et al., 2000; Leitão et al., 2014) and fluctuation in its expression levels (Batista et al., 2010; Machado et al., 2013), *p43* must present some important virulence proprieties in *P. lutzii* isolates, even in a different manner of *gp43* for *P. brasiliensis*. Different genotypes or cryptic species with similar lifestyle might present distinct virulence factors as observed in relation to the *AGS1* gene in *H. capsulatum* (Edwards et al., 2011). Decrease in virulence levels was not observed in *P. brasiliensis* transformant herein, probably due to the high production of *gp43* protein in contrast with mRNA reduction. Genomic knockout of *PbGP43* would be more convenient to evaluate this question. Our results, in addition to the findings of Torres et al. (2013), indicate that *PIP43* as well as *PbGP43* are virulence factors and potential therapeutic targets for gene therapy in the entire *Paracoccidioides* genus.

This is the first report of *P. brasiliensis* re-isolation from experimentally infected *G. mellonella*. As the larvae have not been maintained in a sterile environment and *Paracoccidioides* sp. grow slowly on culture media, contamination frequently appears on plates. However, it is demonstrably possible to re-isolate *Paracoccidioides* spp. from infected *G. mellonella* larvae, mainly by seeding the insect fragments around 4 days after infection, when they are usually still alive, but presenting clear signs of infection (increasing melanization and impaired motility). Curiously, *G. mellonella* passage appears to decrease *P. brasiliensis* conidial production, a virulence indicator associated with the mycelial phase, probably in response to epigenetic regulation. Additional experiments should be carried out to elucidate this aspect.

Referências bibliográficas

- ALMEIDA, A. J., CARMONA, J. A., CUNHA, C., CARVALHO, A., RAPPLEYE, C. A., GOLDMAN, W. E., HOOYKAAS, P. J., LEÃO, C., LUDOVICO, P., RODRIGUES, F. Towards a molecular genetic system for the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Fungal Genet. Biol.**, v.44, p.1387-98, 2007.
- BAILÃO, E. F. L. C., PARENTE, J. A., PIGOSSO, L. L., CASTRO, K. P., FONSECA, F. L., SILVA-BAILÃO, M. G., BÁO, S. N., BAILÃO, A. M., RODRIGUES, M. L., HERNANDEZ, O., McEWEN, J. G., SOARES, C. M. A. Hemoglobin Uptake by *Paracoccidioides* spp. Is Receptor-Mediated. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v.8(5), 2014.
- BAGAGLI, E., SANO, A., COELHO, K. I. R., ALQUATI, S., MIYAJI, M., CAMARGO, Z. P., GOMES, G., FRANCO, M., MONTENEGRO, M. R. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in na endemic área of paracoccidioidomycosis. **Am. J. Trop. Med. & Hyg.** v.58, p.505-12, 1998.
- BAGAGLI, E., FRANCO, M., BOSCO, S. M. G., HEBELER-BARBOSA, F., TRINCA, L. A., MONTENEGRO, M. R. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillo (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. **Med. Mycol.** v.41, p. 217-23, 2003.
- BATISTA Jr, J., CAMARGO, Z. P., FERNANDES, G. F., VICENTINI, A. P., FONTES, C. J. F., HAHN, R. C. Is the geographical origin of a *Paracoccidioides brasiliensis* isolate important for antigen production for regional diagnosis of paracoccidioidomycosis? **Mycoses**, v.53(2), p.176-80, 2010.
- BAUTISTA, L. F., ALEKSENKO, A., HENTZER, M., SANTERRE-HENRIKSEN, A., NIELSEN, J. Antisense Silencing of the creA Gene in *Aspergillus nidulans*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.66(10), p.4579–81, 2000.
- BELITARDO, D. R., CALEFI, A. S., BORGES, I. K., OLIVEIRA G. G., SBEGHEN, M. R., ITANO, E. N., CAMARGO, Z. P., ONO, M. A. Detection of antibodies against *Paracoccidioides brasiliensis* in free-range domestic pigs (*Sus scrofa*). **Mycopathologia**, v.177(1-2), p.91-5, 2014a.
- BELITARDO, D. R., CALEFI, A. S., SBEGHEN, M. R., OLIVEIRA G. G., Maria WATANABE, A. E., CAMARGO, Z. P., ONO, M. A. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). **Mycoses**, v.57(4), p.222–7, 2014b.
- BLOTTA, M. H. S. L., CAMARGO, Z. P. Immunological response to cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*: relationship with clinical forms of paracoccidioidomycosis. **J. Clin. Microbiol.** v.31, p.671-6, 1993.
- BRENNAN, M., THOMAS, D. Y., WHITEWAY, M., KAVANAGH, K. Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** v.34, p.153–7, 2002.
- CAMARGO, Z. P., UNTERKIRCHER, C., CAMPOY, S. P., TRAVASSOS L. R. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion tests. **J. Clin. Microbiol.**, v.26(10), p.2147-51, 1988.
- CARRERO, L. L., NIÑO-VEGA, G., TEIXEIRA, M. M., CARVALHO, M. J. A., SOARES, C. M. A., PEREIRA, M., JESUÍNO, R. S. A., McEWEEN, J. G., MENDOZA, L., TAYLOR, J. W., FELIPE, M. S., SAN-BLAS, G. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. **Fungal Genet. Biol.**, v.45(5), p.605-12, 2008.
- CARVALHO, K. C., GANIKO, L., BATISTA, W. L., MORAIS, F. V., MARQUES, E. R., GOLDMAN, G. H., FRANCO, M. F. e PUCCIA, R. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* and gp43 expression in isolates bearing known PbGP43 genotype, **Microb. Infect.**,v. 7, p.55–65, 2005.
- CASTILHO, D. G., CHAVES, A. F., XANDER, P., ZELANIS, A., KITANO, E. S., SERRANO, S. M., TASHIMA, A. K., BATISTA, W. L. Exploring potential virulence regulators in *Paracoccidioides brasiliensis* isolates of varying virulence through quantitative proteomics. **J. Proteome Res.**, v.13(10), p.4259-71, 2014.

CISALPINO, P. S., PUCCIA, R., YAMAUCHI, L. M., CANO, M. I., DA SILVEIRA, J. F., TRAVASSOS, L. R. Cloning, characterization, and epitope expression of the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Biol. Chem.**, v.271(8), p.4553-60, 1996.

CORREDOR, G. G., CASTAÑO, J. H., PERALTA, L. A., DÍEZ, S., ARANGO, M., McEWEN, J., RESTREPO, A. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasypus novemcinctus*, in an endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. **Rev. Iberoam. Micol.** v.16, p.216-20, 1999.

CORTE, A. C., SVOBODA, W. K., NAVARRO, I. T., FREIRE, R. L., MALANSKI, L. S., SHIOZAWA, M. M., LUDWIG, G., AGUIAR, L. M., PASSOS, F. C., MARON, A., CAMARGO, Z. P., ITANO, E. N., ONO, M. A. Paracoccidioidomycosis in wild monkeys from Paraná State, Brazil. **Mycopathologia**, v.164(5), p.225-8, 2007.

CORTE, A. C., ITANO, E. N., FREIRE, R. L., CAMARGO, Z. P., ONO, M. A. Detection of antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis* in horses from northern Region of Paraná State. **Semina: Ciências Agrárias**, v.30(2), p.441-6, 2009.

COSTA, E. O., DINIZ, L. S. M., FAVA-NETO, C., ARRUDA, C., DAGLI, M. L. Z. "Paracoccidioidomycosis-infection" survey in brazilian captive primates (*Cebus apella*). **Braz. J. vet. Res. Anim. Sci.**, v.29(1), p.39-44, 1992.

DE BACKER, M. D., NELISSEN, B., LOGGHE, M., VIAENE, J., LOONEN, I., VANDONINCK, S., DE HOOGT, R., DEWAELE, S., SIMONS, F. A., VERHASSELT, P., VANHOOF, G., CONTRERAS, R., LUYTEN, W. H. An antisense-based functional genomics approach for identification of genes critical for growth of *Candida albicans*. **Nat. Biotechnol.**, v.19(3), p.235-41, 2001.

DUNPHY, G. B., OBERHOLZER, U., WHITEWAY, M., ZAKARIAN, R. J., BOOMER, I. Virulence of *Candida albicans* mutants toward larval *Galleria mellonella* (Insecta, Lepidoptera, Galleridae). **Can. J. Microbiol.**, v. 49, p.514-24, 2003.

EDWARDS, J. A., ALORE, E. A., RAPPLEYE, C. A. The Yeast-Phase Virulence Requirement for α -Glucan Synthase Differs among *Histoplasma capsulatum* Chemotypes. **Eukaryotic Cell**, v. 10(1), p.87-97, 2011.

FARIAS, M. R., WERNER, J., MURO, M. D., MARQUES, S. A., MARQUES, M. E. A., FRANCO, M. F., RIBEIRO, M. G., CUSTÓDIO, C. C., CONDAS, L. A. Z., BOSCO, S. M. G., BAGAGLI, E. Canine paracoccidioidomycosis: case report of generalizad lymphadenitis. **Rev. Inst. Med. Trop.** v.47(14), p.64, 2005.

FORTES, M. R. P., MIOT, A. H., KUOKAWA, C. S., MARQUES, M. E. A., MARQUES, S. A. Imunologia da paracoccidioidomycose. **An. Bras. Dermatol.**, v.86(3), p.516-24, 2011.

FRANCO, F., LACAZ, C. S., RESTREPO-MORENO, A., DEL NEGRO, G. **Paracoccidioidomycosis**. Estados Unidos da América, CRC Press, Inc., 1994.

GESZTESI, J. L., PUCCIA, R., TRAVASSOS, L. R., VICENTINI, A. P., MORAES, J. Z., FRANCO, M. F., LOPES, J. D. Monoclonal antibodies against the 43,000 Da glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis* modulate laminin-mediated fungal adhesion to epithelial cells and pathogenesis. **Hybridoma**, v.15, p.415-22, 1996.

GORLACH, J. M., McDADE, H. C., PERFECT, J. R., COX, G. M. Antisense repression in *Cryptococcus neoformans* as a laboratory tool and potential antifungal strategy. **Microbiology**, v.148(1), p.213-9, 2002.

HERNÁNDEZ, O., ALMEIDA, A. J., GONZALEZ, A., GARCIA, A. M., TAMAYO, D., CANO, L. E., RESTREPO, A., McEWEN, J. G. A 32-kilodalton hydrolase plays an important role in *Paracoccidioides brasiliensis* adherence to host cells and influences pathogenicity. **Infect. Immun.**, v.78, p.5280-6, 2010.

HELLENS, R.P., MULLINEAUX, P., KLEE, H. A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. **Trends Plant Sci.**, v.5(10), p.446-51, 2000.

JACKSON, J. C., HIGGINS, L. A., LIN, X. Conidiation Color Mutants of *Aspergillus fumigatus* Are Highly Pathogenic to the Heterologous Insect Host *Galleria mellonella*. **PLoS ONE** v.4(1), 2009.

- KAVANAGH, K., REEVES, E. P. Exploiting the potential of insects for *in vivo* pathogenicity testing of microbial pathogens. **FEMS Microbiol. Rev.**, v.28, p.101-12, 2004.
- KAVANAGH, K., REEVES, E. P. Insect and Mammalian Innate Immune Responses Are Much Alike. **Microbe** v.2(12), 2007.
- KUROKAWA, C. S., LOPES, C. R., SUGIZAKI, M. F., KURAMAE, E. E., FRANCO, M. F., PERAÇOLI, M. T. Virulence profile of ten *Paracoccidioides brasiliensis* isolates: association with morphologic and genetic patterns. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v.47, p.257-62, 2005.
- KWON-CHUNG, K. J. Studies on *Emmonsia capsulate*: Heterothalmsm and development of the ascocarp. **Mycologia**, v.65, p.109-21, 1973.
- LACAZ, C. S., PORTO, E., MARTINS, J. E. C., HEINS-VACCARI, E. M., MELO, N. T. **Tratado de Micologia Médica Lacaz**, São Paulo, Ed. Sarvier, 9 ed., 2002.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-5, 1970.
- LEAL, C. V., MONTES, B. A., MESA, A. C., RUA, A. L., CORREDOR, M., RESTREPO, A., McEWEN, J. G. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med. Mycol.**, v.42, 391-5, 2004.
- LEITÃO Jr., N. P., VALLEJO, M. C., CONCEIÇÃO, P. M., CAMARGO, Z. P., HAHN, R., PUCCIA, R. *Paracoccidioides lutzii* PIP43 is an active glucanase with partial antigenic identity with *P. brasiliensis* gp43. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v.8(8), 2014.
- LIU, M., GELLI, A. Elongation factor 3, EF3, associates with the calcium channel Cch1 and targets Cch1 to the plasma membrane in *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryot. Cell**, v.7(7), p.1118-26, 2008.
- LONDON, R., OROZCO, B. S., MYLONAKIS, E. The pursuit of cryptococcal pathogenesis: heterologous hosts and the study of cryptococcal host-pathogen interactions. **FEMS Yeast Res.**v.6, p.567-73, 2006.
- MA, C., SIMONS, R. W. The IS10 antisense RNA blocks ribosome binding at the transposase translation initiation site. **EMBO J.**, v.9(4), p.1267-74, 1990.
- MACHADO, G. C., MORIS, D. V., ARANTES, T. D., SILVA, L. R. F., THEODORO, R. C., MENDES, R. P., VICENTINI, A. P., BAGAGLI, E. Cryptic species of *Paracoccidioides brasiliensis*: impact on paracoccidioidomycosis immunodiagnosis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.108(5), p.637-43, 2013.
- MACORIS, S. A. G., SUGIZAKI, M. F., PERAÇOLI, M. T. S., BOSCO, S. M. G., HEBELER-BARBOSA F., SIMÕES, L. B., THEODORO, R. C., TRINCA, L. A., BAGAGLI, E. Virulence attenuation and phenotypic variation of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates obtained from armadillos and patients. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.101(3), p.331-4, 2006.
- MATUTE, D. R., McEWEEN, J. G., MONTES, B. A., SAN-BLAS, G., BAGAGLI, E., RAUSCHER, J. T., RESTREPO, A., MORAIS, F., NINO-VEJA, G., TAYLOR, J. W. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Mol. Biol. Evol.**, v.23, p.65-73, 2006.
- MATUTE, D. R., QUESADA-OCAMPO, L. M., RAUSCHER, J. T., McEWEN, J. G. Evidence for positive selection in putative virulence factors within the *Paracoccidioides brasiliensis* species complex. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v.2(9), 2008.
- McCULLOUGH, M. J., DiSALVO, A. S., CLEMONS, K. V., PARK, P., STEVENS, D. A. Molecular Epidemiology of *Blastomyces dermatitidis*. **Clin. Infect. Dis.**, v.30(2), p.328-335, 2000.

- McEWEN, J.G., BEDOYA,V., PATINO, M.M., SALAZAR, M.E., RESTREPO, A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.25, p.165-75, 1987.
- MENDES-GIANNINI, M. J. S., BUENO, J. P., SHIKANAI-YASUDA, M. A., STOLF, A. M., MASUDA, A., AMATO NETO, V., FERREIRA, A. W. Antibody response to 43KDa glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* as a marker for the evaluation of patients under treatment. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.43, n.2, p.200-6, 1990a.
- MENDES-GIANNINI, M. J., ANDREOTTI, P. F., VINCENZI, L. R., DA SILVA, J. L., LENZI, H. L., BENARD, G., ZANCOPE-OLIVEIRA, R., MATOS GUEDES, H. L., SOARES, C. P. Binding of extracellular matrix proteins to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes Infect.**, v.8, p.1550–9, 2006.
- MENINO, J. F., ALMEIDA, A. J., RODRIGUES, F. Gene Knockdown in *Paracoccidioides brasiliensis* Using Antisense RNA. **Host-Fungus Interactions: Methods in Molecular Biology**, v.845, p.187-98, 2012.
- MENINO, J. F., SARAIVA, M., GOMES-REZENDE, J., STURME, M., PEDROSA, J., CASTRO, A. G., LUDOVICO, P., GOLDMAN, G. H., RODRIGUES, F. *P. brasiliensis* Virulence Is Affected by SconC, the Negative Regulator of Inorganic Sulfur Assimilation. **PLoS ONE**, v.8(9), 2013.
- MISHIELSE, C. B., HOOYKAAS, P.J., VAN DEN HONDEL, C. A., RAM, A. F. Agrobacterium-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. **Curr. Genet.**v.48, p.1-17, 2005.
- MORAIS, F.V., BARROA, T.F., FUKADA, M.K., CISALPINO, P.S., PUCCIA, R. Polymorphism in the Gene Coding for the Immunodominant Antigen gp43 from the Pathogenic Fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Clin. Microbiol.**, v.38, p.3960-6, 2000.
- MOURA-CAMPOS, M. C. R., GESZTESI, J. L., VINCENTINI, A. P., LOPES, J. D., CAMARGO, Z. P. Expression and isoforms of gp43 in different strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.33, p.223-7, 1995.
- MYLONAKIS, E., MORENO, R., EL KHOURY, J. B., IDNURM, A., HEITMAN, J., CALDERWOOD, S. B., AUSUBEL, F. M., DIENER, A. *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. **Infect. Immun.**v.73, p.3842–50, 2005.
- NAIFF, R. D., FERREIRA, L. C. P., BARRTE, T. V., NAIFF, M. F., ARIAS, J. R. Paracoccidioidomycose enzoótica em tatus (*Dasybus novemcinctus*) no Estado do Pará. **Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo**. v.28, p.19-27, 1986.
- OLIVEIRA, G. G., BELITARDO, D. R., BALARIN, M. R. S., FREIRE, R. L., CAMARGO, Z. P., ONO, M. A. Serological Survey of Paracoccidioidomycosis in Cats. **Mycopathologia**, v.176(3-4), p.299-302, 2013.
- ONO, M. A., BRACARENSE, A. P., MORAIS, H. S., TRAPP, S. M., BELITARDO, D. R., CAMARGO, Z. P. Canine paracoccidioidomycosis: a seroepidemiologic study. **Med. Mycol.**, v.39(3), p.277-82, 2001.
- PALMEIRO, M., CHERUBINI, K., YURGEL, L. S., Paracoccidioidomycose – revisão de literatura. **Scientia Medica**, v.15(4), p.274-8, 2005.
- PUCCIA, R., SCHENKMAN, S., GORIN, P. A. J., TRAVASSOS, L. R., Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*. Identification of a specific antigen. **Infect. Immun.**, v.53, p.199–206, 1986.
- PUCCIA, R., McEWEN, J. G., CISALPINO, P. S. Diversity in *Paracoccidioides brasiliensis*. The PbGP43 gene as a geneticmarker. **Mycopathologia**, v.165(4-5), p.275-87, 2008.
- REEVES, E. P., MESSINA, C. G., DOYLE, S., KAVANAGH, K. Correlation between gliotoxin production and virulence of *Aspergillus fumigatus* in *Galleria mellonella*. **Mycopathologia** v.158, p.73–9, 2004.
- RICCI, G., MOTA, F. T., WAKAMATSU, A., SERAFIM, R. C., BORRA, R. C., FRANCO, M. Canine paracoccidioidomycosis. **Med. Mycol.** v.42, p.379-83, 2004.

RICHINI-PEREIRA, V. B., BOSCO, S. M. G., GRIESE, J., THEODORO, R. C., MACORIS, S. A. G., SILVA, R. J., BARROZO, L., TAVARES, P. M. S., ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M., BAGAGLI, E. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed wild animals. **Med. Mycol.**, v.46(1), p.35-40, 2008.

SALGADO-SALAZAR, C., JONES, L. R., RESTREPO, A., McEWEN, J. G. The human fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* (Onygenales: Ajellomycetaceae) is a complex of two species: phylogenetic evidence from five mitochondrial markers. **Cladistics**, v.26, p.1-12, 2010.

TEIXEIRA, M. M., THEODORO, R. C., CARVALHO, M. J. A., FERNANDES, L., PAES, H. C., HAHN, R. C., MENDOZA, L., BAGAGLI, E., SAN-BLAS, G., FELIPE, M. S. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Mol. Phylog. Evol.**, v.52(2), 273-83, 2009.

TEIXEIRA, M. M., THEODORO, R. C., OLIVEIRA, F. F. M., MACHADO, G. C., HAHN, R. C., BAGAGLI, E., SAN-BLAS, G., FELIPE, M. S. *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications. **Med. Mycol.**, v.52(1), p.19-28, 2014.

THEODORO, R. C., BAGAGLI, E., OLIVEIRA, C. Phylogenetic analysis of PRP8 intein in *Paracoccidioides brasiliensis* species complex. **Fungal Genet. Biol.**, v.45(9), p.1284-91, 2008.

THEODORO, R. C., TEIXEIRA, M. M., FELIPE, M. S. S., PADUAN, K. S., RIBOLLA, P. M., SAN-BLAS, G., BAGAGLI, E. Genus *Paracoccidioides*: Species Recognition and Biogeographic Aspects. **PLoS ONE**, v.7(5), 2012.

THOMAZ, L., GARCÍA-RODAS, R., GUIMARÃES, A. J., TABORDA, C. P., ZARAGOZA, O., NOSANCHUK, J. D. *Galleria mellonella* as a model host to study *Paracoccidioides lutzii* and *Histoplasma capsulatum*. **Virulence**, v.4(2), 2013.

TORRES, I., HERNANDEZ, O., TAMAYO, D., MUÑOZ, J. F., LEITÃO Jr., N. P., GARCÍA, A. M., RESTREPO, A., PUCCIA, R., McEWEN, J. G. Inhibition of *PbGP43* Expression May Suggest that *gp43* is a Virulence Factor in *Paracoccidioides brasiliensis*. **PLoS ONE**, v.8(7), 2013.

TREJO-CHÁVES, A., RAMÍREZ-ROMERO, R., ANCER-RODRÍGUEZ, J., NEVÁREZ-GARZA, A. M., RODRÍGUEZ-TOVAR, L. E. Disseminated *Paracoccidioidomycosis* in a Southern Two-Toed Sloth (*Choloepus didactylus*). **J. Comp. Pathol.**, v.144, p.231-4, 2011.

VICENTINI, A.P., GESZTESI, J., GESZTESI, J.L., FRANCO, M.F. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein *gp43* leads to enhancement of fungal pathogenesis. **Infect. Immun.**, v.62, p.1465-9, 1994.

WEISS, B., DAVIDKOVA, G., ZHOU, L. W. Antisense RNA gene therapy for studying and modulating biological processes. *Cell. Mol. Life Sci.*, v. 55(3), p.334-58, 1999.

WERNER, A. e SAYER, J. A. Naturally occurring antisense RNA: function and mechanisms of action. **Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.**, v.18(4), p.343-9, 2009.

Conclusões

- *Galleria mellonella* é um modelo de experimentação alternativo adequado para avaliação de virulência em *Paracoccidioides* spp. uma vez que responde bem ao efeito tanto de concentração de inóculo como de isolado utilizado.

- Os níveis de virulência em larvas de *G. mellonella* entre isolados de *P. brasiliensis* mostraram-se mais homogêneos e intermediários do que entre os isolados de *P. lutzii*.

- O nível de virulência em *Paracoccidioides* spp. é uma característica individual de cada isolado e de seu momento biológico.

- *P. brasiliensis* pode ser reisolado após infecção em *G. mellonella*, o que pode ser empregado em estudos de mudanças epigenéticas associadas à infecção.

- O emprego de ATMT possibilitou obter transformantes *P. brasiliensis* e *P. lutzii* silenciados para os genes *PbGP43* e *PIP43* com diminuição da expressão do mRNA e das proteínas gp43 e p43.

- A proteína p43 possui importância no processo de virulência de *P. lutzii*, bem como demonstrado anteriormente para a gp43 em *P. brasiliensis*.

Referências bibliográficas

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell**, 5 ed. New York: Garland science, Taylor & Francis Group, 2008.

ALMEIDA, A. J., CARMONA, J. A., CUNHA, C., CARVALHO, A., RAPPLEYE, C. A., GOLDMAN, W. E., HOOYKAAS, P. J., LEÃO, C., LUDOVICO, P., RODRIGUES, F. Towards a molecular genetic system for the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Fungal Genet. Biol.**, v.44, p.1387-98, 2007.

ALMEIDA, F. Estudos comparativos do granuloma coccidióidico nos Estados Unidos e no Brasil. Novo gênero para o parasito brasileiro. **An. Fac. Med. São Paulo**, v.5, p.125-41, 1930.

ARANTES, T. D., THEODORO, R. C., MACORIS, S. A. G., BAGAGLI, E. Detection of *Paracoccidioides* spp. in environmental aerosol samples. **Med. Mycol.**, v.51(1), p.83-92, 2013.

BAILÃO, E. F. L. C., PARENTE, J. A., PIGOSSO, L. L., CASTRO, K. P., FONSECA, F. L., SILVA-BAILÃO, M. G., BÁO, S. N., BAILÃO, A. M., RODRIGUES, M. L., HERNANDEZ, O., McEWEN, J. G., SOARES, C. M. A. Hemoglobin Uptake by *Paracoccidioides* spp. Is Receptor-Mediated. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v.8(5), 2014.

BAGAGLI, E., SANO, A., COELHO, K. I. R., ALQUATI, S., MIYAJI, M., CAMARGO, Z. P., GOMES, G., FRANCO, M., MONTENEGRO, M. R. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in na endemic área of paracoccidioidomycosis. **Am. J. Trop. Med. & Hyg.** v.58, p.505-12, 1998.

*ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2000. 22p.

- BAGAGLI, E., FRANCO, M., BOSCO, S. M. G., HEBELER-BARBOSA, F., TRINCA, L. A., MONTENEGRO, M. R. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillo (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. **Med. Mycol.** v.41, p. 217-23, 2003.
- BATISTA Jr, J., CAMARGO, Z. P., FERNANDES, G. F., VICENTINI, A. P., FONTES, C. J. F., HAHN, R. C. Is the geographical origin of a *Paracoccidioides brasiliensis* isolate important for antigen production for regional diagnosis of paracoccidioidomycosis? **Mycoses**, v.53(2), p.176-80, 2010.
- BAUTISTA, L. F., ALEKSENKO, A., HENTZER, M., SANTERRE-HENRIKSEN, A., NIELSEN, J. Antisense Silencing of the creA Gene in *Aspergillus nidulans*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.66(10), p.4579–81, 2000.
- BEGGS, J. D. Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid. **Nature**, v.275, p.104-9, 1978.
- BELITARDO, D. R., CALEFI, A. S., BORGES, I. K., OLIVEIRA G. G., SBEGHEN, M. R., ITANO, E. N., CAMARGO, Z. P., ONO, M. A. Detection of antibodies against *Paracoccidioides brasiliensis* in free-range domestic pigs (*Sus scrofa*). **Mycopathologia**, v.177(1-2), p.91-5, 2014a.
- BELITARDO, D. R., CALEFI, A. S., SBEGHEN, M. R., OLIVEIRA G. G., Maria WATANABE, A. E., CAMARGO, Z. P., ONO, M. A. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). **Mycoses**, v.57(4), p.222–7, 2014b.
- BERGIN, D., REEVES, E. P., RENWICK, J., WIENTJES, F. B., KAVANAGH, K. Superoxide production in *Galleria mellonella* hemocytes: identification of proteins homologous to the NADPH oxidase complex of human neutrophils. **Infect. Immun.**v.73, p.4161–70, 2005.
- BIRD, C. R., RAY, J. A., FLETCHER, J. D., BONIWELL, J. M., BIRD, A. S., TEULIERES, C., BLAIN, I., BRAMLEY, P. M., SCHUCH, W. Using antisense RNA to study gene function: inhibition of carotenoid biosynthesis in transgenic tomatoes. **Nature Biotech.**, v.9, p.635-9, 1991.

BITTENCOURT, J. I. M., OLIVEIRA, R. M., COUTINHO, Z. F. Paracoccidioidomycosis mortality in the State of Paraná, Brazil. **Cad. Saude Publica**, v.21(6), p. 1856-64, 2005.

BLOTTA, M. H. S. L., CAMARGO, Z. P. Immunological response to cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*: relationship with clinical forms of paracoccidioidomycosis. **J. Clin. Microbiol.** v.31, p.671-6, 1993.

BRENNAN, M., THOMAS, D. Y., WHITEWAY, M., KAVANAGH, K. Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** v.34 p.153–7, 2002.

BUNDOCK, P., DEN DULK-RAS, A., BEIJERSBERGEN, A., HOOYKAAS, P. J. Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO J.**, v.14(13), p.3206–14, 1995.

CALCAGNO, A. M., NINO-VEGA, G., SAN-BLAS, F., SAN-BLAS, G. Geographic discrimination of *Paracoccidioides brasiliensis* strains by randomly amplified polymorphic DNA analysis. **J.Clin. Microbiol.**, v.36(6), p.1733-6, 1998.

CANO, M. I. N., CISALPINO, P. S., GALINDO, I., RAMIREZ, J. L., MORTARA, R. A., SILVEIRA, J. F. Eletrophoretic karyotypes and genome sizing of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Clin. Microbiol.**, v.36, p.742-7, 1998.

CARRERO, L. L., NIÑO-VEGA, G., TEIXEIRA, M. M., CARVALHO, M. J. A., SOARES, C. M. A., PEREIRA, M., JESUÍNO, R. S. A., McEWEEEN, J. G., MENDOZA, L., TAYLOR, J. W., FELIPE, M. S., SAN-BLAS, G. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. **Fungal Genet. Biol.**, v.45(5), p.605-12, 2008.

CARVALHO, K. C., GANIKO, L., BATISTA, W. L., MORAIS, F. V., MARQUES, E. R., GOLDMAN, G. H., FRANCO, M. F. e PUCCIA, R. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* and gp43 expression in isolates bearing known PbGP43 genotype, **Microb. Infect.**,v. 7, p.55–65, 2005.

CASE, M. E., SCHWEIZER, M., KUSHNER, S. R., GILES, N. H. Efficient transformation of *Neurospora crassa* by utilizing hybrid plasmid DNA. **PNAS** v.76, p.5259–63, 1979.

CASTILHO, D. G., CHAVES, A. F., XANDER, P., ZELANIS, A., KITANO, E. S., SERRANO, S. M., TASHIMA, A. K., BATISTA, W. L. Exploring potential virulence regulators in *Paracoccidioides brasiliensis* isolates of varying virulence through quantitative proteomics. **J. Proteome Res.**, v.13(10), p.4259-71, 2014.

CORREDOR, G. G., CASTAÑO, J. H., PERALTA, L. A., DÍEZ, S., ARANGO, M., McEWEN, J., RESTREPO, A. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasypus novemcinctus*, in an endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. **Rev. Iberoam. Micol.** v.16, p.216-20, 1999.

CORTE, A. C., SVOBODA, W. K., NAVARRO, I. T., FREIRE, R. L., MALANSKI, L. S., SHIOZAWA, M. M., LUDWIG, G., AGUIAR, L. M., PASSOS, F. C., MARON, A., CAMARGO, Z. P., ITANO, E. N., ONO, M. A. Paracoccidioidomycosis in wild monkeys from Paraná State, Brazil. *Mycopathologia*, v.164(5), p.225-8, 2007.

CORTE, A. C., ITANO, E. N., FREIRE, R. L., CAMARGO, Z. P., ONO, M. A. Detection of antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis* in horses from northern Region of Paraná State. **Semina: Ciências Agrárias**, v.30(2), p.441-6, 2009.

COSTA, E. O., DINIZ, L. S. M., FAVA-NETO, C., ARRUDA, C., DAGLI, M. L. Z. “Paracoccidioidomycosis-infection” survey in brazilian captive primates (*Cebus apella*). **Braz. J. vet. Res. Anim. Sci.**, v.29(1), p.39-44, 1992.

COUTINHO, Z. F., SILVA, D., LAZÉRA, M., PETRI, V., OLIVEIRA, R.M., SABROZA, P.C., WANKE, B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cad. Saúde Pública**, v.18(5), p.1441-5, 2002.

CURTIS, C. D., NARDULLI, A. M. Using RNA interference to study protein function. **Methods Mol. Biol.**, v.505, p.187-204, 2009.

DE BACKER, M. D., NELISSEN, B., LOGGHE, M., VIAENE, J., LOONEN, I., VANDONINCK, S., DE HOOGT, R., DEWAELE, S., SIMONS, F. A., VERHASSELT, P., VANHOOF, G., CONTRERAS, R., LUYTEN, W. H. An antisense-based functional genomics approach for identification of genes critical for growth of *Candida albicans*. **Nat. Biotechnol.**, v.19(3), p.235-41, 2001.

DE GROOT, M. J. A., BUNDOCK, P., HOYKAAS, P. J. J., BEIJERSBERGEN, A. G. M. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. **Nature Biotechnology**, v.16, p.839-42, 1998.

DESJARDINS, C. A., CHAMPION, M. D., HOLDER, J. W., MUSZEWSKA, A., GOLDBERG, J. et al. Comparative Genomic Analysis of Human Fungal Pathogens Causing Paracoccidioidomycosis. **PLoS Genet.**,v.7(10), 2011.

DEN DULK-RAS, A., HOOYKAAS, P. J. Electroporation of *Agrobacterium tumefaciens*. **Methods Mol. Biol.**, v.55, p.63-72, 1995.

DUNPHY, G. B., OBERHOLZER, U., WHITEWAY, M., ZAKARIAN, R. J., BOOMER, I. Virulence of *Candida albicans* mutants toward larval *Galleria mellonella* (Insecta, Lepidoptera, Galleridae). **Can. J. Microbiol.**, v. 49, p.514-24, 2003.

EDWARDS, J. A., ALORE, E. A., RAPPLEYE, C. A. The Yeast-Phase Virulence Requirement for α -Glucan Synthase Differs among *Histoplasma capsulatum* Chemotypes. **Eukaryotic Cell**, v. 10(1), p.87-97, 2011.

FARIAS, M. R., WERNER, J., MURO, M. D., MARQUES, S. A., MARQUES, M. E. A., FRANCO, M. F., RIBEIRO, M. G., CUSTÓDIO, C. C., CONDAS, L. A. Z., BOSCO, S. M. G., BAGAGLI, E. Canine paracoccidioidomycosis: case report of generalizad lymphadenitis. **Rev. Inst. Med. Trop.** v.47(14), p.64, 2005.

FINCHAM, J. R. Transformation in Fungi. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**v.53, p.1148-170, 1989.

FORTES, M. R. P., MIOT, A. H., KUROKAWA, C. S., MARQUES, M. E. A., MARQUES, S. A. Imunologia da paracoccidioidomicose. **An. Bras. Dermatol.**, v.86(3), p.516-24, 2011.

FRANCO, M., MONTENEGRO, M. R. G., MENDES, R. P., MARQUES, S. A., DILLON, N. L., MOTTA, N. G. S. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.20(2) p.129-32, 1987.

FRANCO, M., SANO, A., KERA, K., NISHIMURA, K., TAKEO, K., MIYAJI, M. Chlamydospore formation by *Paracoccidioides brasiliensis* mycelial form. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v.31, p.151-7, 1989.

FRANCO, F., LACAZ, C. S., RESTREPO-MORENO, A., DEL NEGRO, G. **Paracoccidioidomycosis**. Estados Unidos da América, CRC Press, Inc., 1994.

FUCHS, B. B., MYLONAKIS, E. Using non-mammalian hosts to study fungal virulence and host defense. **Curr. Opin. Microbiol.**, v.9, p.346–51, 2006.

GELVIN, S. B. *Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the “Gene-Jockeying” Tool. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v.67(1),p.16-37, 2003.

GESZTESI, J. L., PUCCIA, R., TRAVASSOS, L. R., VICENTINI, A. P., MORAES, J. Z., FRANCO, M. F., LOPES, J. D. Monoclonal antibodies against the 43,000 Da glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis* modulate laminin-mediated fungal adhesion to epithelial cells and pathogenesis. **Hybridoma**, v.15, p.415-22, 1996.

GORLACH, J. M., McDADE, H. C., PERFECT, J. R., COX, G. M. Antisense repression in *Cryptococcus neoformans* as a laboratory tool and potential antifungal strategy. **Microbiology**, v.148(1), p.213-9, 2002.

HAHN, R. C., FONT'S, C. J., BATISTA, R. D., HAMDAN, J. S. In vitro comparison of activities of terbinafine and itraconazole against *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Clin. Microbiol.**, v.40, p.2828-31, 2002.

HAHN, R. C., MORATO CONCEIÇÃO, Y. T., SANTOS, N. L., FERREIRA, J. F., HAMDAN, J. S. Disseminated paracoccidioidomycosis: correlation between clinical and in vitro resistance to ketoconazole and trimethoprim sulphamethoxazole. **Mycoses**, v.46, p.342-47, 2003.

HEBELER-BARBOSA, F., MONTENEGRO, M. R., BAGAGLI, E. Virulence profiles of ten *Paracoccidioides brasiliensis* isolates obtained from armadillos (*Dasypus novemcinctus*). **Med. Mycol.**, v. 41, p.89–96, 2003.

HERNÁNDEZ, O., ALMEIDA, A. J., GONZALEZ, A., GARCIA, A. M., TAMAYO, D., CANO, L. E., RESTREPO, A., McEWEN, J. G. A 32-kilodalton hydrolase plays an important role in *Paracoccidioides brasiliensis* adherence to host cells and influences pathogenicity. **Infect. Immun.**, v.78, p.5280-6, 2010.

HINNEN, A., HICKS, J. B., FINK, G. R. Transformation of yeast. **PNAS**, v.75(4), p.1929-33, 1978.

JACKSON, J. C., HIGGINS, L. A., LIN, X. Conidiation Color Mutants of *Aspergillus fumigatus* Are Highly Pathogenic to the Heterologous Insect Host *Galleria mellonella*. **PLoS ONE** v.4(1), 2009.

KAVANAGH, K., REEVES, E. P. Exploiting the potencial of insects for *in vivo* pathogenicity testing of microbial pathogens. **FEMS Microbiol. Rev.**, v.28, p.101-12, 2004.

KAVANAGH, K., REEVES, E. P. Insect and Mammalian Innate Immune Responses Are Much Alike. **Microbe** v.2(12), 2007.

KUROKAWA, C. S., LOPES, C. R., SUGIZAKI, M. F., KURAMAE, E. E., FRANCO, M. F., PERAÇOLI, M. T. Virulence profile of ten *Paracoccidioides brasiliensis* isolates: association with morphologic and genetic patterns. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v.47, p.257-62, 2005.

KWON-CHUNG, K. J. Studies on *Emmonsia capsulate*: Heterothalism and development of the ascocarp. **Mycologia**, v.65, p.109-21, 1973.

LACAZ, C. S., PORTO, E., MARTINS, J. E. C., HEINS-VACCARI, E. M., MELO, N. T. **Tratado de Micologia Médica Lacaz**, São Paulo, Ed. Sarvier, 9 ed., 2002.

LACORTE, C., MANSUR, E. Transferência de genes através da *Agrobacterium tumefaciens*: avaliação da compatibilidade patógeno-hospedeiro. **ABCTP Notícias**, v.21, p.2-7, 1993.

LEAL, C. V., MONTES, B. A., MESA, A. C., RUA, A. L., CORREDOR, M., RESTREPO, A., McEWEN, J. G. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med. Mycol.**, v.42, 391-5, 2004.

LECLERC, M. C., PHILIPPE, H., GUÉHO, E. Phylogeny of dermatophytes and dimorphic fungi based on large subunit ribosomal RNA sequence comparisons. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.32(5), p.331-41, 1994.

LEITÃO Jr., N. P., VALLEJO, M. C., CONCEIÇÃO, P. M., CAMARGO, Z. P., HAHN, R., PUCCIA, R. *Paracoccidioides lutzii* Plp43 is an active glucanase with partial antigenic identity with *P. brasiliensis* gp43. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v.8(8), 2014.

LIMA, N., MOTA, M. **Biotecnologia: fundamentos e aplicações**. Lisboa: Lidel - edições técnicas, 505 p., 2003.

LIONAKIS, M. S., KONTOYIANNIS, D. P. Fruit flies as a minihost model for studying drug activity and virulence in *Aspergillus*. **Med. Mycol.**v.43(1), p.111-4, 2005.

LIU, M., GELLI, A. Elongation factor 3, EF3, associates with the calcium channel Cch1 and targets Cch1 to the plasma membrane in *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryot. Cell**, v.7(7), p.1118-26, 2008.

LONDON, R., OROZCO, B. S., MYLONAKIS, E. The pursuit of cryptococcal pathogenesis: heterologous hosts and the study of cryptococcal host-pathogen interactions. **FEMS Yeast Res.**v.6, p.567-73, 2006.

LUTZ, A. Uma micose pseudococcídica localizada na boca e observada no Brasil. Contribuição ao conhecimento das hifoblastomicoses americanas. **Bras. Med.**, v.22, p.121-4, 141-4, 1908.

LYLE, R., WATANABE, D., TE VRUCHTE, D., LERCHNER, W., SMRZKA, O. W., WUTZ, A., SCHAGEMAN, J., HAHNER, L., DAVIES, C., BARLOW, D. P. The imprinted antisense RNA at the *Igf2r* locus overlaps but does not imprint *Mas1*. **Nature Genetics**, v.25, p.19-21, 2000.

MA, C., SIMONS, R. W. The IS10 antisense RNA blocks ribosome binding at the transposase translation initiation site. **EMBO J.**, v.9(4), p.1267-74, 1990.

MACHADO, G. C., MORIS, D. V., ARANTES, T. D., SILVA, L. R. F., THEODORO, R. C., MENDES, R. P., VICENTINI, A. P., BAGAGLI, E. Cryptic species of *Paracoccidioides brasiliensis*: impact on paracoccidioidomycosis immunodiagnosis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.108(5), p.637-43, 2013.

MACORIS, S. A. G., SUGIZAKI, M. F., PERAÇOLI, M. T. S., BOSCO, S. M. G., HEBELER-BARBOSA F., SIMÕES, L. B., THEODORO, R. C., TRINCA, L. A., BAGAGLI, E. Virulence attenuation and phenotypic variation of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates obtained from armadillos and patients. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.101(3), p.331-4, 2006.

MATUTE, D. R., McEWEEN, J. G., MONTES, B. A, SAN-BLAS, G., BAGAGLI, E., RAUSCHER, J. T., RESTREPO, A., MORAIS, F., NINO-VEJA, G., TAYLOR, J. W. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Mol. Biol. Evol**, v.23, p.65-73, 2006.

MATUTE, D. R., QUESADA-OCAMPO, L. M., RAUSCHER, J. T., McEWEN, J. G. Evidence for positive selection in putative virulence factors within the *Paracoccidioides brasiliensis* species complex. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v.2(9), 2008.

McEWEN, J.G., BEDOYA,V., PATINO, M.M., SALAZAR, M.E., RESTREPO, A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.25, p.165-75, 1987.

MENDES-GIANNINI, M. J. S., BUENO, J. P., SHIKANAI-YASUDA, M. A., STOLF, A. M., MASUDA, A., AMATO NETO, V., FERREIRA, A. W. Antibody response to 43KDa glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* as a marker for the evaluation of patients under treatment. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.43, n.2, p.200-6, 1990a.

MENDES-GIANINNI, M.J.S., MORAES, R.A., RICCI, T.A. Proteolytic activity of the 43,000 molecular weight antigen secreted by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v.32, p.384-5, 1990b.

MENDES-GIANNINI, M. J., ANDREOTTI, P. F., VINCENZI, L. R., DA SILVA, J. L., LENZI, H. L., BENARD, G., ZANCOPE-OLIVEIRA, R., MATOS GUEDES, H. L., SOARES, C. P. Binding of extracellular matrix proteins to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes Infect.**, v.8, p.1550–9, 2006.

MENINO, J. F., ALMEIDA, A. J., RODRIGUES, F. Gene Knockdown in *Paracoccidioides brasiliensis* Using Antisense RNA. **Host-Fungus Interactions: Methods in Molecular Biology**, v.845, p.187-98, 2012.

MENINO, J. F., SARAIVA, M., GOMES-REZENDE, J., STURME, M., PEDROSA, J., CASTRO, A. G., LUDOVICO, P., GOLDMAN, G. H., RODRIGUES, F. *P. brasiliensis* Virulence Is Affected by SconC, the Negative Regulator of Inorganic Sulfur Assimilation. **PLoS ONE**, v.8(9), 2013.

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

MISHRA, N. C., TATUM, E. L. Non-Mendelian Inheritance of DNA-Induced Inositol Independence in *Neurospora*. **PNAS**, v.70(12), p.3875-9, 1973

MISHRA, N. C., SZABO, G., TATUM, E. L. Nucleic acid induced genetic changes in *Neurospora*. In: **The Role of RNA in Reproduction and Development**. Eds: NIU, M. C., SEGAL, S. J. North-Holland Publ. Co., Amsterdam, p. 259-68, 1973.

MOLINARI-MADLUN, E. E. W. I., FELIPE, M. S. S., SOARES, C. M. A. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates can be correlated to groups defined by random amplified polymorphic DNA analysis. **Med. Mycol.**, v.37, p.269-76, 1999.

MONTOYA, A. E., ALVAREZ, A. L., MORENO, M. N., RESTREPO, A., McEWEN, J.G., Electrophoretic karyotype of environmental isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*, **Med. Mycol.**, v.37, p.219–22, 1999.

MONTOYA, A. E., MORENO, M. N., RESTREPO, A., McEWEN, J. G., Electrophoretic karyotype of clinical isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*, **Fungal Genet.Biol.**, v.21, p.223-7, 1997.

MORAIS, F.V., BARROA, T.F., FUKADA, M.K., CISALPINO, P.S., PUCCIA, R. Polymorphism in the Gene Coding for the Immunodominant Antigen gp43 from the Pathogenic Fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Clin. Microbiol.**, v.38, p.3960-6, 2000.

MOURA-CAMPOS, M. C. R., GESZTESI, J. L., VINCENTINI, A. P., LOPES, J. D., CAMARGO, Z. P. Expression and isoforms of gp43 in different strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.33, p.223-7, 1995.

MYLONAKIS, E., AUSUBEL, F. M., PERFECT, J. R., HEITMAN, J., CALDERWOOD, S. B. Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Cryptococcus neoformans* as a model of yeast pathogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v.99, p.15675–80, 2002.

MYLONAKIS, E., AUSUBEL, F. M., TANG, R. J., CALDERWOOD, S. B. The art of serendipity: killing of *Caenorhabditis elegans* by human pathogens as a model of bacterial and fungal pathogenesis. **Expert Rev. Anti Infect. Ther.** v.1, p.167–73, 2003.

MYLONAKIS, E., ABALLAY, A. Worms and flies as genetically tractable animal models to study host-pathogen interactions. **Infect. Immun.** v.73, p.3833–41, 2005.

MYLONAKIS, E., MORENO, R., EL KHOURY, J. B., IDNURM, A., HEITMAN, J., CALDERWOOD, S. B., AUSUBEL, F. M., DIENER, A. *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. **Infect. Immun.**v.73, p.3842–50, 2005.

MYLONAKIS, E., CASADEVALL, A., AUSUBEL, F. M. Exploiting amoeboid and non-vertebrate animal model systems to study the virulence of human pathogenic fungi. **PLoS Pathog.** v.3(7), e101, 2007.

NAIFF, R. D., FERREIRA, L. C. P., BARRTE, T. V., NAIFF, M. F., ARIAS, J. R. Paracoccidioidomicose enzoótica em tatus (*Dasypus novemcinctus*) no Estado do Pará. **Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo.** v.28, p.19-27, 1986.

NASCIMENTO, T., MARTINEZ, R., LOPES, A.R., BERNARDES, L.A.D., BARCO, C.P., GOLDMAN, M.H.S., TAYLOR, J.W., McEWEEN, J.G., NOBREGA, M.P., NOBREGA, F.G., GOLDMAN, G.H. Detection and selection of microsatellites in the genome of *Paracoccidioides brasiliensis* as molecular markers for clinical and epidemiological studies. **J. Clin. Microbiol.**, v.42, p.5007-14, 2004.

NINO-VEGA, G. A., CALCAGNO, A. M., SAN-BLAS, G., SAN-BLAS, F., GOODAY, G. W., GOW, N. A. RFLP analysis reveals marked geographical isolation between strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med. Mycol.**, v.38, p.437-41, 2000.

OLIVEIRA, G. G., BELITARDO, D. R., BALARIN, M. R. S., FREIRE, R. L., CAMARGO, Z. P., ONO, M. A. Serological Survey of Paracoccidioidomycosis in Cats. **Mycopathologia**, v.176(3-4), p.299-302, 2013.

OLMEDO-MONFIL, V., CORTÉS-PENAGOS, C., HERRERA-ESTRELLA, A. Three Decades of Fungal Transformation: Key Concepts and Applications. In: PAULINA, B., ARGELIA, L. **Recombinant gene expression: reviews and protocols.** New York: Humana Press, p.297-313, 2004.

PALLU, A. P. S. **Potencial biotecnológico de fungos de gênero *Penicillium* e interação com cana-de-açúcar.** Tese de Doutorado, ESALQ-USP, Piracicaba, 2010.

PALMEIRO, M., CHERUBINI, K., YURGEL, L. S. Paracoccidioidomycose – revisão de literatura. **Scientia Medica**, v.15(4), p.274-8, 2005.

PETERSON, S. W., SIGLER, L. Molecular Genetic Variation in *Emmonsia crescens* and *Emmonsia parva*, Etiologic Agents of Adiaspiromycosis, and Their Phylogenetic Relationship to *Blastomyces dermatitidis* (*Ajellomyces dermatitidis*) and Other Systemic Fungal Pathogens. **J. Clin. Microbiol.**, v.36(10), p.2918-25, 1998.

PUCCIA, R., SCHENKMAN, S., GORIN, P. A. J., TRAVASSOS, L. R. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*. Identification of a specific antigen. **Infect. Immun.**, v.53, p.199–206, 1986.

PUCCIA, R., McEWEN, J. G., CISALPINO, P. S. Diversity in *Paracoccidioides brasiliensis*. The PbGP43 gene as a geneticmarker. **Mycopathologia**, v.165(4-5), p.275-87, 2008.

REEVES, E. P., MESSINA, C. G., DOYLE, S., KAVANAGH, K. Correlation between gliotoxin production and virulence of *Aspergillus fumigatus* in *Galleria mellonella*. **Mycopathologia** v.158, p.73–9, 2004.

RESTREPO, A., SALAZAR, M. E., CANO, L. E., STOVER, E. P., FELDMAN, D. & STEVENS, D. A. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. **Infection and Immunity**, v.46, p.346-53, 1984.

RICCI, G., MOTA, F. T., WAKAMATSU, A., SERAFIM, R. C., BORRA, R. C., FRANCO, M. Canine paracoccidioidomycosis. **Med. Mycol.** v.42, p.379-83, 2004.

RICHINI-PEREIRA, V. B., BOSCO, S. M. G., GRIESE, J., THEODORO, R. C., MACORIS, S. A. G., SILVA, R. J., BARROZO, L., TAVARES, P. M. S., ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M., BAGAGLI, E. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed wild animals. **Med. Mycol.**, v.46(1), p.35-40, 2008.

ROGERS, S. G., HORSH, R. B., FRALEY, R. T. Gene transfer in plants: production of transformed plants using Ti plasmid vectors. In: WEISSBACH, A., WEISSBACH, H. **Plant biology**, Academic Press, p.627-40, 1986.

ROMANI, L. The T cell response against fungal infections. **Curr. Opin. Immunol.**, v.9, p.484-90, 1997.

RUIZ-DÍEZ, B. Strategies for the transformation of filamentous fungi, **J. Appl. Microbiol.** v.92(2), p.189-95, 2002.

SALGADO-SALAZAR, C., JONES, L. R., RESTREPO, A., McEWEN, J. G. The human fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* (Onygenales: Ajellomycetaceae) is a complex of two species: phylogenetic evidence from five mitochondrial markers. **Cladistics**, v.26, p.1-12, 2010.

SALINA, M. A., SHIKANAI-YASUDA, M. A., MENDES, R. P., BARRAVIERA, B., MENDES-GIANNINI, M. J. Detection of circulating *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in urine before and during treatment. **J. Clin. Microbiol.** v. 36(6), p.1723-8, 1998.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998.

SANFORD, J. C., KLEIN, T. M., WOLF, E. D., ALLEN, N. Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. **Particulate Science and Technology**, v.5(1), p.27-37, 1987.

SCHUCH, W., KANCZLER, J., ROBERTSON, D., HOBSON, G., TUCKER, G., GRIERSON, D., BRIGHT, S., BIRD, C. Fruit quality characteristics of transgenic tomato fruit with altered polygalacturonase activity. **HortScience**, v.26(12), p.1517-20, 1991.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. Consenso em paracoccidioidomicose. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.39(3), p.297-310, 2006.

SILVEIRA, L. H., PAES, R. C., MEDEIROS, E. V., ITANO, E. N., CAMARGO, Z. P., ONO, M. A. Occurrence of Antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis* in dairy cattle from Mato Grosso do Sul, Brazil. **Mycopathologia**, v.165(6), p.367, 2008.

SOARES, E. E., MADLUN, C. M., SILVA, S. P., PEREIRA M., FELIPE, M. S. Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates by random amplified polymorphic DNA analysis. **J. Clin. Microbiol.**, v.33 p.505-7, 1995.

SPLENDORE, A. Zymonematozi com localizzazione nella cavità della bocca, osservata in Brasile. **Bull. Soc. Pathol. Exot.**, v.5, p.313-9, 1912.

TAKAYAMA, A., ITANO, E. N., SANO, A., ONO, M. A., KAMEI, K. An atypical *Paracoccidioides brasiliensis* clinical isolate based on multiple gene analysis. **Med. Mycol.**, v.48(1), p.64-72, 2010.

TANG, R. J., BREGER, J., IDNURM, A., GERIK, K. J., LODGE, J. K., HEITMAN, J., CALDERWOOD, S. B., MYLONAKIS, E. *Cryptococcus neoformans* gene involved in mammalian pathogenesis identified by a *Caenorhabditis elegans* progeny-based approach. **Infect. Immun.** v.73, p.8219–25, 2005.

TAYLOR, J. W., JACOBSON, D. J., KROKEN, S., KASUGA, T., GEISER, D. M., HIBBETT, D. S., FISHER, M. C. Phylogenetic Species Recognition and Species Concepts in Fungi. **Fungal Genet. Biol.**, v.31(1), p.21-32, 2000.

TEIXEIRA, M. M., THEODORO, R. C., CARVALHO, M. J. A., FERNANDES, L., PAES, H. C., HAHN, R. C., MENDOZA, L., BAGAGLI, E., SAN-BLAS, G., FELIPE, M. S. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Mol. Phylog. Evol.**, v.52(2), 273-83, 2009.

TEIXEIRA, M. M., THEODORO, R. C., OLIVEIRA, F. F. M., MACHADO, G. C., HAHN, R. C., BAGAGLI, E., SAN-BLAS, G., FELIPE, M. S. S. *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications. **Med. Mycol.**, v.52(1), p.19-28, 2014.

THEODORO, R. C., BAGAGLI, E., OLIVEIRA, C. Phylogenetic analysis of PRP8 intein in *Paracoccidioides brasiliensis* species complex. **Fungal Genet. Biol.**, v.45(9), p.1284-91, 2008.

THEODORO, R. C., TEIXEIRA, M. M., FELIPE, M. S. S., PADUAN, K. S., RIBOLLA, P. M., SAN-BLAS, G., BAGAGLI, E. Genus *Paracoccidioides*: Species Recognition and Biogeographic Aspects. **PLoS ONE**, v.7(5), 2012.

THOMAZ, L., GARCÍA-RODAS, R., GUIMARÃES, A. J., TABORDA, C. P., ZARAGOZA, O., NOSANCHUK, J. D. *Galleria mellonella* as a model host to study *Paracoccidioides lutzii* and *Histoplasma capsulatum*. **Virulence**, v.4(2), 2013.

TORRES, I., HERNANDEZ, O., TAMAYO, D., MUÑOZ, J. F., LEITÃO Jr., N. P., GARCÍA, A. M., RESTREPO, A., PUCCIA, R., McEWEN, J. G. Inhibition of PbGP43 Expression May Suggest that gp43 is a Virulence Factor in *Paracoccidioides brasiliensis*. **PLoS ONE**, v.8(7), 2013.

TREJO-CHÁVES, A., RAMÍREZ-ROMERO, R., ANCER-RODRÍGUEZ, J., NEVÁREZ-GARZA, A. M., RODRÍGUEZ-TOVAR, L. E. Disseminated Paracoccidioidomycosis in a Southern Two-Toed Sloth (*Choloepus didactylus*). **J. Comp. Pathol.**, v.144, p.231-4, 2011.

UNTEREINER, W. A., SCOTT, J. A., NAVEAU, F. A., SIGLER, L., BACHEWICH, J., ANGUS, A. The Ajellomycetaceae, a new family of vertebrate-associated Onygenales. **Mycol.**, v. 96(4), p.812-21, 2004.

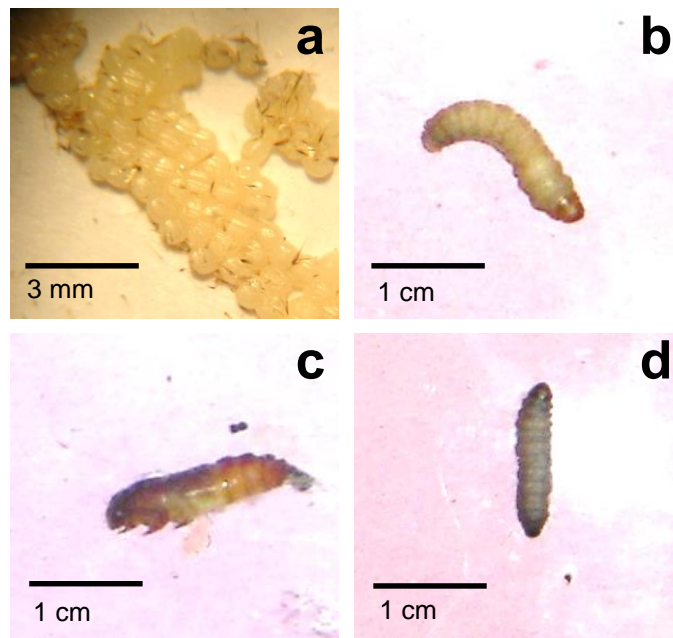
VICENTINI, A.P, GESZTESI, J., GESZTESI, J.L., FRANCO, M.F. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. **Infect. Immun.**, v.62, p.1465-9, 1994.

VIEIRA, G. D., ALVES, T. C., LIMA, S. M. D., CAMARGO, L. M. A., SOUSA, C. M. Paracoccidioidomycosis in a western Brazilian Amazon State: Clinical-epidemiologic profile and spatial distribution of the disease. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v.47(1), p.63-8, 2014.

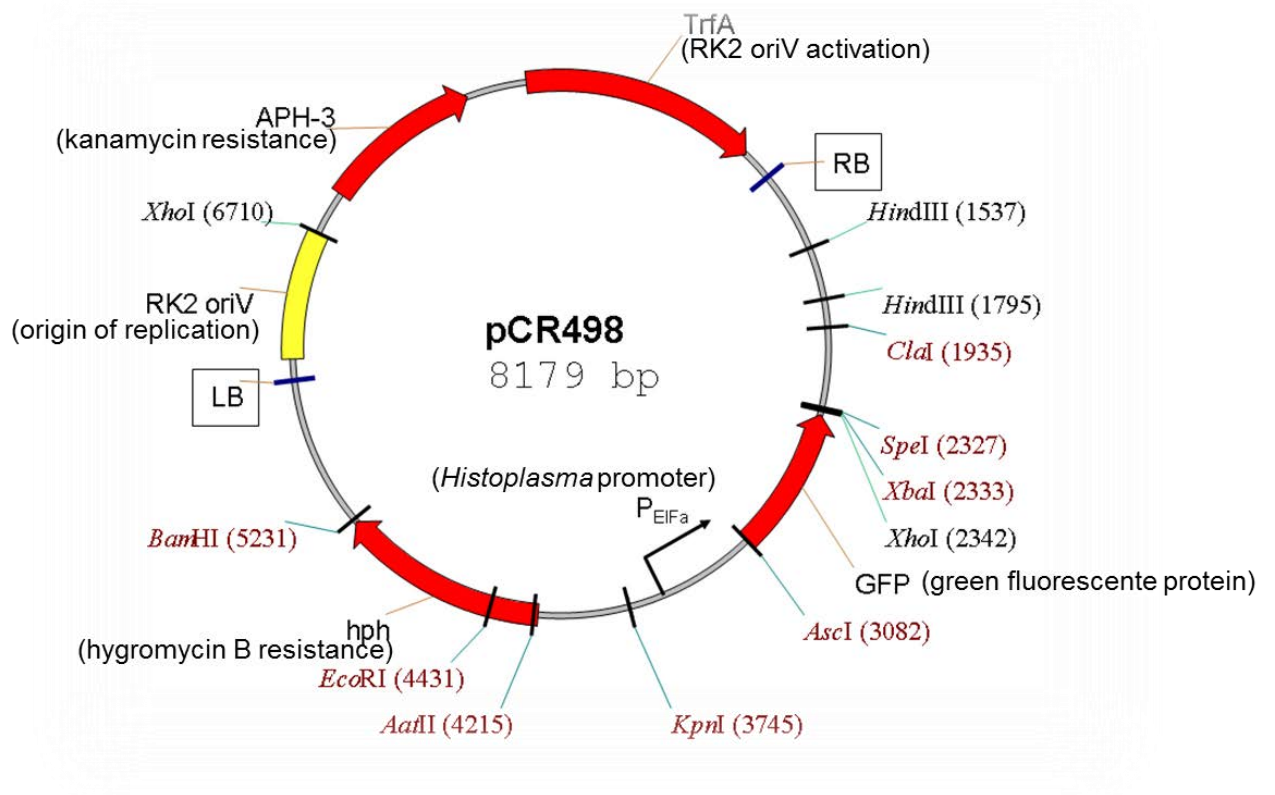
WANKE, B. e LONDERO, A. T. Epidemiology and Paracoccidioidomycosis Infection. In: **Paracoccidioidomycosis**. FRANCO, M. F., LACAZ, C. S., RESTREPO, A., DEL NEGRO, G. (Eds). Boca Raton, London, CRR Press, cap.7, 1994.

WEISS, B., DAVIDKOVA, G., ZHOU, L. W. Antisense RNA gene therapy for studying and modulating biological processes. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 55(3), p.334-58, 1999.

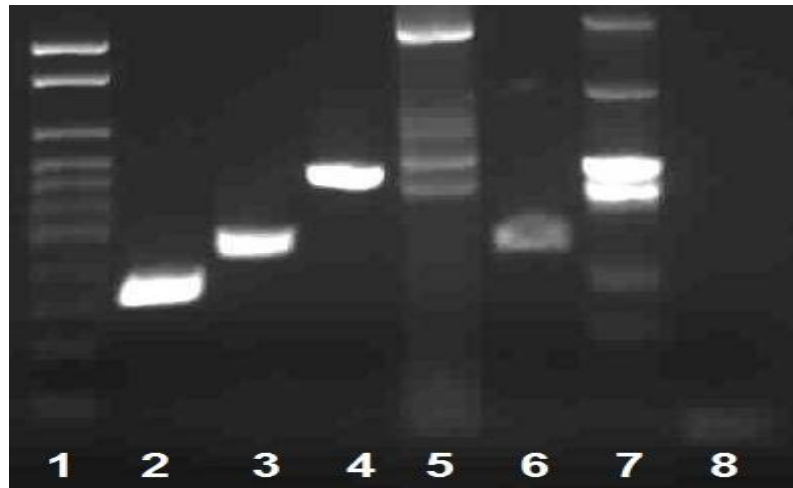
WERNER, A. e SAYER, J. A. Naturally occurring antisense RNA: function and mechanisms of action. **Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.**, v.18(4), p.343-9, 2009.

Material suplementar

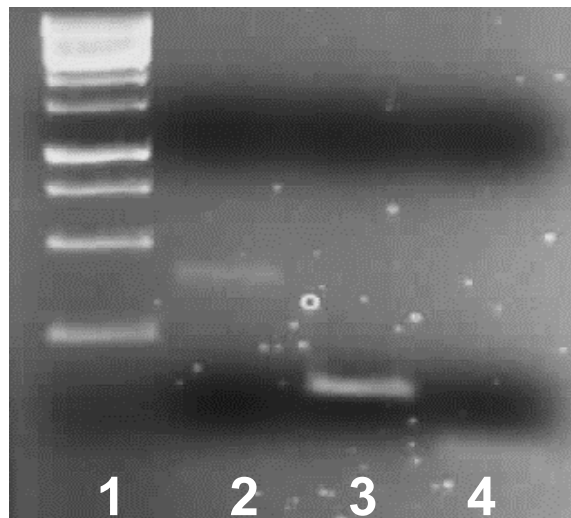
Arquivo suplementar 1. Diferentes estágios da traça grande de cera *Galleria mellonella* obtidas em criação estabelecida no biotério do Departamento de Microbiologia do Instituto de Biociências de Botucatu/UNESP e utilizadas nesse estudo a) ovos; b) larva dos últimos instares; c) pupa, retirada do casulo; d) larva morta melanizada.



Arquivo suplementar 2. Mapa do plasmídeo pCR498, utilizado para inserção das sequências silenciadoras de *PbGP43* e *PIP43*, com suas regiões promotoras, matrizes de leitura e sítios de restrição.



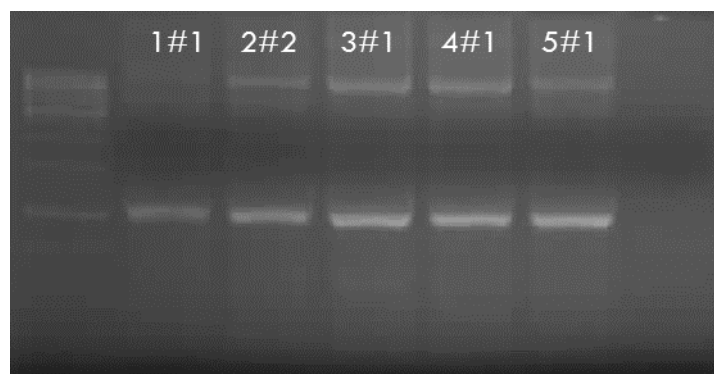
Arquivo suplementar 3. Gel de agarose com produto de PCR para amplificação de diferentes regiões do *PbGP43* e *PIP43*, com *primers* desenhados de acordo com a sequência de *PbGP43*. Após digestão com enzimas de restrição, os fragmentos purificados das linhas 2, 3 e 4 foram inseridos no plasmídeo pCR498. Linha 1 – marcador molecular 100bp; linha 2 – DNA de Pb339 (*P. brasiliensis*), *primers* agp1F e agp1R; linha 3 – DNA de Pb339, *primers* agp2F e agp2R; linha 4 – DNA de Pb339, *primers* agp3F e agp3R; linha 5 – DNA de Pb8334 (*P. lutzii*), *primers* agp1F e agp1R; linha 6 – DNA de Pb8334, *primers* agp2F e agp2R; linha 7 – DNA de Pb66, *primers* agp3F e agp3R; linha 8 – controle negativo da reação.



Arquivo suplementar 4. Gel de agarose com produto de PCR para amplificação de diferentes regiões do *PIP43* de 8334, com *primers* desenhados de acordo com a sequência de *PIP43*. Após digestão com enzimas de restrição, os fragmentos purificados das linhas 2 e 3 foram inseridos no plasmídeo pCR498. Linha 1 – marcador molecular 100bp; linha 2 – DNA *primers* agp4F e agp4R; linha 3 – *primers* agp5F e agp5R; linha 4 – controle negativo da reação.



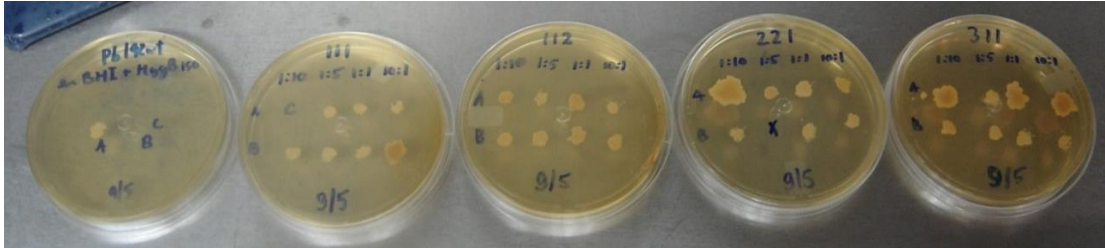
Arquivo suplementar 5. Gel de agarose com produtos de PCR (confirmatório) para amplificação de diferentes regiões do PbGP43 inseridas no plasmídeo pCR498, clonado em *E. coli*. Marcador molecular de 1kb. Amostra 1#1 – *primers* agp1F e agp1R (296pb); amostras 2#1, 2#2 e 2#3 – *primers* agp2F e agp2R (402pb); amostra 3#1 – *primers* agp3F e agp3R (683pb); amostras 4#1 e 4#2 – *primers* agp4F e agp4R (386pb); amostras 5#1, 5#2 e 5#3 – *primers* agp5F e agp5R (128pb).



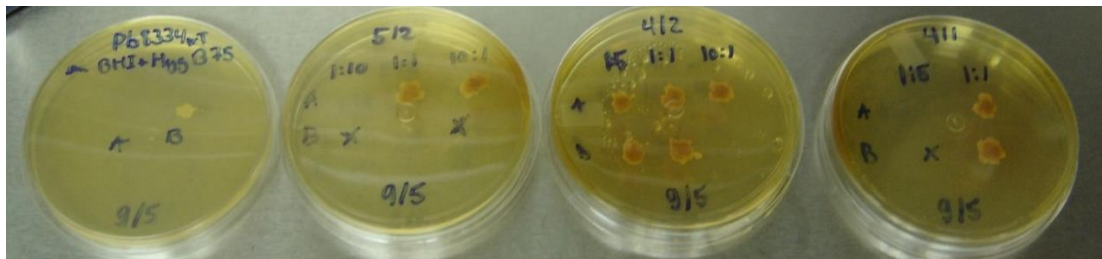
Arquivo suplementar 6. Gel de agarose com produtos de PCR (confirmatório) de diferentes amostras com os *primers* hphF e hphR para amplificação de porção de 990pb do gene hph, presente no plasmídeo pCR498, clonado em *E. coli*. Marcador molecular de 1kb.



Arquivo suplementar 7. Gel de agarose com produtos de PCR (confirmatório) para amplificação de diferentes regiões do *PbGP43* inseridas no plasmídeo pCR498, após transformação de *A. tumefaciens*. Marcador molecular de 1kb. Amostra C+, controle positivo – pCR498 clonado em *E. coli*, *primers* agp1F e agp1R (296pb); amostras 1#1#1 e 1#1#2 – *primers* agp1F e agp1R (296pb); amostras 2#2#1 e 2#2#2 – *primers* agp2F e agp2R (402pb); amostras 3#1#1 e 3#1#2 – *primers* agp3F e agp3R (683bp); amostras 4#1#1 e 4#1#2 – *primers* agp4F e agp4R (386pb); amostras 5#1#1 e 5#1#2 – *primers* agp5F e agp5R (128pb).



Arquivo suplementar 8. Transformantes de *P. brasiliensis*, obtidos após ATMT, recultivados em meio BHI ágar com 75mg/mL de higromicina B. O isolado selvagem Pb192 está cultivado na primeira placa da esquerda para a direita, não apresentando crescimento. Apenas 1 isolado na segunda placa, 1 na quarta e 3 na quinta placa confirmaram-se Hyg^R (espalhamento da colônia e verso enegrecido) na concentração de higromicina B supracitada.



Arquivo suplementar 9. Transformantes de *P. lutzii* obtidos após ATMT, recultivados em meio BHI ágar com 75mg/mL de higromicina B. O isolado selvagem 8334 está cultivado na primeira placa da esquerda para a direita, não apresentando crescimento. Todos os 9 transformantes confirmaram-se Hyg^R (espalhamento da colônia e verso enegrecido) na concentração de higromicina B supracitada.

Arquivo suplementar 10. Valores de Ct (Threshold de 0,3) obtidos em duplicata em RT-qPCR com o emprego de *primers* para amplificação de *PbGP43* e TUB (gene normalizador) nas amostras de cDNA de *Paracoccidioides brasiliensis* transformantes. O valor de $2^{(\text{delta delta Ct})}$ de cada amostra corresponde ao nível de expressão de *PbGP43* comparado ao isolado selvagem Pb192.

Amostras	Ct <i>PbGP43</i>		Ct TUB2		Ct <i>qgp</i>	Ct TUB2	delta Ct	delta delta Ct	2 [^] (delta delta Ct)
	1a dupl.	2a dupl.	1a dupl.	2a dupl.					
Pb192	22,32	22,2	17,91	18,01	22,26	17,96	-4,3	0	100%
111B4	25,2	25,72	18,2	18,52	25,46	18,36	-7,1	-2,8	14%
221A1	35,71	-	22,42	23,61	-	23,015	-	-	-
311A1	27,92	29,14	20,6	20,56	28,53	20,58	-7,95	-3,65	8%
311A4	25,34	24,97	19,4	19,35	25,155	19,375	-5,78	-1,48	36%

Arquivo suplementar 11. Valores de Ct (Threshold de 1,0) obtidos em duplicata em RT-qPCR com o emprego de *primers* para amplificação de *PIP43* e TUB (gene normalizador) nas amostras de cDNA de *Paracoccidioides lutzii* transformantes. O valor de $2^{(\text{delta delta Ct})}$ de cada amostra corresponde ao nível de expressão de *PbGP43*, quando comparado com o isolado selvagem 8334.

Amostras	Ct <i>PIP43</i>		Ct TUB2		Ct <i>qgp</i>	Ct TUB2	delta Ct	delta delta Ct	2 [^] (delta delta Ct)
	1a dupl.	2a dupl.	1a dupl.	2a dupl.					
8334	23,57	24,32	18,51	18,89	23,945	18,7	-5,245	0	100%
411A2	26,99	26,65	21,82	21,97	26,82	21,895	-4,925	0,32	125%
411B1	27,01	26,96	21,22	21,42	26,985	21,32	-5,665	-0,42	75%
412A2	23,9	24,53	19,28	20,35	24,215	19,815	-4,4	0,845	180%
412A3	21,42	21,12	17,14	17,59	21,27	17,365	-3,905	1,34	253%
412B1	22,3	22,98	17,65	17,44	22,64	17,545	-5,095	0,15	111%
412B2	27,97	28,81	21,21	20,83	28,39	21,02	-7,37	-2,125	23%
512A2	24,81	25,31	19,88	19,5	25,06	19,69	-5,37	-0,125	92%