

Universidade de Ribeirão Preto

UNAERP

Doutorado em Biotecnologia

TAMIRES APARECIDA BITENCOURT

**Perfil transcricional do dermatófito *Trichophyton rubrum*
exposto ao antifúngico *trans*-chalcona durante seu
crescimento em substratos proteicos**

Ribeirão Preto -SP

2015

Tamires Aparecida Bitencourt

**Perfil transcricional do dermatófito *Trichophyton rubrum*
exposto ao antifúngico *trans*-chalcona durante seu
crescimento em substratos proteicos**

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia aplicada à saúde

Orientador: Prof^ª Dra. Ana Lúcia Fachin Saltoratto

Co-orientador: Prof. Mozart de Azevedo Marins

Colaborador: Prof. Dr. Geraldo Aleixo da Silva Passos Jr.

Ribeirão Preto – SP

2015

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento Técnico
da Biblioteca Central da UNAERP

- Universidade de Ribeirão Preto -

B624p Bitencourt, Tamires Aparecida, 1989-
Perfil transcricional do dermatófito *Trichophyton rubrum*
exposto ao antifúngico *trans*-chalcona durante seu crescimento
em substratos proteicos / Tamires Aparecida Bitencourt. - -
Ribeirão Preto, 2015.
79 f.: il. color.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Lúcia Fachin.

Tese (doutorado) - Universidade de Ribeirão Preto, UNAERP,
Biotecnologia. Ribeirão Preto, 2015.

1. *Trans*-chalcona. 2. *T. rubrum*. 3. Queratina. I. Título.

CDD 660

TAMIRES APARECIDA BITENCOURT

PERFIL TRANSCRICIONAL DO DERMATÓFITO *TRICHOPHYTON RUBRUM*
EXPOSTO AO ANTIFÚNGICO TRANS-CHALCONA DURANTE SEU
CRESCIMENTO EM SUBSTRATOS PROTEICOS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto, para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde

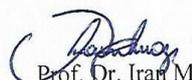
Data da defesa: 14 de dezembro de 2015

Resultado: Aprovada

BANCA EXAMINADORA


Profa. Dra. Ana Lúcia Fachin Saltoratto
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP


Prof. Dr. Pablo Rodrigues Sanches
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP


Prof. Dr. Iran Malavazi
Universidade Federal de São Carlos - UFSCar


Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida
Universidade Estadual Paulista - UNESP


Profa. Dra. Suzélei de Castro França
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP

RIBEIRÃO PRETO
2015

Dedico esse trabalho aos
meus maiores incentivadores:
Lecy do Carmo Bitencourt e
Sebastião Luiz Bitencourt.
Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

- ♥ Agradeço imensamente a profa Dra Ana Lúcia Fachin Saltoratto pelo ensinamento, pela confiança, pelos momentos de discussão valiosos e enriquecedores, pelo seu entusiasmo e amor à pesquisa contagiante e, sobretudo, pela amizade e pelo carinho sempre.
- ♥ Agradeço ao prof. Dr Mozart Marins pela introdução à pesquisa científica, pelo seu olhar crítico e opiniões relevantes, pela confiança, convivência e por todo aprendizado, que muito contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional.
- ♥ Agradeço à FAPESP pela bolsa de Doutorado oferecida para a realização deste projeto e todo o suporte financeiro (Processo 2012/02920-7).
- ♥ Agradeço ao prof. Dr. Iran Malavazi pela colaboração imprescindível, pelas opiniões que nortearam e lapidaram os dados obtidos, por estar acessível e solícito em todos os momentos. Aproveito para agradecer a doutoranda Marina Rocha, do laboratório de Genética Evolutiva e Biologia molecular da UFSCAR, pela acolhida, pela contribuição valiosa e por toda atenção concedida.
- ♥ Agradeço ao prof. Dr Geraldo de Aleixo Passos Jr por ter colaborado com o trabalho, disseminando conhecimentos para a realização dos microarranjos e também para a análise estatística dos dados.
- ♥ Agradeço ao prof. Dr. Rene Oliveira Belebony pelas discussões enriquecedoras, pelo entusiasmo e pela torcida sempre!
- ♥ Agradeço ao amigo Luis Eduardo Ferreira por estar próximo e acessível e por toda ajuda em todos os momentos que recorri à você.
- ♥ Agradeço às meninas do laboratório de Genética da FMRP: Claudia Macedo e Amanda Freire Assis pelo acompanhamento nas fases iniciais dos experimentos, pelo acolhimento e pelos ensinamentos agregados.
- ♥ Agradeço à profa Dra Nilce M. Martinez Rossi e o prof. Dr. Antônio Rossi por ter me recebido em seu laboratório e permitido realizar experimentos decisivos para a finalização do meu trabalho.
- ♥ Agradeço a pós-doc Elza Akie Sakamoto Lang e à Cuca, do Laboratório de Genética e Biologia Molecular de Fungos da FMRP, pela acolhida generosa e por todas as contribuições e ensinamentos.

- ♥ Agradeço ao amigo e parceiro Matheus Eloy Franco por toda sua ajuda na análise de bioinformática dos dados obtidos.
- ♥ Agradeço à Tatiana Takahasi Komoto pela amizade, pela parceria de trabalho de longa data, pelos momentos valiosos juntas e pela torcida sempre.
- ♥ Agradeço aos amigos Giovana Lanchotti, Denise Dias de Oliveira, Bruna Cestari, Lucas Junqueira e Camila Guimarães por estarem próximos e tornarem os dias mais “leves”.
- ♥ Agradeço ao amigo Gabriel Silva pela torcida e pelo aprendizado juntos.
- ♥ Agradeço ao amigo Luis Felipe Bortolotto pelos momentos de discussão e também de espairecimento.
- ♥ Agradeço a Bruna Cantelli pelo carinho, pela amizade, pela força e motivação em todos os momentos do trabalho.
- ♥ Agradeço aos queridos amigos: Mariana Heinzen, Vitor Caressato, Yasmim Crivelenti, Thais Mesquita, Felipe Teixeira pela amizade e convivência sempre revigoradora.
- ♥ Agradeço ao parceiro Igor Sawasaki por toda sua ajuda durante o rastreamento dos mutantes, por seu olhar perspicaz aos resultados encontrados e pela convivência, pude aprender muito nesse período com você.
- ♥ Agradeço, de forma geral, à todos os integrantes do laboratório de Biociências, do departamento de Biotecnologia da UNAERP, por todos os momentos que passamos juntos.
- ♥ Agradeço também à Simone Torres, à Patrícia Guarnica Roberto, Carlos Ono, Sarazetti Pereira e Elenice Rossetto pelas mais diversas formas de ajuda durante essa caminhada.
- ♥ Agradeço à profa Dra Suzelei de Castro França e à todos os docentes da Unidade de Biotecnologia da UNAERP pela acolhida, pela oportunidade e pelo aprendizado.
- ♥ Agradeço à família pela compreensão, pela motivação, por ser meu alicerce!!!

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

Esse trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes entidades e instituições:

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP

Processos (2012/02920-7 e 2012/03845-9)

Universidade de Ribeirão Preto- UNAERP

"Dizem que antes de um rio entrar no mar, ele treme de medo. Olha para trás, para toda a jornada que percorreu, para os cumes, as montanhas, para o longo caminho sinuoso que trilhou através de florestas e povoados, e vê à sua frente um oceano tão vasto, que entrar nele nada mais é do que desaparecer para sempre. Mas não há outra maneira. O rio não pode voltar. Ninguém pode voltar. Voltar é impossível na existência. O rio precisa de se arriscar e entrar no oceano. E somente quando ele entrar no oceano é que o medo desaparece, porque apenas então o rio saberá que não se trata de desaparecer no oceano, mas de tornar-se oceano." Osho

RESUMO

Trichophyton rubrum é o agente causador mais frequente de dermatomicoses superficiais no Brasil e no mundo. Apesar da importância clínica das infecções provocadas por *T. rubrum*, os processos moleculares da relação fungo-hospedeiro não foram totalmente compreendidos. A técnica de microarranjo pode possibilitar a identificação de genes diferencialmente expressos por *T. rubrum* durante seu crescimento sobre proteínas da matriz extracelular da pele como queratina e elastina, identificando genes envolvidos com a dermatofitose superficial e profunda, respectivamente. O conhecimento sobre fatores de virulência do fungo na infecção do hospedeiro podem ser utilizados como alvos para o desenvolvimento de novos antifúngicos. As chalconas são flavonoides que apresentam atividade antifúngica contra dermatófitos, acredita-se que seja através da ação em diferentes alvos como a parede celular e na membrana celular (síntese do ergosterol e de ácido graxo). Dessa forma, o objetivo do trabalho foi avaliar o perfil transcricional de *T. rubrum* exposto à *trans*-chalcona utilizando substratos proteicos (queratina e elastina) e, a partir dos dados de transcriptoma, estudar a função de um gene relacionado com a resposta à *trans*-chalcona através da obtenção de uma linhagem de mutante nulo pela técnica de rompimento gênico. Para tanto, *T. rubrum* foi cultivado em meio mínimo contendo queratina ou elastina adicionado de *trans*-chalcona por 3, 7 e 14 dias, sendo empregadas lâminas de microarranjo customizadas no formato 4x44K, cobrindo 6091 genes. Foram modulados 290 e 62 genes durante o crescimento de *T. rubrum* em queratina e elastina, respectivamente. Durante o crescimento de *T. rubrum* em queratina um número significativo de proteases (15) foram induzidas, com destaque para Mep 4 e Lap 1, em contraste, em elastina houve a indução de apenas 2 proteases concomitantemente com a indução de 2 lipases. Indução exclusiva das chaperonas HSP70-like, HSP88-like e HSP90-like foi observada para queratina. Esses dados podem ser indicativos do perfil transcricional da infecção superficial e profunda. Paralelamente, a exposição de *T. rubrum* à *trans*-chalcona gerou 100, 148 e 145 genes diferencialmente expressos em meio mínimo, meio mínimo contendo queratina e meio mínimo contendo elastina, respectivamente. As principais classes de genes modulados por esse composto mostraram relação com síntese de lipídios (ácidos graxos), vias alternativas de geração de energia como ciclo do glioxilato e β oxidação de ácidos graxos, e vias de transdução de sinais envolvidas com a integridade de parede celular (CWI). De fato, ensaio de *western blot* mostrou que *trans*-chalcona aumentou a fosforilação da proteína MAPK em *T. rubrum*, sugerindo que esse composto ativa a cascata de sinalização envolvida no mecanismo de reparo e reconstituição de parede celular. No sentido de estudar os alvos da *trans*-chalcona, foi obtida uma linhagem nula para o gene da ácido graxo acetil transferase (FAC). O transformante denominado Δ FAC(18) apresentou maior crescimento em meio mínimo suplementado com ácidos graxos, mostrou-se mais resistente à *trans*-chalcona, além de apresentar menor crescimento em experimento de infecção utilizando fragmentos de unhas. Portanto, sugere-se que a *trans*-chalcona exerça atividade antifúngica contra *T. rubrum* atuando sobre a síntese de ácido graxo e provocando alterações no metabolismo energético do fungo e, em decorrência, interferindo com a integridade de parede celular.

Palavras-chave: *T. rubrum*, *trans*-chalcona, queratina, elastina, FAS, CWI

ABSTRACT

Trichophyton rubrum is the main causative agent of dermatophytosis in Brazil and worldwide. Although the clinic importance of infections promoted by *T. rubrum* little is known about the molecular aspects involved in host-pathogen relationship. The use of microarray technique allows the identification of differentially expressed genes during the growth of *T. rubrum* on proteins of skin extracellular matrix like keratin and elastin, suggesting genes involved in superficial and deep dermatophytosis, respectively. The knowledge about virulence factors in the host infection may be utilized as targets for antifungal drug development. The chalcones are flavonoid that show antifungal activity against dermatophytes, which seems to be through the action on different targets like cell wall and cellular membrane (ergosterol biosynthesis and fatty acid). Thus, the aim of this work was to evaluate the transcriptional profile of *T. rubrum* exposed to *trans*-chalcone and grown on protein sources (keratin and elastin). From the data analysis, assess the function of a gene related to *T. rubrum* response to *trans*-chalcone using the gene disruption assay. So, *T. rubrum* was cultivated in minimal medium added of keratin or elastin and *trans*-chalcone for 3, 7 and 14 days, using customized slides in 4X44 K, covering 6,091 encoding genes. The statistical analysis showed 290 and 62 genes differentially expressed by keratin and elastin, respectively. During *T. rubrum* growth on keratin, a significant number of encoding genes of proteases were induced (15), among them Mep 4 and Lap 1 were highlighted, however during *T. rubrum* growth on elastin just 2 encoding genes of proteases were modulated concomitantly with the induction of 2 encoding genes of lipases. Aside from the exclusively induction of HSP70-like, HSP88-like and HSP90-like for keratin source. These data may be a indicative of transcriptional profile of superficial and deep infection. In regarding to *trans*-chalcone exposure, the analysis presented 100, 148 and 145 genes modulated by *T. rubrum* growth on minimal medium, minimal medium with keratin and minimal medium with elastin, respectively. The main classes of genes modulated by *trans*-chalcone exposure were involved in lipid synthesis, alternative pathways for energy generation like glyoxylate cycle and β -oxidation of fatty acids, and transduction pathways related to cell wall integrity (CWI). Indeed, the western blot assays carried out after the growth of *T. rubrum* in presence of chalcone showed an increase of phosphorylation of MAPK, suggesting that this compound affects the cell wall repair and reconstitution mechanism, activating this signaling pathway. In order to study the targets of *trans*-chalcone it was obtained a null mutant strain for the gene of fatty acid acetyl transferase (FAC). The transformant was called Δ FAC(18), and showed an increase in growth when cultivated with fatty acids, and also seemed to be more resistant to chalcone, and showed a decrease in ability to grow in nail fragments when compared to wild strain. Thus, the *trans*-chalcone seems to show antifungal activity toward *T. rubrum* acting on fatty acid synthesis, and promoting changes in fungal energy metabolism, and as a result, interfering in fungal cell wall integrity.

Keywords: *T. rubrum*. *trans*-chalcone. Keratin. Elastin. FAS. CWI

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Esquema geral dos estágios da infecção por dermatófitos.....3
- Figura 2: Estrutura da *trans*-chalcona.....9
- Figura 3: 1) Diferenças estruturais entre FAS de fungos (esquerda) e FAS de mamíferos (direita). (MAIER; JENNI; BAN, 2006; JENNI et al.,2006) 2) Sequência dos domínios e organização do complexo da enzima ácido graxo sintase (FAS) de fungos (A) e de mamíferos (B) Fonte: Schweizer; Hofmann (2004).....11
- Figura 4 Esquema das condições de cultivo avaliadas nesse estudo.....25
- Figura 5: Representação da estrutura do cassete de deleção para o gene ácido graxo sintase acetil transferase –FAC, obtida a partir do plasmídeo PUC 57 KAN. Barras pretas indicam a estrutura do gene na linhagem selvagem CBS118892 e as barras cinzas referem-se ao gene de resistência a higromicina.37
- Figura 6: Diagrama de Venn mostrando os genes que foram modulados durante o crescimento de *T. rubrum* em diferentes condições de cultivo. A): Genes modulados durante o crescimento de *T. rubrum* em queratina (MMQ) e elastina (MME). B) Genes modulados durante o crescimento de *T. rubrum* exposto à *trans*-chalcona nas diferentes condições estudadas. *T. rubrum* crescido em MMTChal, MMQTChal e MMETChal, comparado com a mesma condição de cultivo ausente de droga.....43
- Figura 7: Anotação funcional dos genes modulados em elastina (A) e queratina (B)....45
- Figura 8: Categorização funcional realizada de acordo com *Gene Ontology* dos genes modulados referente à exposição à *trans*-chalcona para as situações A) MMTChal, B) MMETChal e C) MMQTChal.. Barras laranjas e azuis indicam o número de genes reprimidos e induzidos, respectivamente, de cada categoria. ($p < 0,05$).....52
- Figura 9 Representação esquemática do transporte de acetil-COA em *Saccharomyces cerevisiae*. (Strijbis e Distel, 2010) Abreviações: Aco1: aconitase, β -ox: β -oxidação de ácidos graxos, Cit2: peroxisomal citrato sintase, Icl1: isocitrato liase, mitCat2: mitocondrial Cat2, Mls1: malato sintase, perCat2:peroxisomal Cat2, TCA ciclo: ciclo do ácido tricarbóxico, Yat1/Yat2: carnitina acetil-transferase.....55
- Figura 10: A) Esquema hipotético da via de transdução de sinais relacionada à manutenção da integridade de parede celular ativada por *T. rubrum* após à exposição à

trans-chalcona. B) Identificador do gene codificador da proteína de *T. rubrum* e ortólogo para *Saccharomyces cerevisiae* s288c. O estímulo é detectado pela proteína sensora WSC3 que recrutará proteínas do tipo GEF para ativação de RHO, que poderá atuar sobre proteínas efetoras (EP) na membrana plasmática (PM). Adicionalmente, a regulação negativa de RHO é indicada pela proteína inibidora do tipo GAP. A cascata de sinalização desencadeada pela proteínas quinases CMGC, CDK e serina treonina quinase, que podem ocorrer concomitantemente, mediam os efeitos para organização da actina e manutenção da integridade da parede celular através da atuação sobre diferentes fatores de transcrição no núcleo, e também através da ativação de Mpk1 (MAPK).....59

Figura 11: A) Western blot realizado para quantificar a produção e a fosforilação da proteína MAPK p42-44 de *T. rubrum* cultivado em Meio Mínimo adicionado de 0, 24 µg/mL de *trans*-chalcona ou ausente (controle) em 1 à 3 dias. A γ -tubulina foi utilizada como normalizador, e o *fold change* foi obtido pela relação de MAPK fosforilado pelo anticorpo MAPK total.. B) Expressão gênica por PCR quantitativo de CMGC/MAPK Erk1 de *T. rubrum* cultivado em meio mínimo adicionado de 0, 24 µg/mL de *trans*-chalcona ou ausente (controle) em 1 à 3 dias. O calibrador foi representado pela mesma condição sem droga.....61

Figura 12: Rede de interação gerada pelo software string, gerado a partir do gene codificador de GTP binding protein (TERG_01365) modulado por *T. rubrum* após a exposição à chalcona. Os genes da via de interação são genes do banco de dados do “string”.....62

Figura 13: Modulação da expressão gênica de *T. rubrum* CBS118892 crescido sobre elastina e queratina. (Referência de modulação: condição MM).....64

Figura 14 Modulação da expressão gênica de *T. rubrum* CBS118892 após a exposição à *trans*-chalcona. (Referência de modulação: MM, MME ou MMQ).....64

Figura 15: Cultivo das colônias obtidas na transformação com o cassete de deleção do gene FAC. Transformantes: F1-F39, F1t-F4t, após 13 dias de incubação.. A) meio mínimo B) meio mínimo + ácido palmítico (0,01%), C) meio mínimo + ácido palmítico + *trans*-chalcona (0,24 µg/mL). Círculos vermelhos indicam colônias com maior crescimento para ácido palmítico e/ou ácido palmítico +*trans*-chalcona.....66

Figura 16: Cultivo das colônias de transformantes F46-F50 pós 14 dias de incubação.. A) meio mínimo. B) meio mínimo +*trans*-chalcona (0,24 µg/mL), C) meio mínimo + ácido palmítico (0,01%), D) meio mínimo + ácido palmítico (0,01%) + *trans*-chalcona (0,24 µg/mL). Círculos vermelhos indicam colônias que apresentaram maior crescimento para meio contendo ácido palmítico e/ou ácido palmítico + *trans*-chalcona.....66

Figura 17: Eletroforese em gel de agarose 2%, referente a amplificação do gene de higromicina (96pb). 1) marcador de 100 pb (Fermentas®), 2) Linhagem CBS 118892, 3) Δ FAC(18), 4) Δ FAC (4t), 5) Δ FAC (46), 6) Δ FAC (48), 7) -, 8) pSCN43 , 9) -, 10) branco.....67

Figura 18: : Eletroforese em gel de agarose 1,5% referente a amplificação do cassette de deleção F-AC (744 pb). 1) marcador de peso molecular de 1Kb (Fermentas®), 2) Δ FAC, (18) 3) CBS 118892, 4) branco.....68

Figura 19: Cultivo da linhagem CBS 118892 e do mutante Δ FAC (18) em meio de cultura adicionado de *trans*-chalcona. A esquerda encontra-se Δ FAC(18) e a direita a linhagem CBS118892 A) Δ FAC (18) e CBS118892 cultivadas em meio Sabouraud contendo 24 μ g/mL de *trans*-chalcona, B) Δ FAC (18) e CBS118892 cultivadas em meio Meio Mínimo contendo 24 μ g/mL de *trans*-chalcona, C) Δ FAC (18) e CBS118892 cultivadas em Meio Sabouraud adicionado de 48 μ g/mL de *trans*-chalcona, D) Δ FAC (18) e CBS118892 cultivadas em Meio Mínimo adicionado de 48 μ g/mL de *trans*-chalcona.....69

Figura 20: Monitoramento do crescimento de *T. rubrum* : PSCN(esquerda), Δ FAC (18) (direita) e CBS118892 (abaixo) em Meio Mínimo + ácido palmítico 0,01% (A), Meio Mínimo + ácido mirístico 0,01% (B) e Meio Mínimo + ácido oleico 0,01% (C) depois de 7 dias de incubação. Higromicina na concentração de 500 μ g/mL foi utilizada em todos os meios de cultivo analisados.....70

Figura 21: Comparação entre o crescimento de CBS118892 (A) e F18 (B) em fragmentos de unhas. Efeito observado por microscopia óptica após 3 dias da incubação de conídios a 28°C. Objetos escuros observados na parte esquerda inferior correspondem aos fragmentos de unhas.....71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Mecanismos de ação e Atividades Biológicas promovidas pelas chalconas	9
Tabela 2 Genes selecionados para as reações de RT-qPCR.....	32
Tabela 3 Genes de <i>T. rubrum</i> modulados utilizando diferentes condições de cultivo....	42
Tabela 4 Proteases e lipases moduladas por <i>T. rubrum</i> durante o crescimento em queratina.....	47
Tabela 5 Proteases e lipases moduladas durante o crescimento de <i>T. rubrum</i> em elastina.....	47
Tabela 6 Genes envolvidos na síntese de ácidos graxos e lipídios modulados após à exposição à <i>trans</i> -chalcona	53
Tabela 7 Genes envolvidos no transporte de acetil e de vias correlacionadas modulados durante o crescimento de <i>T. rubrum</i> na presença da chalcona.....	54
Tabela 8 Genes de transdução de sinais modulados após a exposição à chalcona.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS

AC: ácido graxo acetil transferase
AGC: “protein kinase A, G, C”
AK: adenilato quinase
CAMK: “Ca²/calmodulin-dependent Kinase
cAMP: “cyclic-Adenosine monophosphate”
CBS: *Centraalbureau voor Schimmelcultures*
CDK: “cyclin dependente Kinase”
cDNA: fita de DNA complementar
CFM: Concentração fungicida Mínima
CIM: Concentração Inibitória Mínima
CK1: “casein Kinase”
CLK: “CDK-like Kinase”
cRNA: RNA complementar
CTAB: brometo cetil trimetil amônio
CTP trifosfato de citidina
CWI: “cell wall integrity”
Cy3: cianina
DDPV: dipeptidil-peptidase
DEPC: dietilpirocarbonato
DMSO: dimetilsufóxido
DNA: ácido desoxirribonucleico
dNTP: nucleotídeos trifosfato
DTT: ditioneitol
EDTA: ácido etilenodiamino tetraacético
ESTs: “Expression Sequence Tags”
EUA: Estados Unidos da América
FAS: “fatty acid synthase”
FDA: “Food and Drug Administration”
GAP: “GTP activator protein”
GEF: “guanine exchange factor”
GOI: “gene of interest”
GPI: glicosilfosfatidilinositol
GSK3: “glycogen synthase kinase 3”
GTP “guanosine-nucleotide-binding protein”
HIV: vírus da imunodeficiência humana
Lap: aminopeptidase
MAPK: “mitogen activated protein kinase”
Mep: metaloproteinase
MMS: meio mínimo mais sacarose
Ncbi: “National Center for Biology Information”
NDR: “nuclear Dbf2-related”
Norm: normalizador
PCR: reação em cadeia da polimerase
PEG: polietilenoglicol
pH: potencial hidrogeniônico
PMSF: *fenil-metano(sulfonil)fluoreto*
q.s.p.: quantidade suficiente para
RNA: ácido ribonucleico

ROX: “6-carboxy-X-rhodamine”
RPMI : “Roswell Park Memorial Institute”
SBF: soro bovino fetal
SDS: dodecil sulfato de sódico
Sub: subtilisina
TBS: tampão salina tris
TBST:tampão salina-tris com tween
TCA: ciclo dos ácidos tricarboxílicos
Temed: tetrametiletilenodiamina
TreD: *Trichophyton rubrum* expression database

SUMÁRIO

I INTRODUÇÃO.....	1
1.1- <i>Trichophyton rubrum</i>	1
1.2 PROCESSO DE INFECCÃO CAUSADO POR DERMATÓFITOS.....	2
1.3 ABORDAGENS MOLECULARES PARA AVALIAR A EXPRESSÃO DE GENES DE DERMATÓFITOS EM CONDIÇÕES DE CULTIVO <i>IN VITRO</i> QUE MIMETIZAM AS INFECCÕES NA PELE.....	4
1.4 DROGAS ANTIFÚNGICAS COMERCIAIS.....	6
1.4.1 Mecanismo de ação das principais classes dos antifúngicos comerciais.....	7
1.5 ANTIFÚNGICOS DE ORIGEM NATURAL (CHALCONAS).....	9
II HIPÓTESE.....	14
III OBJETIVOS.....	15
3.1 OBEJTIVO GERAL.....	15
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
IV MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
4.1 LINHAGEM DE <i>T. rubrum</i>	16
4.2 PRODUTOS COMERCIAIS.....	16
4.3 MEIOS DE CULTURA.....	16
4.3.1 Meio Sabouraud.....	16
4.3.2 Meio RPMI -1640.....	16
4.3.3 Meio mínimo com sacarose (MMS) “Top Ágar” para regeneração de protoplastos.....	17
4.3.4 Meio mínimo com sacarose (MMS) “Bottom Ágar” para a regeneração de protoplastos.....	17
4.3.5 Meio Mínimo com nitrato, glicose e caseína (Cove’s, 1966).....	17
4.3.6 Meio Mínimo com diferentes fontes de Queratina/Elastina (MMQ/MME).....	18
4.4 SOLUÇÕES.....	18
4.4.1 - Solução de <i>trans</i> -chalcona (Sigma).....	18
4.4.2 Solução do Antifúngico comercial terbinafina.....	18
4.4.3 Solução de Sais (Cove, 1966).....	18
4.4.4 Solução de Elementos Traço (Cove, 1966).....	19
4.4.5 Tampão de Extração de DNA.....	19
4.4.6 Tampão de Lavagem para extração de DNA	19
4.4.7 Tampão de extração de proteína total para Western Blot.....	19
4.4.8 Soluções para Quantificação de Proteínas Totais para Western Blot.....	20
4.4.9 Tampão para eletroforese de proteína 5x concentrada para Western Blot.....	20
4.4.10 Tampão de transferência para gel SDS page para Western Blot.....	21
4.4.11 Tampão TBS 10x para Western Blot.....	21

4.4.12 Tampão TBST 1x para ensaio de Western Blot.....	21
4.4.13 Solução Corante <i>Coomassie Blue</i> para ensaio de Western Blot .	21
4.4.14 Solução Descorante de <i>Coomassie Blue</i> para ensaio de Western Blot.....	21
4.4.15 Tampão de amostra para eletroforese de proteínas 5x para ensaio de “Western Blot”	22
4.4.16 Gel de poliacrilamida – empilhamento 1,2% para ensaio de “Western Blot”.....	22
4.4.17 Gel de poliacrilamida – corrida para ensaio de “Western Blot”	22
4.4.18 Solução Lítica para Protoplastos.....	23
4.4.19 Solução CT para Transformação de Protoplastos.....	23
4.4.20 Solução DT para Transformação de Protoplastos.....	23
4.4.21 Solução ET para Transformação de Protoplastos.....	23
4.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM).....	24
4.6 CONDIÇÕES DE CULTIVO DE <i>T. rubrum</i> EXPOSTO A TRANS-CHALCONA UTILIZANDO SUBSTRATOS PROTEICOS (QUERATINA E ELASTINA)	24
4.7 – EXTRAÇÃO DE RNA.....	25
4.7.1 Análise das amostras de RNA.....	26
4.8 CUSTOMIZAÇÃO DAS LÂMINAS.....	26
4.9 MARCAÇÃO DAS AMOSTRAS DE RNA.....	26
4.10 LAVAGEM DAS LÂMINAS.....	30
4.11 AQUISIÇÃO DAS IMAGENS.....	30
4.12 ANÁLISE DOS DADOS DE MICROARRANJO DE <i>T. rubrum</i> EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO	31
4.13 ANOTAÇÃO FUNCIONAL DOS GENES MODULADOS.....	31
4.14 CATEGORIZAÇÃO FUNCIONAL DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS.....	31
4.15 ENSAIO DE RT-QPCR PARA VALIDAÇÃO DOS DADOS DE MICROARRANJO DE <i>T. rubrum</i> (MICÉLIO).....	32
4.15.1 Reação para verificação da eficiência dos “primers”.....	33
4.15.2 Quantificação Relativa.....	34
4.16 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E WESTERN BLOT.....	35
4.17 CONSTRUÇÃO DO CASSETE DE DELEÇÃO DO GENE ENVOLVIDO COM A RESPOSTA DE <i>T. rubrum</i> À TRANS-CHALCONA (FAC).....	36
4.18 TRANSFORMAÇÃO DA LINHAGEM CBS 118892 DE <i>T. rubrum</i> COM O CASSETE DE DELEÇÃO DO GENE FAC.....	37
4.19 AMPLIFICAÇÃO DO GENE DE RESISTÊNCIA À HIGROMICINA E DO FRAGMENTO QUE FLANQUEIA A CONSTRUÇÃO (FAC + HIGROMICINA) NOS TRANSFORMANTES OBTIDOS.....	38
4.20 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DO TRANSFORMANTE Δ FAC DE <i>T. rubrum</i> NA PRESENÇA DE TRANS-CHALCONA E EM DIFERENTES FONTES DE ÁCIDOS GRAXOS.....	39
4.21 ENSAIO DE CRESCIMENTO DE <i>T. rubrum</i> CBS 118892 E Δ FAC EM FRAGMENTOS DE UNHAS.....	39
V- RESULTADOS E DISCUSSÃO	41

5.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E FUNGICIDA MÍNIMA (CFM).....	41
5.2 ANÁLISE TRANSCRICIONAL DE <i>T. rubrum</i> EM RESPOSTA À TRANS-CHALCONA EM MEIO ADICIONADO DE ELASTINA E QUERATINA.....	41
5.3 CATEGORIZAÇÃO FUNCIONAL DOS GENES MODULADOS	44
5.3.1 Categorização funcional dos genes modulados durante o crescimento de <i>T. rubrum</i> em substratos proteicos.....	44
5.3.2 Categorização e enriquecimento funcional dos genes modulados em resposta à <i>trans</i> -chalcona.....	49
5.3.3 Genes relacionados à síntese de lipídios.....	53
5.3.4 Genes envolvidos no transporte de Acetil-COA e ciclo do glioxilato.....	54
5.3.5 Transdutores de sinais envolvidos na integridade da parede celular.....	56
5.4 VALIDAÇÃO DOS DADOS DE MICROARRANJO.....	63
5.5 GERAÇÃO DE LINHAGEM DE MUTANTE NULO PARA O GENE ÁCIDO GRAXO SINTASE ACETIL TRANSFERASE (FAC).....	65
5.6 ANÁLISE DOS TRANSFORMANTES OBTIDOS POR REAÇÕES DE PCR.....	67
5.7 AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES FENOTÍPICAS NA LINHAGEM Δ FAC 18.....	68
5.8 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE Δ FAC (18) EM FRAGMENTOS DE UNHAS.....	70
VI CONCLUSÃO	72
REFERÊNCIAS.....	73

I INTRODUÇÃO

1.1-*Trichophyton rubrum*

As dermatofitoses são provocadas por fungos dermatófitos, especializados em infectar tecidos queratinizados como unhas, pele e cabelo. Há cerca de 40 espécies divididas em 3 gêneros *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton*. Os dermatófitos classificam-se, ainda, como geofílicos, zoofílicos e antropofílicos de acordo com o *habitat* de associação (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995). As infecções causadas por esses fungos são denominadas de *tineas* seguida do seu local de ocorrência, por exemplo, *tinea pedis*, *tinea unguium* e *tinea corporis*, para as infecções com ocorrência nos pés, nas unhas e no corpo, respectivamente (ACHTERMAN; WHITE, 2012). Apesar de não serem normalmente fatais ou incapacitantes são incômodas e recorrentes (PERES et al, 2010a), o fato da recorrência não está claro, se é devido a uma nova aquisição ou reativação de uma infecção prévia (ACHTERMAN; WHITE, 2012).

As dermatofitoses afetam cerca de 20 a 25% da população mundial, representando um impacto econômico nos EUA estimado em 500 milhões de dólares por ano para o tratamento dessas infecções (AMEEN, 2010; WHITE et al., 2008). Dentre os dermatófitos que provocam infecções cutâneas, o mais frequentemente isolado nos casos clínicos de *tinea pedis* (pés), *tinea unguium* (unhas), *tinea corporis* (corpo) e *tinea cruris* (virilha) é o antropofílico *Trichophyton rubrum* (*T.rubrum*) (SEEBACHER; BOUCHARA; MIGNON, 2008). Além disso, *T.rubrum* é causa de mais de 69,5% de todas as infecções provocadas por dermatófitos em humanos no mundo (AMEEN, 2010); inclusive no Brasil, com ocorrência de 33,2% somente no estado de São Paulo (GODOY-MARTINEZ et al., 2009). De fato, estudos realizados por um período de mais de 10 anos, na cidade de São Paulo, destacam como principal agente etiológico isolado a espécie *T. rubrum*. (CHINELLI et al., 2003). Da mesma forma, a região nordeste e centro-oeste apresentam significativa ocorrência de infecções provocadas pelos dermatófitos *T. tonsurans* e *T. rubrum* (SILVEIRA-GOMES et al., 2013). Em geral, as infecções prevalentes são as superficiais, mas em alguns casos têm ocorrido de forma invasiva devido ao elevado número de pacientes imunocomprometidos como os portadores de HIV, diabetes e insuficiência renal crônica (DA SILVA et al., 2014).

Apesar da alta incidência desse dermatófito e sua importância clínica, ainda se conhece pouco sobre seu caráter fisio-patológico. Realmente, as abordagens genéticas que oferecem novas perspectivas em quase todas as áreas de pesquisa para estudo da patogenicidade em microrganismos tem sido raramente utilizadas em dermatófitos, em contraste com outros organismos patogênicos de interesse clínico, como *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* ou *Cryptococcus neoformans*. Conseqüentemente, pequeno é o conhecimento da patogenicidade dos dermatofitos a nível molecular (GRUMBT; MONOD; STAIB, 2011).

Uma mudança nesse quadro foi a iniciativa do Broad Institute (MIT, Harvard), que foi responsável pelo projeto do sequenciamento do genoma comparativo de 5 dermatófitos: *T. rubrum*, *T. tonsurans*, *T. equinum*, *M. gypseum*, *M. canis* (MARTINEZ et al., 2012). Previamente, uma outra iniciativa independente também sequenciou o genoma de outros 2 dermatófitos: *T. verrucosum* e *Arthroderma benhamiae* (BURMESTER et al., 2011). Esses dados encontram-se atualmente disponíveis (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/dermatophyte_comparative/MultiHome.html) e são relevantes para a melhor compreensão sobre especificidade de dermatófitos a determinados nichos, genes potencialmente envolvidos com a capacidade do fungo em causar a infecção, além de mecanismos envolvidos na resposta do fungo ao sistema imune do hospedeiro. Adicionalmente, o sequenciamento permitiu a estimativa do tamanho do genoma de *T. rubrum* (22,5Mb), que se encontra organizado em 5 cromossomos, como previsto anteriormente através do uso de eletroforese em campo pulsado (CERVELATTI et al., 2004). Além disso, a recente liberação do genoma contribuiu fortemente para os estudos da genômica funcional em dermatófitos, que ainda são considerados desafiadores em decorrência de diversas dificuldades na implementação de técnicas de manipulação genética nesses fungos (KAUFMAN et al., 2004).

1.2 PROCESSO DE INFECÇÃO CAUSADO POR DERMATÓFITOS

Durante a infecção, os arthroconídios devem superar as adversidades impostas pelo ambiente e pela pele (incluindo à exposição aos raios UV, a microbiota do hospedeiro e os constituintes da pele como os ácidos graxos, além do processo de queratinização para renovação da pele). Em seguida, deve ocorrer a adesão do arthroconídio, o que é mediado por glicoproteínas chamadas adesinas, acredita-se que as proteases também podem auxiliar nesse estágio (TAINWALA; SHARMA, 2011; MONOD et al., 2002). Logo após,

ocorre a germinação e penetração das hifas, que ocorre rapidamente e em múltiplas direções para evitar a eliminação do fungo pela descamação do epitélio.

Após a adesão, o fungo precisa obter nutrientes a partir das macromoléculas do tecido do hospedeiro, como as proteínas e os lipídios. Para que isso ocorra, as macromoléculas são hidrolisadas por um arsenal de enzimas hidrolíticas como proteases, collagenases, fosfatases e lipases. Entre as enzimas secretadas pelos dermatófitos, as proteases queratinolíticas são mais estudadas e seu papel para a patogencidade do fungo está muito estabelecido (PERES et al, 2010a). A atividade das proteases ocorre após a ativação de bombas de efluxo de sulfito, que reduzem as pontes dissulfeto da queratina dura, tornando-a acessível à ação das proteases (MONOD, 2008; KASPEROVA; KUNERT; RASKA, 2013), que são ativadas de acordo com o monitoramento do pH do ambiente (PERES et al, 2010a). O esquema do processo de infecção encontra-se representado na Figura 1.

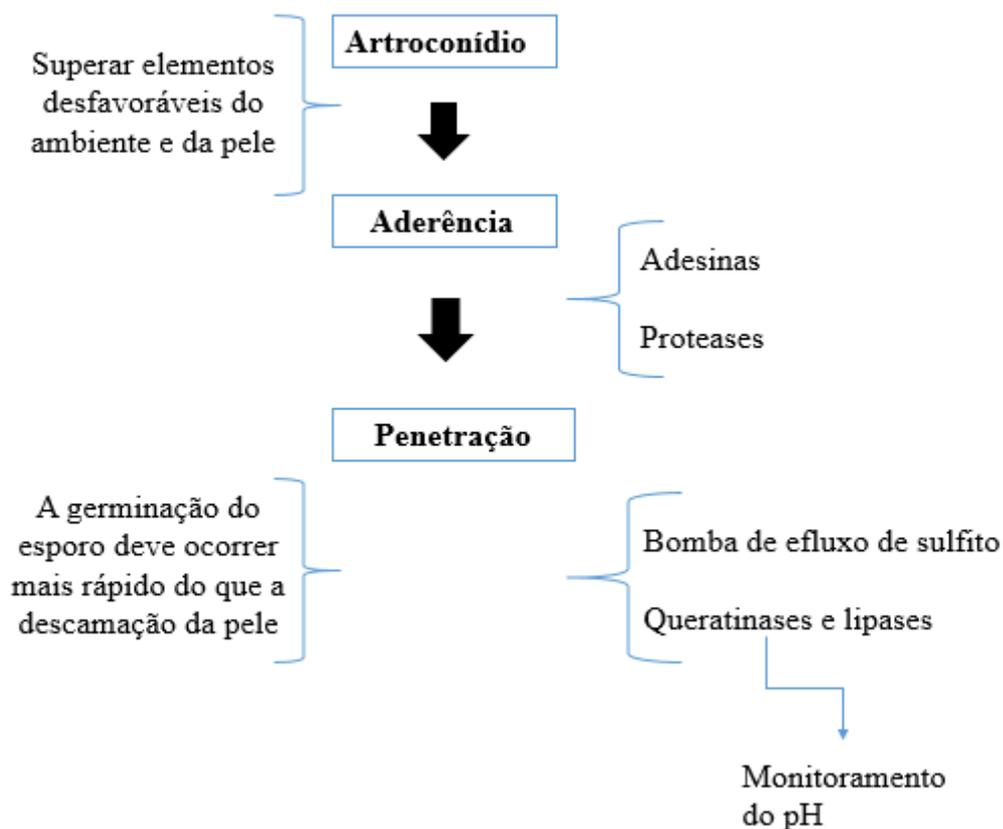


Figura 1 Esquema geral dos estágios da infecção por dermatófitos.

Os modelos de infecção para estudo de interação dermatófito-hospedeiro ainda são limitados, os estudos *in vivo* com modelo animal são mais apropriados para as

espécies zoofílicas, pois ocorre reversão de infecção ou mesmo ausência de colonização para as espécies antropofílicas (WHITE et al., 2008). De forma que, os estudos de interação para as espécies de fungos antropofílicos são conduzidos *in vitro* com a adição de substratos proteicos em meio de cultura como a elastina e a queratina, principais proteínas encontradas na matrix celular da derme ou estrato córneo da pele, respectivamente (KAUFMAN et al., 2005). Abordagens empregando co-cultura do fungo em células de queratinócitos, que constituem as mais numerosas células da epiderme, também são utilizadas (KOMOTO et al., 2015).

1.3 ABORDAGENS MOLECULARES PARA AVALIAR A EXPRESSÃO DE GENES DE DERMATÓFITOS EM CONDIÇÕES DE CULTIVO *IN VITRO* QUE SIMULAM AS INFECÇÕES NA PELE

Na tentativa de melhor compreender a complexa relação fungo-hospedeiro se faz necessária a utilização de modelos apropriados de infecção *in vitro*, entre os quais estão descritos a utilização de queratinócitos do estrato córneo da pele, o uso de fragmentos de unhas, explantes de pele proveniente de cirurgia plástica, além dos modelos que consistem na adição de proteínas como colágeno, elastina e queratina em meio de cultura (VERMOUT et al., 2008). Esse último modelo é explorado pelo fato de fungos dermatófitos serem fungos queratinolíticos, que se adaptam ao crescimento na pele, unha e cabelos, devido a sua capacidade de utilizar diversas proteínas do hospedeiro (principalmente queratina) como fonte de nutriente.

A análise de genes diferencialmente expressos em dermatófitos na presença de substratos proteicos é corriqueiramente observada na literatura científica. O uso de bibliotecas subtrativas de cDNAs provenientes de populações de *T. rubrum* crescido em meio mínimo e meio contendo queratina foi realizado por Baeza et al. (2007) e identificou vários genes relacionados à transdução de sinal, proteína de membrana, resposta a estresse oxidativo e alguns fatores de virulência putativos. Abordagens similares também foram aplicadas para a identificação de novos genes especificamente expressos em *T. rubrum* em contato com queratina, em resposta a variação de pH ou estímulo ambiental (MARANHÃO; PAIÃO; MARTINEZ-ROSSI, 2007; SILVEIRA et al., 2010; PERES et al., 2010b).

Atualmente, a análise do transcriptoma usando os *microarranjos* também tem sido empregada para analisar a resposta de dermatófitos sobre condições que simulam a infecção na pele. Staib et al. (2010) comparou o perfil transcricional do dermatófito zoofílico *Arthroderma benhamiae* *in vitro* durante seu crescimento em meio de cultura de soja e queratina com o modelo de infecção *in vivo* utilizando como modelo o porquinho da índia. Os autores observaram indução do gene que codifica a Subtilisina 6, genes do ciclo de glioxilato e de um gene que codifica uma opsina durante a infecção *in vivo*. Trabalhos similares foram realizados com o dermatófito humano *T. rubrum* para analisar seu perfil transcricional durante o crescimento em queratina ou em fragmentos de pele (ZAUGG et al., 2009; LIU et al., 2014). Ressalta-se nos últimos trabalhos citados a significativa expressão de genes codificadores de proteases, além de genes envolvidos com vias de sinalização.

As proteases são consideradas fatores chave para o sucesso da infecção provocada por dermatófitos, pois além de serem fundamentais para a assimilação de nutrientes a partir das proteínas digeridas, existem indícios sobre seu papel na adesão ao hospedeiro (BALDO et al., 2012). Assim, a expressão gênica de diferentes proteases foi analisada por Kaufman et al.(2005) após o cultivo de *T. menatgrophytes* em elastina, queratina, plasma e também em fragmentos de pele. Semelhantemente, Chen et al.(2010) avaliaram a expressão de 12 endoproteases de *T. rubrum*, pertencentes à 2 famílias, Subtilisina (Sub 1-7) e Metaloproteinase (Mep 1-5), após o crescimento do fungo em meio mineral contendo diferentes fontes de queratina: unha ou pele, e compararam com a expressão durante o cultivo em meio RPMI 1640 como referência. Esse trabalho identificou 2 proteases fortemente induzidas por ambos meios contendo queratina (Mep2 e Sub 7), além de mostrar que a expressão de algumas proteases é dependente da fonte de queratina utilizada.

O conhecimento sobre genes envolvidos em processos de instalação e manutenção de virulência são importantes pois representam alvos moleculares potenciais para o desenvolvimento de novos compostos antifúngicos (SANGAMWAR; DESHPANDE; PEKAMWAR, 2008).

1.4 DROGAS ANTIFÚNGICAS COMERCIAIS

Até o início do século XX, os compostos acriflavina, violeta genciana e os ácidos benzóico, acetilsalicílico e undecanóico foram introduzidos na prática clínica como os primeiros antifúngicos orgânicos de uso tópico (MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI, 2008). A griseofulvina e o iodeto de potássio foram os primeiros fármacos a serem utilizados como antifúngicos sistêmicos para micoses superficiais (GRAYBILL, 2000). A partir de 1958, o composto antifúngico anfotericina B, desenvolvido pelo laboratório Squibb, passou a ser considerado padrão ouro para o tratamento sistêmico, esse polieno age sobre a membrana celular, se ligando ao ergosterol provocando poros na membrana com consequente alteração de permeabilidade da membrana. (DUTCHER, 1968). Cerca de 40 anos depois, devido a nefrotoxicidade apresentada por esse composto em associação com aos efeitos adversos relacionados à infusão, houve uma iniciativa para a busca de novos fármacos com menor toxicidade.

Os compostos azólicos, como o cetoconazol e o imidazol (imidazóis) e o fluconazol e o itraconazol (triazóis), foram desenvolvidos a partir de 1960 (LEWIS, 2011). Esses fármacos atuam sobre a enzima esterol-14- α -demetilase, interferindo na síntese de ergosterol na membrana plasmática e levando ao acúmulo de esteróis intermediários. Apesar do fluconazol apresentar vantagens com relação aos compostos anteriormente desenvolvidos, o aparecimento de linhagens resistentes e a baixa eficácia contra fungos oportunistas levou à necessidade por outras alternativas. Dessa forma, foram desenvolvidos uma nova geração de triazóis como o voriconazol (2002), posaconazol (2006) e ravuconazol (em estudo), considerados como a segunda geração de triazóis. No entanto, todos os novos triazóis apresentam absorção irregular, interações com outras drogas e casos de resistência cruzada (CHEN; SORRELL, 2007; GRAYBILL, 2000).

Além dos azóis, os compostos pertencentes à classe das alilaminas, naftatina e terbinafina, foram desenvolvidos a partir de 1985 através de extensa derivatização química com o objetivo de assegurar a eficácia e segurança na administração oral desses antifúngicos (RYDER; MIETH, 1992). As alilaminas apresentam seu modo ação através da inibição da enzima esqualeno epoxidase, uma enzima da via biossintética de ergosterol, cuja inibição resulta no acúmulo de esqualeno na membrana e diminuição de ergosterol produzido (GHANNOUM; RICE, 1999). A terbinafina é considerada a escolha

de preferência no tratamento das dermatofitoses, devido sua segurança, ausência de interação com outras drogas e rápido índice de cura (ELEWSKI; TAVAKKOL, 2005). Porém, recentemente, casos de resistência adquirida à esse composto vem sendo reportados (MUKHERJEE et al., 2003).

Há também os compostos pertencentes a classe das pirimidinas como flucitosina, que é um pró-fármaco, cujo antimetabólito produzido em fungos acarreta em prejuízos na síntese de RNA (BERGOLD, A. M, GEORGIADS, 2004). Esse fármaco é mais eficaz contra leveduras e deve ser administrado em conjunto com outros compostos a fim de evitar o surgimento de linhagens resistentes. Atuando sobre a síntese de ácidos nucleicos há também o antibiótico griseofulvina, que inibe a mitose em fungos e cujo uso é indicado apenas em infecções epidérmicas não invasivas (SANGAMWAR; DESHPANDE; PEKAMWAR, 2008; LEWIS, 2011).

O destaque para o final no século XX foi o desenvolvimento de compostos antifúngicos pertencentes à classe das equinocandinas, que consistem em lipopeptídeos sintéticos com eficácia para candidíase e aspergilose invasiva (LEWIS, 2011). O modo de ação desses fármacos está relacionado com a interrupção da síntese da parede celular através da inibição da enzima β -1,3 glucano sintase. Pertencentes à essa classe podem ser citados os compostos caspofungina (1º componente dessa classe a ser aprovado pelo FDA em 2001), anidulafungina (aprovada em 2006 pelo FDA) e micafungina.(aprovada em 2005 pelo FDA) (BERGOLD, A. M, GEORGIADS, 2004).

Dessa forma, o arsenal de antifúngicos permanece limitado, sendo representado principalmente pelas classes: polienos (anfotericina, nistatina), pirimidinas (flucitosina), alilaminas (terbinafina e a naftatina), azóis (imidazóis e triazóis) e equinocandinas (caspofungina, anidulafungina e micafungina) (VANDEPUTTE; FERRARI; COSTE, 2012; PIGATTO et al., 2009).

1.4.1 Mecanismo de ação das principais classes dos antifúngicos comerciais

Os antifúngicos atuais atuam sobre os seguintes alvos na célula fúngica: ergosterol e sua biossíntese, ácidos nucleicos e parede celular.

-Ergosterol

O ergosterol está presente na membrana plasmática de fungos e seu correspondente em mamíferos é o colesterol, sendo responsável pela fluidez da membrana

e permeabilidade (PARKS; SMITH; CROWLEY, 1995). Entre os compostos que atuam sobre esse alvo estão os polienos que agem diretamente sobre o ergosterol, promovendo ruptura da membrana, perda de constituintes celular e morte celular (WARNOCK, 1991), enquanto os compostos azólicos atuam sobre a biossíntese de ergosterol na enzima 14 alfa esterol demetilase, que converte lanosterol a ergosterol, essa ação resulta no acúmulo de esteróis intermediários que são tóxicos para a célula (VANDEPUTTE; FERRARI; COSTE, 2012). Há também as alilaminas que são inibidoras da enzima esqualeno epoxidase, com conseqüente decréscimo de ergosterol e aumento do conteúdo de esqualeno.

-Ácidos nucleicos

Compostos como a flucitosina agem seletivamente sobre enzimas fúngicas gerando 5-fluorouracil que promove erros na codificação de RNA. Além disso, o composto griseofulvina age sobre os microtubulos de fungos, interferindo na divisão celular (CAMPBELL; ANYANWU; MORAD, 2004).

-Parede celular

A parede celular tem se mostrado como um alvo antifúngico atrativo devido à sua ausência nas células de mamíferos, fazendo com que compostos que atuem sobre esse alvo apresentem baixa toxicidade em humanos (BUTTS; KRYSAN, 2012). Na célula fúngica, a parede celular desempenha importantes papéis como proteção à estresses ambientais e pressão osmótica, interação com o meio ambiente, além de apresentar caráter imunomodulador para as células de hospedeiros. Atualmente, a única classe de antifúngicos que atuam sobre esse alvo é representada por equinocandinas, porém pesquisadores da Merck desenvolveram recentemente um composto para administração oral que age sobre beta-1,3 glucana sintase (mesmo alvo das equinocandinas) (WALKER et al., 2011). Igualmente, inibidores de beta-1,6 glucana sintase e de proteínas de ligação glicosilfosfatidilinositol (GPI) tem sido ensaiados *in vitro* com resultados satisfatórios para *C. albicans* e *C. neoformans* (HATA et al., 2011; KITAMURA et al., 2009), respectivamente. Ademais, a ruptura da integridade da parede celular provocada por diferentes inibidores tem sido triada através de ensaio de adenilato kinase (AK), avaliando a cascata de sinalização celular envolvida com integridade de parede, a qual mantém-se altamente conservada em fungos (BUTTS; KRYSAN, 2012).

1.5 ANTIFÚNGICOS DE ORIGEM NATURAL (CHALCONAS)

É conhecido que compostos antifúngicos como equinocandinas e polienos tenham se derivado de produtos naturais, os quais representam a base para a maioria das terapias anti-infecciosas na clínica atual (BUTTS; KRYSAN, 2012). Dessa forma, paralelamente ao desenvolvimento de drogas sintéticas, atenção substancial tem sido focada em produtos naturais com atividade antifúngica, que tem estimulado a procura por novos agentes mais potentes e eficazes (NEGRI et al., 2014).

As chalconas (1,3-diaril-2-propen-1-onas) são obtidas biossinteticamente através da via do chiquimato, pertencendo a família dos flavonoides como precursores das cadeias de flavonoides e isoflavonas, sendo amplamente encontrados no reino vegetal (Figura 2) (RAHMAN, 2011).

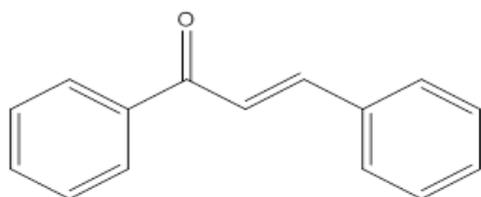


Figura 2: Estrutura da *trans*-chalcona

As chalconas tem despertado a atenção de diversos químicos orgânicos e médicos devido a variedade de atividade biológicas que elas apresentam, como demonstrado em Tabela 1. Entretanto, o grande potencial farmacêutico das chalconas ainda não é totalmente explorado e assim não são amplamente utilizadas.. (RAHMAN, 2011; BATOVSKA; TODOROVA, 2010).

Tabela 1 Mecanismos de ação e Atividades Biológicas promovidas pelas chalconas

Atividade biológica	Mecanismo de Ação	Referência
Antifúngica	Inibição de glucana sintase, quitina sintase	Łacka et al. (2011); Boeck et al. (2005)
Antifúngica	Inibição de FAS (ácido graxo sintase)	Liu et al. (2009); Brown et al.(2007)
Anti-hipercromia	Inibição de tirosinase	Zhang et al. (2009)
Inseticidas, Anti-hiperglicemiante	Inibição de alfa-amilases 1,4 glucano hidrolases	Najafian et al. (2010))
Anti-hiperuricemiante	Inibição de xantina oxidase	Niu et al., (2011)
Antitumoral	Inibição de metaloproteinases, VEGF, Indutoras de Bax	Pilatova et al. (2010)

Anti-inflamatória	Repressão de VEGF, CAM-1, STAT-3 e NF-KB	Lamoke et al.(2011);
Antitumoral	Intercalantes de DNA e inibição de topoisomerase,	Štefanišinová et al. (2011);
Anti-leishmania	Inibição de desidrogenases mitocondriais	Zhai et al.(1999)

No trabalho realizado por Bitencourt et al.(2013) foi realizada a triagem de vários produtos naturais contra o dermatófito *T. rubrum* (luteolina, quercetina, galangina, genisteína, ácido elágico e *trans*-chalcona). Dentre os compostos avaliados, a *trans*-chalcona foi a que apresentou mais potente atividade antifúngica com valor de CIM de 7,5µg/mL para a linhagem H6 e 1,9µg/mL para a linhagem mutante que possui um gene transportador ABC rompido $\Delta TruMDR2$ (FACHIN et al., 2006). Além disso, a *trans*-chalcona reduziu o conteúdo de ergosterol das duas linhagens (74,59 % para a linhagem H6 e 77,85% para mutante), impediu a regeneração de protoplastos e reprimiu o gene FAS1 (ácido graxo sintase) e o gene ERG6, envolvidos na síntese de ácido graxo e ergosterol, respectivamente. Os resultados obtidos demonstraram a potencial atividade antifúngica da *trans*-chalcona, pois este composto pareceu atuar em vários alvos na célula fúngica, interferindo na síntese de ácido graxo e ergosterol e causando consequentemente dano na membrana celular e parede celular.

Chayakulkeeree et al. (2007) demonstraram que os genes FAS1 e FAS2, responsáveis pela síntese de ácido graxo na célula fúngica, são indispensáveis para a sobrevivência de *C. neoformans*. Dado concluído após diversas tentativas de recombinação homóloga em mais de 100 transformantes, no qual não foi observado nenhum mutante nulo obtido. Além disso, no sentido de reforçar essa hipótese, foram desenvolvidos mutantes nulos para o fator de transcrição que regula a expressão de genes da FAS. Os mutantes nulos para esse fator de transcrição apresentaram maior susceptibilidade durante exposição à fluconazol e cerulenina, quando usados em sinergismo do que quanto submetidos à monoterapia, tiveram também seu crescimento reduzido em meio de cultura, além de apresentar atenuada virulência em modelos murinos. Ainda nesse sentido, estudo realizado por Knechtle et al.(2014) testando um composto natural (EV-086) inibidor da enzima delta-9-ácido graxo desaturase, envolvida com a instauração de ácidos graxos provenientes do complexo enzimático da FAS, mostrou amplo espectro de ação contra *Candida*, *Aspergillus* e *Trichophyton spp* e demonstrou eficiência na eliminação da infecção promovida por *T. mentagophytes* em porquinho da índia.

A sugerida atuação da chalcona sobre a FAS é de grande interesse, pois a FAS é uma enzima conservada entre os reinos e que apresenta diferenças estruturais entre células de fungos e mamíferos (ZHAO et al., 1996) Em fungos apresenta-se como 6 subunidades α e 6 subunidades β com uma forma molecular parecida com um grande barril unido a duas câmaras de acoplamento, cada uma contem três compartimentos de sítios ativos separados por uma grande distância através dos quais os substratos são ligados durante a reação de síntese do ácido graxo (JENNI et al., 2006). Em contraste, a FAS de mamíferos possui forma molecular em X com compartimentos de sítios ativos presentes em cada um das duas câmaras de acoplamento semi-circulares em ambos os lados da molécula. (MAIER, 2006). As diferenças estruturais são decorrentes da maneira que os domínios se arranjam nesse sistema enzimático multifuncional. A arquitetura da FAS fúngica e de mamíferos encontra-se representada na Figura 3.

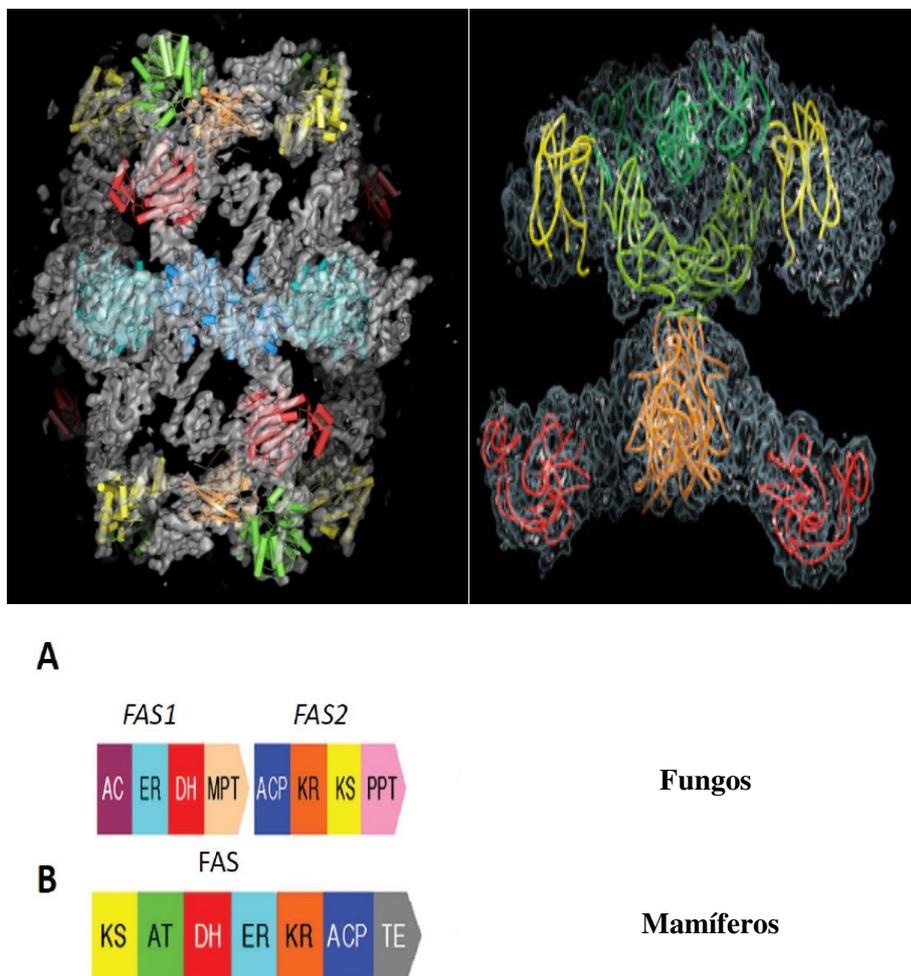


Figura 3: 1) Diferenças estruturais entre FAS de fungos (esquerda) e FAS de mamíferos (direita). (MAIER; JENNI; BAN, 2006; JENNI et al.,2006) 2) Sequência dos

domínios e organização do complexo da enzima ácido graxo sintase (FAS) de fungos (A) e de mamíferos (B) Fonte: Schweizer; Hofmann (2004)

A ácido graxo sintase (FAS) do tipo 1, encontrada no citoplasma de eucariotos, é uma multienzima que realiza vários ciclos interativos de diferentes reações. Os componentes enzimáticos do sistema de FAS são: acetil transferase (AC), malonil/acetiltransacilase ou malonil/palmitoiltransferase (AT, MPT), cetoacil sintase (KS), cetoacil redutase (KR), desidratase (DH), enoil redutase (ER), proteína carreadora de acila (ACP) e uma tioesterase (TE). A biossíntese de ácidos graxos se inicia com a enzima acetil transferase que realiza o carregamento de um iniciador acila, que costuma ser o acetil-COA, para um sítio de ligação no complexo da FAS para dar origem ao malonil, que através da transacilação gera malonato, que é posteriormente substrato para a elongação da cadeia acila através de 4 atividades enzimáticas: β Cetoacil sintase, P-Cetoacil redutase, desidratase, enoil redutase. No término do processo as enzimas palmitol transferase e o tioesterase atuam na elongação da cadeia de ácidos graxos. O papel de ligação dos substratos e comunicação de intermediários entre os vários centros catalíticos da FAS é exercido pelo grupo prostético 4-fosfopanteteína, cofator que se liga ao grupo específico de hidroxil-serina do domínio ACP. (SCHWEIZER; HOFMANN, 2004)

Abordagens utilizando microarranjos de cDNA para investigar modo de ação de inibidores da FAS (PHS 11A e PH 11B) contra o dermatófito *T. rubrum* foram realizadas e o estudo identificou a modulação de genes envolvidos no metabolismo de lipídios, ácidos graxos e ergosterol, vias de cAMP e MAPK e genes de resistência a múltiplas drogas (ZHANG et al., 2007; YU et al., 2007). Assim, o microarranjo de cDNA é um exemplo de uma boa ferramenta para obter uma visão global dos efeitos mediados pela inclusão de novos agentes antifúngicos (AGARWAL, 2003). Experimentos de perfil de expressão gênica revelaram respostas droga-específicas indicativas de outras vias que podem ser afetadas por estes agentes e respostas que podem refletir os potenciais mecanismos de resistência a estas drogas antifúngicas (LIU et al., 2005).

As chalconas apresentam uma variedade de atividades biológicas, e no que se refere à sua atividade antifúngica os indícios apontam que o composto pode atuar em diferentes alvos nas células fúngica, tais como membrana celular (síntese de ergosterol), parede celular (enzimas glucana sintase ou quitina sintase) e ainda sobre a FAS (síntese

de ácidos graxos). A atuação sobre múltiplos alvos torna esse composto ainda mais interessante, visto que esse caráter dificulta o surgimento de linhagens fúngicas resistentes. No entanto, não está claro se a atividade biológica observada sobre os diferentes alvos esteja correlacionada ou seja devido a algum efeito secundário provocado pelas chalconas.

II HIPÓTESE

A *trans*-chalcona exerce atividade antifúngica contra *T. rubrum* através da modulação da expressão de genes envolvidos com a síntese de ácidos graxos, ergosterol e de parede celular, de forma que o modo de ação desse composto possa ter relação direta ou indireta com esses alvos moleculares.

III OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil transcricional do dermatófito *T. rubrum* exposto à *trans*-chalcona utilizando substratos proteicos (queratina e elastina) e estudar a função de um gene envolvido com a resposta à *trans*-chalcona através da obtenção de uma linhagem de mutante nulo por rompimento gênico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Customizar lâmina de microarranjo para o dermatófito *T. rubrum* utilizando as sequências de ESTs depositadas em bancos de dados (ncbi e TrED) utilizando o programa e.Array da Agilent.

b) Cultivar o fungo na presença e ausência da *trans*-chalcona utilizando diferentes substratos proteicos (queratina ou elastina) para posterior extração de RNA.

c) Hibridizar as amostras de RNA nas diferentes condições com as lâminas de microarranjo de *T. rubrum*.

d) Análisar os dados por meio de programas de bioinformática com o intuito de traçar os perfis de transcriptoma e os genes específicos que são modulados em resposta a *trans*-chalcona e à infecção.

e) Validar alguns genes mais modulados em resposta a *trans*-chalcona e a infecção observados nos experimentos de microarranjo através da técnica de PCR quantitativo.

f) Desenvolver linhagens de mutantes nulos de genes envolvidos na resposta a droga *trans*-chalcona ou à infecção a fim de comprovar a sua funcionalidade.

IV MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LINHAGEM DE *T. rubrum*

Foi utilizada a linhagem CBS 118892 de *T. rubrum*, gentilmente cedida pela Profa Dra Nilce Maria Martinez-Rossi. Essa linhagem foi sequenciada e seus dados genômicos estão disponíveis no Banco do Genoma Comparativo de Dermatófitos, *Broad Institute* (MIT Harvard) (<http://www.broad.mit.edu/annotation/genome>). O cultivo da linhagem foi realizado em meio Sabouraud e incubação a 28°C por 15 dias (FACHIN; MAFFEI; MARTINEZ-ROSSI, 1996).

4.2 PRODUTOS COMERCIAIS

Foram utilizados os produtos elastina bovina e *trans*-chalcona adquiridos de Sigma Aldrich®. Enquanto que o antifúngico comercial terbinafina foi gentilmente cedido pela farmácia universitária Cidinha Bonini.

4.3 MEIOS DE CULTURA

4.3.1 Meio Sabouraud

Glicose	20g
Peptona	10g
Água Destilada (q.s.p)	1000 mL
Ágar: 1,5% (m/v)	
pH : 5,7	

O meio foi esterilizado por autoclavagem a 121°C por 15 min.

4.3.2 Meio RPMI -1640

RPMI 1640 (Sigma)	10,40 g
NaHCO ₃	1,2g
Hepes	2,38g
Água ultrapura (q.s.p.)	1000 mL
pH 7,2-7,4	

A esterilização ocorreu por filtração em membrana de náilon de 22 μm . Após a filtração, foi realizado um teste de esterilidade, em que foram incubados 2 ml do meio filtrado em estufa a 37° C por 24h. Após esse período, verificando-se ausência de turbidez, o meio foi estocado a 4°C.

4.3.3 Meio mínimo com sacarose (MMS) “Top Ágar” para a regeneração de protoplastos

Solução de sais	20 mL
Glicose	1% (m/v)
Sacarose	1 M
Ágar: 0,8%	0,8% (m/v)
Nitrato de sódio	70mM
pH: 6,8	
Água destilada (q.sp):	1000 mL

Esterilização ocorreu por autoclavagem a 121°C por 15min.

4.3.4 Meio mínimo com sacarose (MMS) “Bottom Ágar” para a regeneração de protoplastos

Solução de sais	20 mL
Glicose	1% (m/v)
Sacarose	0,2 M
Ágar	1,5 % (m/v)
Nitrato de sódio	10 mM
Caseína	0,02%
pH: 6,8	
Água destilada (q.s.p):	1000 mL

Esterilização ocorreu por autoclavagem a 121°C por 15 min.

4.3.5 Meio Mínimo com nitrato, glicose e caseína (MM) (COVE, 1966)

Solução de Sais	20 mL
Glicose	10,09 g
Caseína	2 g
Nitrato de sódio	0,058 g
pH: 5.0	
Água destilada (q.s.p)	1000 mL

Esterilização ocorreu por autoclavagem a 121°C por 15 min.

4.3.6 Meio Mínimo com diferentes fontes de Queratina/Elastina (MMQ/MME)

Solução de Sais	20 mL
Caseína	0,01%
Glicose	0,05%
Nitrato	0,0003%
pH: 5,0	
Água destilada q.s.p	1000 mL

O preparo de MMQ foi realizado com a adição de 0,5% de queratina bovina e para o meio MME foram adicionados 0,25% de elastina. Esterilização ocorreu por autoclavagem a 121°C por 15min.

4.4 SOLUÇÕES

4.4.1 - Solução de *trans*-chalcona (Sigma)

As soluções de *trans*-chalcona foram preparadas no momento do uso, em que 1mg/mL do composto foi dissolvido em 5 % de DMSO.

4.4.2 Solução do Antifúngico comercial terbinafina

Solução estoque de terbinafina foi preparada para uma concentração de 10 mg/mL em 100% de DMSO.

4.4.3 Solução de Sais (Cove, 1966)

Fosfato de potássio monofásico	76g
Cloreto de Potássio	26 g
Sulfato de Magnésio heptahidratado	26 g
Solução de Elementos traço	50 mL
Água destilada (q.s.p):	1000 mL

Esterilização ocorreu por autoclavagem a 121°C por 15 min a 1 atm.

4.4.4 Solução de Elementos Traço para Meio Mínimo (COVE, 1966)

Borato de sódio decahidratado	40 mg
Sulfato de cobre pentahidratado	400 mg
Sulfato de ferro heptahidratado	532 mg
Sulfato de manganês monohidratado	292 mg
Molibdato de sódio bihidratado	800 mg
Sulfato de zinco heptahidratado	8 mg
Água destilada (q.s.p):	1000 mL

Esterilização ocorreu por autoclavagem a 121°C por 15min.

4.4.5 Tampão de Extração de DNA

Tris-HCl 1M, pH (8,0)	5 mL
EDTA	1,86g
Cloreto de Sódio	4,09g
Solução CTAB	1g
2-mercaptoetanol	100 µL
Água destilada (q.s.p)	50mL

Os componentes da solução foram esterilizados por autoclavagem a 121°C por 15 min, com exceção do mercaptoetanol que foi adicionado no momento do uso.

4.4.6 Tampão de Lavagem da extração de DNA

Etanol 100%	38 mL
Acetato de amônio	0,0385g
Água ultrapura (q.s.p)	50 mL

4.4.7 Tampão de extração de proteína total para Western Blot

SDS	0,1% (p/v)
Triton X- 100	1% (v/v)
Tris-HCl ph 7,5	50 mM
NaCl	150 mM
EDTA	15 mM
Glicerol	10%
Complete-mini Merck®	1x

Os componentes do tampão de extração foram dissolvidos em água destilada e o volume foi ajustado. A esterilização ocorreu por autoclavagem a 121°C por 15min. No momento do uso foram adicionados o coquetel de inibidores enzimáticos (Complete-mini Roche®) e 200mM de solução etanólica de PMSF.

4.4.8 Soluções para Quantificação de Proteínas Totais para uso em “Western Blot”

-SOLUÇÃO A

Tartarato de sódio e potássio	2g*
Carbonato de sódio	100 g
Hidróxido de sódio 1N	500 mL
Água destilada (q.s.p)	1000 mL
*2,7 g se tetrahidratado	

- SOLUÇÃO B

Tartarato de sódio e potássio	2g
Sulfato de cobre pentahidratado	1g
Hidróxido de sódio 1N	10 mL
Água destilada (q.s.p)	100 mL

4.4.9 Tampão para eletroforese de proteína 5x concentrada para ensaio de Western Blot

Tris base	125 mM
Glicina	95 mM
SDS	0,1% (p/v)
Água ultrapura (q.s.p)	

O Tris base e a glicina foram dissolvidos em água ultrapura. A solução foi armazenada a 4-8°C. No momento do uso, a solução foi diluída para a concentração de 1x a ser utilizada na eletroforese.

4.4.10 Tampão de transferência para gel SDS page para ensaio de “Western Blot”

Tris base	25 mM
Glicina	192 mM
Metanol	20% (v/v)
SDS	0,1% (p/v)
Água ultrapura (q.s.p)	

O Tris base e a glicina foram dissolvidos em água ultrapura. A solução foi preparada fresca no momento do uso.

4.4.11 Tampão TBS 10x para ensaio de “Western Blot”

NaCl	1,5 M
Tris base	2 M
Água ultrapura (q.s.p)	

A solução foi armazenada a 4-8°C.

4.4.12 Tampão TBST 1x para ensaio de “Western Blot”

TBS	10x
Tween 20	0,05%
Água ultrapura (q.s.p.)	

A solução foi preparada no momento do uso.

4.4.13 Solução Corante *Coomassie Blue* para ensaio de “Western Blot”

Coomassie Brilliant Blue	0,25% (p/v)
Ácido Acético Glacial	30% (v/v)
Metanol	50% (v/v)
Água ultrapura (q.s.p)	

4.4.14 Solução Descorante de *Coomassie Blue* para ensaio de “Western Blot”

Ácido acético glacial	10% (v/v)
Etanol	30% (v/v)
Água ultrapura (q.s.p)	

4.4.15 Tampão de amostra para eletroforese de proteínas 5x para ensaio de “Western Blot”

Tris-HCl	0,625 M
SDS	10% (p/v)
Glicerol	10% (v/v)
Azul de bromofenol	0,1% (p/v)
DTT	1 mol/L
Água ultrapura (q.s.p.)	

Os componentes foram dissolvidos em água ultrapura e para uso o tampão foi diluído de forma que ficasse 1x na amostra. No momento do uso foi adicionado 2 mM de e mantida à -20 °C.

4.4.16 Gel de poliacrilamida – empilhamento 1,2% para ensaio de Western Blot

Tris-HCl pH 6,8	125 mM
SDS	0,1% (p/v)
Acrilamida:bisacrilamida (0,8:30)	5% (v/v)
TEMED	0,15% (v/v)
Persulfato de amônia	0,1% (v/v)
Água ultrapura (q.s.p)	

Após a dissolução dos reagentes, houve a adição de 0,15% (v/v) de TEMED e 0,1% (v/v) de persulfato de amônia para polimerização e, em seguida, a solução foi aplicada no suporte. Aguardou-se a polimerização do gel por no mínimo 30 min.

4.4.17 Gel de poliacrilamida – corrida para ensaio de Western Blot

Tris-HCl pH 8,0	375 mM
Acrilamida:bisacrilamida (0,8:30)	10% (v/v)
TEMED	0,1% (v/v)
Persulfato de amônia	0,1% (v/v)
Água ultrapura (q.s.p)	

Após a dissolução dos reagentes houve a adição de 0,15% (v/v) de TEMED e 0,1% (v/v) de persulfato de amônia. A solução foi aplicada no suporte e aguardou-se a polimerização do gel por no mínimo 30 min.

4.4.18 Solução Lítica para obtenção de Protoplastos

KCl	0,7M
MgSO ₄	1 M
pH 6,8	

Esterilizado por autoclavagem, 15 min a 121°C, 1atm.

No momento do uso 20mg/mL de “lisoenzymes”(Sigma- Aldrich®) foram adicionadas.

4.4.19 Solução CT para Transformação de Protoplastos

Sulfato de amônio	0,4M
Sacarose	1% (m/v)
Ácido cítrico	0,05M
	pH 6,0

4.4.20 Solução DT para Transformação de Protoplastos

KCl	0,6M
CaCl ₂	0,1M
Tris-HCl	0,01M
	pH 7,5

4.4.21 Solução ET para Transformação de Protoplastos

KCl	0,6 M
CaCl ₂	0,1 M
Tris-HCl (pH 7,5)	0,01 M
PEG 8000	25% (m/v)

As soluções CT e DT foram esterilizadas por autoclavagem a 121°C por 15 min e a solução ET foi esterilizada por filtração.

4.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)

O ensaio foi realizado de acordo com o “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI, 2002), protocolo M-38-A.. A solução de conídios foi preparada a partir de uma placa de fungo crescida por 15 dias, o micélio foi removido com o auxílio de uma espátula estéril e colocado em solução salina 0,9% a fim de promover a desagregação dos conídios. Essa solução foi agitada vigorosamente e, posteriormente, foi filtrada em funil com lã de vidro. O filtrado foi transferido para um tubo estéril, e sua transmitância foi determinada em aparelho espectrofotômetro e ajustada para uma faixa de 70-72%, em um comprimento de onda de 530 nm. Essa suspensão foi diluída 1:50 em meio RPMI. Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos compostos *trans*-chalcona e terbinafina foi feita a microdiluição seriada em placas de 96 poços fundo em “U” em meio RPMI, partindo de uma concentração de 1000 µg/mL à 0,0019 µg/mL. Após a microdiluição, foi adicionada a suspensão de conídeos previamente preparada. A microplaca foi incubada por 7 dias a 28°C, e decorrido o período de incubação foi determinada a menor concentração em que não se observava crescimento macroscópico do fungo através da observação da turvação do meio. Esse experimento foi realizado em triplicata, em três experimentos independentes. Controles de crescimento do fungo e de esterilidade foram incluídos no ensaio. Como controle positivo foi utilizado o antifúngico comercial terbinafina. Foi avaliada também a influência do solvente DMSO sobre o crescimento do fungo, que foi utilizado na concentração máxima de 2,5%.

Para determinar a concentração fungicida mínima (CFM), alíquotas de 100 µl de meio de cultura relativo à concentração inibitória e de duas concentrações acima da CIM, bem como o controle de crescimento do fungo, foram inoculadas em triplicata em placas de meio Sabouraud sem drogas, e foram incubados por 7 dias a 28 °C. Após a incubação, as placas foram visualizadas para observação do crescimento de colônias do fungo. A CFM foi considerada como a menor concentração dos compostos estudados (*trans*-chalcona e terbinafina) que não permitiu o desenvolvimento do fungo na superfície do meio de cultivo após incubação.

4.6 CONDIÇÕES DE CULTIVO DE *T. rubrum* EXPOSTO A *TRANS*-CHALCONA UTILIZANDO SUBSTRATOS PROTEICOS (QUERATINA E ELASTINA)

Soluções de conídios foram preparadas a partir de placas de *T. rubrum* CBS118892 crescidas por 15 dias. As soluções previamente preparadas foram filtradas em sistema de filtração com funil e lâ de vidro estéreis e sua concentração foi determinada em hematímetro. Posteriormente, a concentração foi ajustada para $1,6 \cdot 10^6$ conídios/mL e 1mL desta solução foi adicionada em 20 mL de meio Sabouraud e incubada por 3 dias com agitação de 150 rpm a 28°C. Após esse período, os micélios foram filtrados e transferidos para em frascos erlenmeyer de 300 mL contendo 100 mL de meio mínimo (Cove's) pH 5.0, como apresentado na Figura 4:

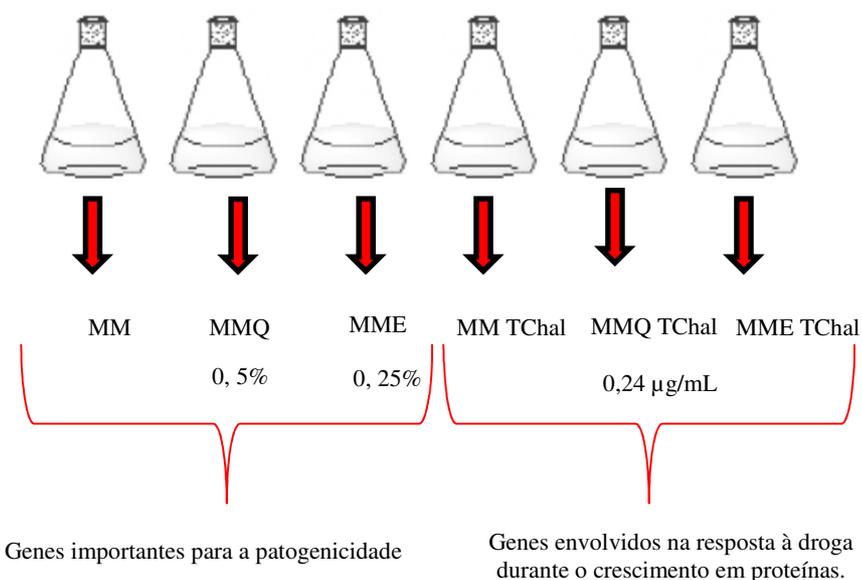


Figura 4 Esquema das condições de cultivo avaliadas nesse estudo.

O fungo foi cultivado em triplicata nas 6 diferentes condições descritas acima por 3, 7 e 14 dias a 28°C com agitação de 130 rpm. O micélio resultante de cada situação foi armazenado a -80C até a extração de RNA.

4.7 – EXTRAÇÃO DE RNA

A extração de RNA foi feita com o *kit illustra RNAspin Mini RNA Isolation* (GE Healthcare®), seguindo as recomendações do fabricante. Aproximadamente, 30 mg do micélio foram triturados em nitrogênio líquido. Em seguida, foram adicionados 350 µL do tampão RA1 e 3,5 µL de β- mercaptoetanol (Serva Electrophoresis®) e a mistura foi submetida a uma agitação vigorosa. O material foi aplicado em uma coluna que foi centrifugada por 1 min a 11000 g. Esse filtrado foi transferido para um novo microtubo

de 1,5 mL em que foi adicionado 350 µL de etanol 70% e submetido a uma nova agitação vigorosa por 2x de 5 s, logo após, houve sua transferência para uma nova coluna e centrifugou-se por 30 s a 8000 g, todo o líquido presente no tubo coletor foi descartado. Foram adicionados 350 µL de tampão de dessalinização à coluna e centrifugado por 1 min a 11000 g. Foi adicionada DNase e incubou-se em temperatura ambiente por 15 min. Foram, então, feitas as lavagens com os tampões de lavagem fornecidos pelo kit e novas centrifugações a 11000 g por 2 min. A eluição foi feita com 40 µL de água RNase-free” e centrifugação à 11000 g por 1 min.

4.7.1 Análise das amostras de RNA

A integridade das amostras de RNA foi avaliada pela nota de RIN (RNA Integrity Number) obtidas após análise de qualidade em aparelho Bioanalyser Agilent 2100 . A partir da interface do software havia a possibilidade de uso de dois algoritmos de análise, o que avalia a integridade para eucariotos -mamíferos e para eucariotos- plantas, os dois algoritmos foram testados e o algoritmo de plantas foi o escolhido. A concentração das amostras foi determinada em aparelho nanofotômetro (IMPLEN)

4.8 CUSTOMIZAÇÃO DAS LÂMINAS

A customização das lâminas foi feita com o auxílio da ferramenta *e-array* (Agilent). Para essa finalidade contamos com a colaboração do prof. Dr. Iran Malavazi – UFSCar. A escolha dos clones foi feita através da criação de um arquivo fasta a partir dos 47885 clones depositados no banco de dados do ncbi. O próprio programa *e-array* eliminou sequências de baixa qualidade.

4.9 MARCAÇÃO DAS AMOSTRAS DE RNA

A marcação dos RNAs foi feita com o kit *LowInput Quick Amp Labeling* (Agilent Technologies) *one color* seguindo as recomendações do fabricante, descritas abaixo.

1ª Etapa : Preparação das Amostras de RNA

Os RNAs dos 3 tempos de incubação (3 dias, 7 dias e 14 dias) de cada situação analisada (MM, MMQ, MME, MMTChal, MMQTChal, MMETChal) foram reunidos para resultar em uma concentração de 75 ng de RNA (25 ng de cada tempo) em um volume final de 3 μ L.

2ª Etapa: Preparação do Controle de Marcação (*spike*)

O *spike* foi descongelado em gelo e submetido a uma breve agitação e, em seguida, o *spike* foi incubado a 37°C por 5 min. A seguir o *spike* foi diluído, teve por base a concentração da amostra de RNA utilizada e por isso foi diluído até a 4ª diluição, que é uma diluição apropriada para concentrações de RNA próximas 100 ng.

Diluições	Razão
1ª	1:20
2ª	1:25
3ª	1:10
4ª	1:20

*Todas as diluições foram feitas para um volume final de 40 μ L., com exceção da 2ª diluição que foi feita para 50 μ L. A cada diluição, foi realizado uma homogeneização por pipetagem.

Finalizando as diluições, o microtubo referente à 4ª diluição foi brevemente centrifugado e 2 μ L desta diluição foi adicionada aos 3 μ L de RNA previamente preparado de cada situação de estudo.

3ª Etapa: Preparação da Reação de Marcação

A preparação das reações de marcação foi feita adicionando-se 0,8 μ l do “primer” T7 ao microtubo de *spike* + RNA, seguido de desnaturação a 65°C por 10 min. Ao final da desnaturação, as amostras foram imediatamente colocadas no gelo e incubadas por 5 min. Neste momento, o tampão “5x Strand Buffer” foi previamente aquecido a 80°C por 3-4 min. Após seu aquecimento, este tampão foi centrifugado e mantido à temperatura ambiente.

- Preparação da Reação de cDNA:

Componentes	Volume (µL) por reação
Amostra (RNA+ <i>spike</i> +T7)	5,8
5x First Strand Buffer	2
0,1 M DTT	1
10 mM dNTP mix	0,5
Affinity Script Rnase Block Mix	1,2
Volume Final	4,7

Logo após sua preparação foi feita uma homogeneização por pipetagem, seguida de incubação a 40°C por 2h.

-Inativação das enzimas

A inativação das enzimas foi realizada por aquecimento a 65°C por 15 min, após o aquecimento as amostras foram coladas em gelo por 5 min, e ao término destes períodos de incubação, as amostras foram brevemente centrifugadas.

- Reação de Transcrição (cRNA)

Componentes	Volume (µL) por reação
Água Nuclease Free	0,75
5x Tampão de Transcrição	3,2
0,1 M DTT	0,6
NTP mix	1
T7 RNA polimerase blend	0,21
Cianina 3-CTP	0,24
Volume Total	6

Foram adicionados 6 µL da reação de transcrição em cada tubo de amostra e a homogeneização foi feita gentilmente por pipetagem. Prosseguiu-se com uma nova incubação a 42°C por 2 h. A partir do momento de uso da cianina, todos os passos subsequentes foram realizados no escuro.

4ª Etapa: Purificação do RNA Amplificado e Marcado

Este procedimento foi realizado utilizando o Kit Illustra (GE Healthcare).

Iniciou-se com a lavagem das amostras com o tampão RA1, para cada volume de amostra foi utilizado 3,5 volumes de tampão, no mesmo microtubo foi acrescentado etanol absoluto, em igual proporção ao RA1. O volume total correspondente ao volume da

amostra+tampão RA1+etanol absoluto foi transferido para uma coluna de afinidade ao RNA de coloração azul fornecida pelo kit Illustra e centrifugou-se a 8000 g por 30 seg, após a centrifugação o tubo coletor foi descartado e foi adicionado 600 µL do tampão RA3 e prosseguiu-se com uma centrifugação à 11000g por 1 min, neste momento o líquido eluído foi descartado e foi adicionado 250 µL de RA3, seguido de uma centrifugação a 11000g por 3 min. Finalizando o tubo coletor foi descartado e a amostra purificada foi eluída com 40 µL de água ultrapura tratada com DEPC em uma centrifugação de 11000g por 1 min.

5ª Etapa: Quantificação do cRNA

A quantificação foi feita espectroscopicamente em aparelho nanoDrop (MD 1000), sendo quantificados a concentração do corante (pmol/µL), a razão de absorvância do RNA (A260/A280) e a concentração do cRNA (ng/µL). Os cálculos feitos a partir dos valores acima mensurados e referem-se a qualidade e eficiência da marcação. Foram feitos da seguinte forma:

Concentração total de cRNA: $\text{ng} / \mu\text{L} \times 40 \mu\text{L} / 1000 \mu\text{L}$

$\text{Cy3} \times 40 = \text{pmol}$

Atividade específica: $[\text{Cy3}] / [\text{cRNA}]$

Os parâmetros para uma marcação eficiente e de qualidade são concentração > 1,65 µg de cRNA e atividade específica >9.

- Preparação do 10x Blocking Agent

O Blocking Agent foi ressuspendido em 500 µL de água de nuclease- free, homogeneizado por agitação ou por pipetagem, seguido de uma centrifugação breve por 5-10 seg.

- 6ª Etapa: Hibridização das Amostras de cRNA marcado

Foram adicionados os componentes como detalhado abaixo:

Componentes	Volume (μL)/Massa μg
cRNA amplificado e marcado com Cy3	1,65 μg
10x Blocking Agent	11
Água livre de nuclease	Qsp 52,8
25x Tampão de Fragmentação	2,2
Volume Total	55 μL

Os componentes da reação foram homogeneizados gentilmente por pipetagem e em seguida incubados por 30 min a 60°C a fim de se promover a fragmentação do RNA. Decorridos os 30 min, as amostras foram colocadas imediatamente no gelo e mantiveram-se em gelo por 1 min, e logo após foram adicionados 55 μL do reagente 2xGEX Hybridization Buffer HI-RPM e após ser adicionado, a homogeneização foi feita cuidadosamente para evitar a formação de bolhas e o microtubo foi mantido em gelo, centrifugou-se 13000 rpm por 1 min e foi feita a aplicação de 100 μL da reação final de marcação na lâmina de vedação e esta foi acoplada a lâmina com *arrays* e levadas a forno de hibridização (Shel Lab) a 65 °C, 10 rpm por 17 h.

4.10 LAVAGEM DAS LÂMINAS

O desacoplamento entre a lâmina com os *arrays* e da lâmina de vedação foi realizado sob imersão no Tampão de Lavagem “Wash” 1 (Agilent Technologies), a temperatura ambiente. Em seguida foram feitas as lavagens da seguinte forma:

1ª lavagem: Tampão de Lavagem “Wash” 1 (Agilent technologies) a temperatura ambiente por 1 min.

2ª lavagem: Tampão de Lavagem “Wash” 2 (Agilent Technologies) a 40° C por 1 min.

3ª lavagem: Acetonitrila a temperatura ambiente por 10 seg.

4ª lavagem: Estabilização e Tampão de Secagem a temperatura ambiente por 30 seg.

4.11 AQUISIÇÃO DAS IMAGENS

O escaneamento das lâminas foi realizado no laboratório de Imunogenética Molecular do Departamento de Genética da FMRP do prof. Dr. Geraldo Aleixo Passos Jr., em scanner (G2565CA - Agilent). O software Feature Extraction (Agilent) foi utilizado para a extração dos dados e para análise inicial das imagens.

4.12 ANÁLISE DOS DADOS DE MICROARRANJO DE *T. rubrum* EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO

A análise dos dados foi feita utilizando software Gene Spring 12.6 (Agilent), as correções de normalização foram realizadas com o algoritmo *quantile*. A identificação dos genes diferencialmente expressos foi feita através de uma comparação aos pares entre 2 grupos de condição (MM x MMQ; MM x MME; MM x MMTChal; MMQ x MMQTChal e MME x MMETChal), através do Moderated T-Test com corte de 0,05 e com um *fold change* de 5. O “*q*” value determinado foi assymptótico e o fator de correção múltiplo utilizado foi o de Benjamini e Hochberg. Com relação a comparação entre elastina *versus* elastina + *trans*-chalcona optou-se em empregar o fator de correção *Storey with Bootstrapping* e aplicar um *fold change* de 2, devido às menores diferenças entre as modulações apresentadas entre essas condições.

4.13 ANOTAÇÃO FUNCIONAL DOS GENES MODULADOS

A anotação funcional dos genes foi realizada por um dos membros do nosso grupo de pesquisa, o doutorando Matheus Elloy Franco. A partir da listagem das PROBES moduladas utilizou-se o programa Local Blast com *e-Value* $\leq 1e-5$ para mapear-se as mesmas com os transcritos de *T. rubrum* CBS 118892 resultantes do projeto Comparativo de *Dermatophyte Comparative Database – Broad Institute*. Com intuito de obter-se mais informações além das anotações com o Blast dos transcritos relacionados, utilizou-se o programa BLAST2GO, buscando-se assim por informações como assinaturas proteicas similares (InterProScan) (ZDOBNV; APWEILER, 2001), termos do *Gene Ontology* (ASHBURNER; BALL; BLAKE, 2000), *Enzime Code* – busca do código da enzima e KEGG - *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* – visualização dos mapas metabólicos onde os genes e/ou seus produtos atuam (KANEHISA; GOTO, 2000).

4.14 CATEGORIZAÇÃO E ENRIQUECIMENTO FUNCIONAL DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS

Após o mapeamento dos genes, foi realizada a categorização funcional dos genes mapeados diferencialmente expressos de acordo com *Gene Ontology*, utilizando a

ferramenta *Blast2GO*. Como vários termos estão associados a um único gene, utilizou-se a ferramenta BayGO, para estimar as categorias super-representadas em cada uma das condições analisadas (VÊNCIO et al., 2006). Utilizou-se a ferramenta Revigo (SUPEK et al., 2011) para sumarização dos termos resultantes.

4.15 ENSAIO DE RT-QPCR PARA VALIDAÇÃO DOS DADOS DE MICROARRANJO DE *T. rubrum* (MICÉLIO)

O qPCR foi realizado para validar os dados de expressão gênica gerados pela técnica de microarranjo. As preparações de cDNA foram realizadas seguindo as recomendações do fabricante, utilizando o *Kit RevertAID H Minus First Strand cDNA Synthesis* (Fermentas®). O desenho dos “primers” foi realizado através ferramenta idtDNA “primer quest” (<http://www.idtdna.com/primerquest/Home/Index>) em que optou-se pelo desenho de “primers” para qPCR para corante intercalante. Os “primers” gerados foram analisados pela ferramenta Oligoanalyser 3.1 (<http://www.idtdna.com/analyser/applications/oligoanalyser>), além de serem submetidos a alinhamento com as sequências depositadas no banco de dados ncbi, utilizando o pacote de ferramenta blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Tabela 2).

Tabela 2 Genes selecionados para as reações de RT-qPCR

<i>Gene name</i>	Anotação	Sequências	Pbs
EL786005.1	Ácido graxo sintase s-acetil-transferase (AC)	Fwd: 5'-ATGCGCCATGTTCTGTCTCA-3' Rev: 5'- TGGTGAAGCGAACAACGAGA-3'	133
FE526383.1	Subtilisina 5 (Sub5)	Fwd: 5'- GCCTTTCGCGTCTCTCTAAC-3' Rev: 5'- CTACACCCGAGTCAACAACATAG-3'	99
EL792362.1	Subtilisin 3 (Sub3)	Fwd: 5'- AGGTTAGTCCTGAAGCCCTCT-3' Rev: 5'- GCGGTCGTGCTCTACATAGT-3'	105
EL787265.1	Extracelular metalloproteinase (Mep 2)	Fwd: 5'- GGCACAAGACCAAGAGACCC-3' Rev: 5'- AGGCTTGTTGTCCGAGTCAG -3	145
GW403478.1	Beta-glucana glucosidase	Fwd: 5'- CTCAATGTAGCGGCGGGTAT-3' Rev: 5'- CACAAAGACTCGGACCCCAA-3'	114
AJ883745.1	Aminopeptidase leucina (LAP1)	Fwd: 5'- TCCAGGCTGCCATCAATAC-3' Rev: 5'- GAATAGTGGCAATGATGCTGTG-3'	99
DW706159.1	Quitina sintase c	Fwd: 5'-TTGCCGGTCTAGGTGTTTAC-3' Rev: 5'-CATGCCTATCTGGGTGGTATATT-3'	101
EL790881.1	Glutamato quinase	Fwd: 5'-ATCCTGATGCTCGGGTTATTG-3' Rev: 5'-CCACTATCTTTGAGCCCATAACC-3'	111

AJ882210.1	Extracelular metaloproteinase (Mep4)	Fwd: 5'-GCATGGACTTATGCTTGC GG-3' Rev: 5'-TGGATATCTGGGGAAGGCGA	131
FE525325.1	Metil-citrato sintase	Fwd 5'- GAGGCTATGTTCTGGCTTCTATT-3' Rev 5'-AGGTCGAGGATGTGCTTTG-3'	113
EB801458.1	Carnitina acetil transferase	Fwd: 5'- CCGGTCTCCTCCAATGATGG-3' Rev: 5' CTCTCGACCTTACGTGGTGG-3'	147
EL785789.1	Dipeptidyl Peptidase (DPP4)	F: 5'- GGTTGATGGAGGAAAGGAGATT-3' R: 5'- GTCGAGTGGTGCTGTGATATT-3'	125
DW685297.1	Farnesyl transferase	F:5'-AGGCGTTTACCTTGATCGATAG-3' R:5'-GCCATCTCCAACCTACACCATTA-3'	91
DW686980.1	Transportador Cooper	F: 5'- CTCACGGCCAAAGCTATCA-3' R:5'- TGATCCAGGCGGTGATATTG-3'	105
DW691959.1	Acyl oxidase	F:5'- TGAGAGAGGCCAGTCCAATA-3' R:5'- TGCTGAATGAGGGAAAGGATAC-3'	102
EL790259.1	Phospholipase a2	F: 5'- GCCACGAGGATACGACTTTAT-3' R:5'- ATCAACCTTCTTGCGGTAGTC-3'	106
EL793581.1	Indoleamine-dioxygenase	F:5'- CTGCAGCGTATGCCAATAAAG-3' R:5'- GAGCAGTGAGATCAGGTAACCTC-3'	103
AF291822.2	<i>TruMDR2</i>	F: 5'- GCACTGATCTGCAGCTCGACC-3' R:5' CCAACGTCATCCTCCCAGAC-3'	91
TERG_00832	CMGC/MAPK protein kinase (Erk1)	F: 5'- CTTGAAGCCCGGTAACCTATT-3' R: 5'- CGGTCATATATCCAGCGTTCTC -3'	113
10371186	*Beta-tubulina	F: 5'- AACATGATGGCTGCCACTGA-3' R: 5' - AAGATGGCAGAGCAGGTAAGGT-3'	253

*Primer baseado em Jacob et al (2011)

Nas reações de PCR em tempo real foi utilizado o *KIT Sybr Green JumpStart Taq ReadyMix* (Sigma Aldrich ®) em condições recomendadas pelo fabricante. Em todas as reações foi utilizado o corante ROX para normalizar o sinal de fluorescência.

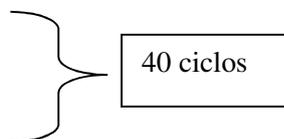
A programação de ciclagem em termociclador foi:

1° ciclo: 94°C – 2 min;

2° ciclo: 94°C – 15 seg;

3° ciclo: 60°C – 1min;

4° ciclo: 72°C – 30 seg;



5° ciclo: curva de dissociação: 95°C – 1 min; 55°C – 30 seg e 95°C – 30 seg, sendo que durante o aumento da temperatura a fluorescência é medida a cada 0,5°C.

4.15.1 – Reação para verificação da eficiência dos “primers”:

Para verificar a eficiência dos “primers” foi utilizado o DNA extraído da linhagem CBS da seguinte forma: cerca de 150 mg de micélio foi pulverizado em nitrogênio líquido

e colocado em um microtubo de 1,5 mL. Em seguida, adicionou-se 1 mL de tampão de extração ao micélio pulverizado e esse foi agitado suavemente, e em sequência, o microtubo foi incubado a 65°C por 30 min. Ao fim do período de incubação, o microtubo foi removido do banho e esfriado em temperatura ambiente. Logo após, foram adicionados 200 µL de clorofil (25:24:1) e o microtubo foi centrifugado por 2 min a 12500 g. Houve a formação de fases, e a fase superior foi transferida para um novo microtubo e a extração com 500 µL de clorofil foi repetida. A fase superior foi, novamente, transferida para um novo microtubo e o DNA foi precipitado com 600 µL de isopropanol gelado por 10 min. Após a precipitação, o sedimentado foi ressuspensionado com 1 mL de tampão de lavagem, e mantido a temperatura ambiente por 20 min. Finalizando a extração, foi feita uma centrifugação a 12000 g por 5 min, o sobrenadante foi descartado e o tubo foi invertido sobre papel e mantido por cerca de 1 h para secar. Em seguida, foram adicionados 100 µL de água ultrapura esterilizada para ressuspender o precipitado e 2 µL de RNase (10 mg/mL) foi adicionado e procedeu-se uma incubação a 37°C por 3 horas. O DNA extraído foi quantificado espectroscopicamente em aparelho Nanofotômetro (Implen®). Para fazer o PCRq no modo comparativo, os “primers” devem apresentar uma eficiência de amplificação em uma faixa de 90-110%, de modo que, os “primers” usados foram testados em uma faixa de concentração de 20 nM a 150 nM usando o DNA previamente extraído em 4 diferentes concentrações: 300 ng/µL, 150 ng/µL, 75 ng/µL e 37,5 ng/ µL. A curva padrão gerada foi analisada e todos os “primers” tiveram sua eficiência ajustada.

4.15.2 Quantificação Relativa

Após padronização da concentração dos *primers*, as reações de PCR em tempo real foram feitas para todos os genes descritos na Tabela 2. Genes modulados durante o crescimento em queratina ou elastina (condições denominadas de “unknown”) foram comparados com a situação controle, portanto “calibrador” do método de quantificação relativa. Enquanto que, para as condições com *trans*-chalcona (MMTChal, MMQTChal e MMETChal) a calibração foi efetuada com as respectivas condições na ausência de *trans*-chalcona (MM, MMQ, MME). Em cada reação de PCR, foi utilizado o gene beta tubulina como “normalizador”, e todas as reações foram feitas em triplicata, bem como foi incluído um branco para cada gene analisado, ao qual denominou-se “NTC” (Non-Template- Control). Os experimentos foram feitos em aparelho Mx3300 QPCR

(Stratagene®) , de forma que os cálculos de quantificação relativa foram gerados automaticamente através do módulo: “Comparative Quantification”, utilizando a equação de quantificação de delta Ct.

Equação de Quantificação Relativa: $2^{-\Delta\Delta Ct}$

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{goi} - Ct_{norm})_{unknown} - (Ct_{GOI} - Ct_{norm})_{calibrador}$$

4.16 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E WESTERN BLOT

Todo o procedimento referente ao ensaio de Western Blot foi realizado no laboratório do prof. Dr. Iran Malavazi , departamento de genética e evolução –UFSCAR, contando com o auxílio da doutoranda Marina Rocha. A partir de placas de fungo crescidas por 15 dias, foi preparada uma solução de conídios em concentração de 10^7 conídios/mL, 1mL dessa solução foi inoculada em 20mL de meio Sabouraud e incubado a 28°C a 130rpm por 3 dias em frascos erlenmeyer de 125mL, em seguida, o micélio resultante foi filtrado e transferido para 100mL de Meio Mínimo e Meio Mínimo + *trans*-chalcona 0,24µg/mL e incubado a 28°C a 130rpm por 1h, 1dia e 3 dias em frascos erlenmeyer de 300 mL. Ao término de cada período de incubação, o micélio foi recuperado e armazenado a -80°C até o momento do uso. Previamente à extração de proteínas, os micélios foram liofilizados. A ruptura da parede celular foi realizada através de pulverização em nitrogênio líquido. O extrato proteico total foi extraído com 500 µL tampão de extração de proteína, adicionado de inibidores de protease (descritos no item:4.4.7) e submetidos a agitação vigorosa e acondicionamento em gelo para minimizar a degradação. As amostras foram centrifugadas a 20000 g por 1 hora a 4 °C. O sobrenadante de cada amostra foi congelado e estocado a -80 °C. A integridade da proteína foi verificada através de eletroforese em gel SDS-PAGE 12% e quantificada pelo método colorimétrico de Lowry modificado por Hartree (HARTREE, 1972). Além disso, semelhante condição de cultivo foi utilizada para a extração de RNA (item 4.7) e para análise comparativa de expressão (item 4.15) do gene CMGC/MAPK Erk1 (TERG_00832).

Os extratos brutos proteicos referentes a cada experimento foram submetidos a eletroforese de gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), 12% e tampão Tris-glicina 1x

(Método de Laemmli), utilizando-se uma cuba de eletroforese vertical (BioRad). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF (BioRad) em modo de transferência submersa de acordo com o protocolo do fabricante. O bloqueio das membranas de PVDF foi feito com TBST 1x contendo 9% de leite em pó desnatado, por 4 h a temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário na diluição de 1:1000 em TBST 1x contendo 5% de BSA, por 16 horas a 4 °C. O anticorpo primário (MAPK p44/42 -9101; Cell Signaling Technologies) foi detectado usando um anticorpo secundário conjugado HRP (Thermo Scientific) em TBST 1x a temperatura ambiente por 2 h. O anticorpo γ tubulina (Santa Cruz Biotechnology) foi utilizado como controle do experimento. A imunodeteção foi realizada através do equipamento de detecção quimioluminescente Chemidoc (Bio Rad). O software ImageJ foi utilizado para as análises das imagens através da densitometria das bandas, o valor numérico obtido a partir da densidade óptica da banda de interesse foi dividido pelo valor numérico da banda controle, em seguida, foi realizado o teste T de Student para verificar se havia diferença significativa entre os valores obtidos para cada condição estudada. (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012)

4.17 CONSTRUÇÃO DO CASSETE DE DELEÇÃO DO GENE ENVOLVIDO COM A RESPOSTA DE *T. rubrum* À TRANS-CHALCONA (FAC)

A partir das sequências de nucleotídeos do gene ácido graxo sintase acetil transferase (AC -EL786005.1) disponível no banco de dados do ncbi (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) foi feita a encomenda do cassete de deleção para empresa Epoch Life Science®. O vetor utilizado para a construção do cassete de deleção foi PUC-57 Kan. Na construção do cassete de deleção foram utilizados dois fragmentos do gene da ácido graxo acetil transferase, constituídos por um fragmento no códon de iniciação da transcrição até a posição 1540 e um segundo fragmento de 1526 pb, a partir da posição 3' da sequência do gene, interrompidos pelo gene resistência à higromicina (2,4 kb) sobre o controle do promotor e terminador de *A. nidulans*, que foi inserido entre as duas extremidades dos genes, como mostrado na Figura 5.

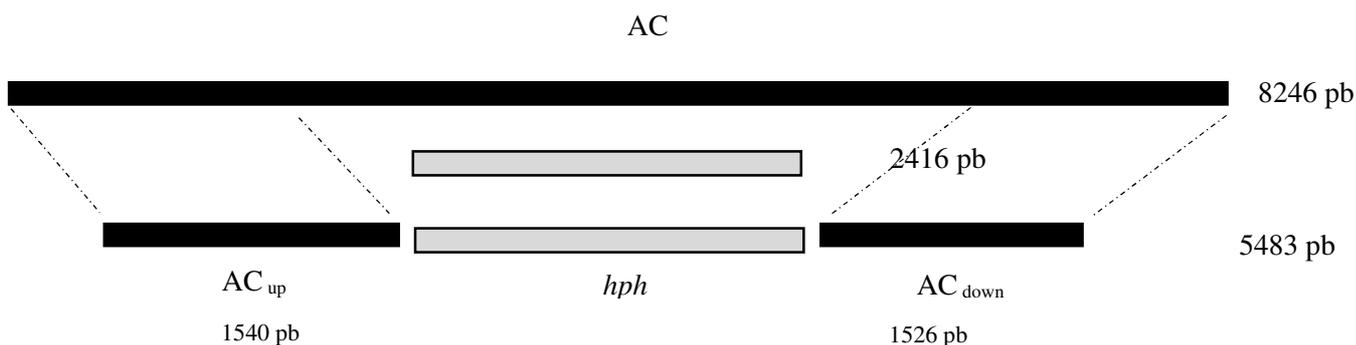


Figura 5: Representação da estrutura do cassete de deleção para o gene ácido graxo sintase acetil transferase –FAC, obtida a partir do plasmídeo PUC 57 KAN. Barras pretas indicam a estrutura do gene na linhagem selvagem CBS118892 e as barras cinzas referem-se ao gene de resistência a higromicina.

Aproximadamente 0,5 μ L da solução de plasmídeo foram utilizados para transformar *E. coli*. As células competentes de *E. coli* DH5 α foram previamente preparadas para transformação por choque térmico. Foram utilizados 50 μ g/mL de canamicina e 40 μ L de X-Gal (20 mg/mL) para seleção de colônias transformantes resistentes. A integração do plasmídeo nas células bacterianas foi confirmada através de uma reação de PCR com a enzima Go Taq (Promega®). As colônias positivas para o PCR foram inoculadas em meio LB contendo 50 μ g/mL de Kanamicina e incubadas a 37°C por 12-16h a 120 rpm para posterior extração do plasmídeo. A extração do plasmídeo foi realizada utilizando o Kit PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega®), seguindo as recomendações do fabricante.

4.18 TRANSFORMAÇÃO DA LINHAGEM CBS 118892 DE *T. rubrum* COM O CASSETE DE DELEÇÃO DO GENE FAC

A transformação da linhagem CBS de *T. rubrum* foi realizada de acordo com Fachin et al. (2006) com algumas modificações. Protoplastos de *T. rubrum* linhagem CBS 118892 foram obtidos da seguinte forma: 3 placas de *T. rubrum* crescidas por 6 dias foram inoculadas em 100 mL de meio Saboraud líquido em frasco erlenmyer de 250 mL, mantido sob forte agitação de 200 rpm por 12-16h a 28°C. Após esse período, o micélio foi filtrado em funil de büncher sob condições estéreis e esse filtrado foi transferido para

30 mL de solução lítica. Procedeu-se com uma incubação de 3-4 h a 28°C a 120rpm. Após observação dos protoplastos, foi feita uma filtração em lã de vidro estéril e o filtrado foi centrifugado por 10min a 4000 rpm. O precipitado foi ressuspensionado em 10 mL de solução CT, centrifugado por 5 min a 4000 rpm e o precipitado resultante foi ressuspensionado em 10 mL de solução DT. O precipitado obtido foi ressuspensionado em 1 mL de DT. 100 µL da solução de protoplastos (10^7 protoplastos/mL) foram incubados com cerca de 3µg do cassete de deleção obtido previamente (item 3.14). Para essa mistura de DNA + protoplastos foram adicionados 50 µL de solução ET e mantido em gelo por 20 min. A seguir foi adicionado 1mL de solução ET e incubou-se por 30 min a temperatura ambiente. Alíquotas de 0,5 mL da solução contendo os protoplastos transformandos foram adicionados em 4 mL de meio de regeneração MMS “Top Ágar”, pré-aquecido à 50°C. A seguir, essa mistura (protoplastos em meio MMS “Top Ágar”) foi vertida sobre placas de meio MMS “Botton Ágar”, contendo 500 µg/mL de higromicina, concentração previamente determinada para ser utilizada para a seleção de transformantes. Adicionalmente, *trans*-chalcona (0,24 µg/mL) e /ou 5 % de Soro Fetal Bovino (SBF) foi empregado para regenerar colônias relacionadas a transformação com o cassete de deleção do gene FAC. Como controles foram feitos: o inóculo de protoplastos sem conter o DNA do cassete de construção (para observação de eventuais colônias resistentes espontâneas) e o inóculo dos protoplastos em meio ausente de higromicina (para verificar a viabilidade dos protoplastos obtidos) Placas -mestras foram utilizadas no rastreamento das linhagens transformadas obtidas. Para triar as linhagens transformadas foram utilizadas variações do meio mínimo de Cove’s, representados por: meio mínimo de Cove’s; meio mínimo de Cove’s + *trans*-chalcona 0,24µg/mL; meio mínimo de Cove’s + ácido palmítico (0,01%); meio mínimo de Cove’s + ácido palmítico (0,01%) + *trans*-chalcona (0,24µg/mL).

4.19 AMPLIFICAÇÃO DO GENE DE RESISTÊNCIA À HIGROMICINA E DO FRAGMENTO QUE FLANQUEIA A CONSTRUÇÃO (FAC + HIGROMICINA) NOS TRANSFORMANTES OBTIDOS

As linhagens selecionadas a partir da observação das placas-mestras foram submetidas à extração de DNA, que foi realizada de acordo com o item 3.13.1.

O DNA extraído foi quantificado espectrofotometricamente em aparelho nanofotômetro (Implen®). A reação de PCR foi realizada com a enzima GoTaq® (Promega), seguindo as recomendações do fabricante. As sequências dos primers

utilizados para a amplificação do gene de higromicina e do fragmento que flanqueia a construção estão listados abaixo:

Higromicina 1 Fwd: 5'- CAGACAGGAACGAGGACATTAT-3'	}	Fragmento 110pb
Higromicina 1 Rev: 5'- AGGGCGAACTTAAGAAGGTATG-3'		
Higromicina 2 Fwd: 5'- CCGCAAGGAATCGGTCAATA-3'	}	Fragmento 96 pb
Higromicina 2 Rev: 5'-GGTGTCGTCCATCACAGTTT-3'		
F-AC+higromicina 1 Fwd: 5'- AACGACCCAATTCGAGGTATAA-3'	}	Fragmento 744 pb
F-AC + higromicina 1 Rev: 5'- CCTCGTTCCTGTCTGCTAATAA-3'		

As condições de ciclagem foram: 1) 94°C por 2 min, 2) 94°C por 30 seg, 3) 60°C por 30 seg, 4) 72°C por 30 seg*, 5) 72°C por 5 min. Repetidos 35 x da condição 2 a 4. *O passo 4 para os *primers* F-AC + higromicina foi de 1 min.

4.20 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DO TRANSFORMANTE Δ FAC DE *T. rubrum* NA PRESENÇA DE TRANS-CHALCONA E EM DIFERENTES FONTES DE ÁCIDOS GRAXOS

Devido ao efeito da *trans*-chalcona na síntese de ácidos graxos, o transformante Δ FAC foi inoculado em meio mínimo contendo 0,01% de ácido palmítico, 0,01% de ácido mirístico ou 0,01 % de ácido oleico e incubada por 15 dias a 28°C. Como controles foram utilizadas a linhagem CBS 118892 e o transformante PSCN43. Todas as placas continham higromicina em 500 μ g/mL. Além disso, teste de susceptibilidade antifúngica foi realizado com o transformante para a determinação de CIM (item.3.5.) e também após seu crescimento em meio mínimo de Cove's contendo 24 μ g/mL e 48 μ g/mL de *trans*-chalcona. Nesse caso, como controle foi utilizada a linhagem CBS 118892.

4.21 ENSAIO DE CRESCIMENTO DE *T. rubrum* CBS 118892 E Δ FAC EM FRAGMENTOS DE UNHAS

Solução de conídeos da linhagem CBS118892 e de Δ FAC foram preparadas a partir de placas crescidas por 15 dias em meio Saboraud. A solução foi filtrada em lâ de vidro e teve sua concentração determinada após contagem em hematómetro, sendo a concentração final ajustada para 3.10⁶ conídeos/mL. 50 μ L dessa solução foram inoculados em 70 mg de fragmentos de unhas humanas de cerca de 3mm, previamente

esterilizados por autoclavagem. Após incubação de 1h a temperatura ambiente foram adicionados 2 mL de água ultrapura estéril e procedeu-se a incubação por 3 dias a 28°C.

V- RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)

A linhagem CBS 118892 de *T. rubrum* apresentou sensibilidade ao antifúngico *trans*-chalcona com CIM de 0,12µg/mL e CFM de 0,48 µg/mL. Enquanto que, para o antifúngico comercial terbinafina foi obtido o mesmo valor de CIM e CFM (0,019µg/mL). Estudos prévios realizados por Bitencourt et al (2013) avaliando a atividade antifúngica de *trans*-chalcona em outra linhagem de *T. rubrum*, denominada MYA3108, apresentou um CIM de 7,5 µg/mL, mostrando que o composto exerce potente atividade antifúngica contra *T. rubrum*, sendo que a linhagem CBS mostrou-se ainda mais sensível à *trans*-chalcona. Além disso, a literatura descreve a atuação seletiva de chalconas para fungos dermatófitos, não sendo observada atividade antifúngica contra fungos filamentosos como *Aspergillus flavus* (KOMOTO et al., 2015).

5.2 ANÁLISE TRANSCRICIONAL DE *T. rubrum* EM RESPOSTA À *TRANS*-CHALCONA EM MEIO ADICIONADO DE ELASTINA E QUERATINA

O perfil transcricional do micélio de *T. rubrum* exposto à *trans*-chalcona em meio adicionado de substratos proteicos (queratina e elastina) foi analisado usando lâminas de microarranjo de oligonucleotídeos de alta densidade contendo 44.000 sondas, que representavam 6091 genes (representando 70% do genes codificadores de proteínas de *T. rubrum*). A análise dos dados de microarranjo de *T. rubrum* mostraram a modulação de 290 genes na presença de Meio Mínimo contendo queratina (MMQ), 62 genes em meio mínimo contendo elastina (MME) e 100 genes foram modulados quando exposto a meio mínimo contendo *trans*-chalcona (MMTChal). Em meio de cultura contendo substratos proteicos (MMETChal ou MMQTChal) adicionado de *trans*-chalcona foram modulados um total de 293 genes. Esses resultados foram obtidos baseados na análise estatística utilizada (p.value>0,05) empregando um *fold change* de 5 para todas situações. Exceção foi realizada para a comparação entre as condições MMETChal *versus* MME, para a qual foi utilizado o *fold change* de 2, devido à baixa modulação dos genes nessa comparação. Os resultados da análise estatística efetuada aos pares entre as seis condições ensaiadas

(MMQ x MM, MME x MM, MMTChal x MM, MMQTChal x MMQ, MMETChal x MME) são demonstrados na Tabela 3 e a distribuição dessa modulação está representada na Figura 6.

Tabela 3 Genes de *T. rubrum* modulados a partir da comparação entre as diferentes condições de cultivo

Condição	Reprimidos	Induzidos	Total
MMQ x MM	126	164	290
MME x MM	16	46	62
MMTChal x MM	35	65	100
MMETChal x MME	93	52	145
MMQTChal x MMQ	86	52	148

MM: Meio mínimo; MMQ: Meio mínimo + queratina; MME: Meio mínimo + elastina; MMTChal: Meio mínimo + trans-chalcona; MMETChal: Meio mínimo + elastina+ *trans*-chalcona; MMQTChal: Meio mínimo + queratina + *trans*-chalcona.

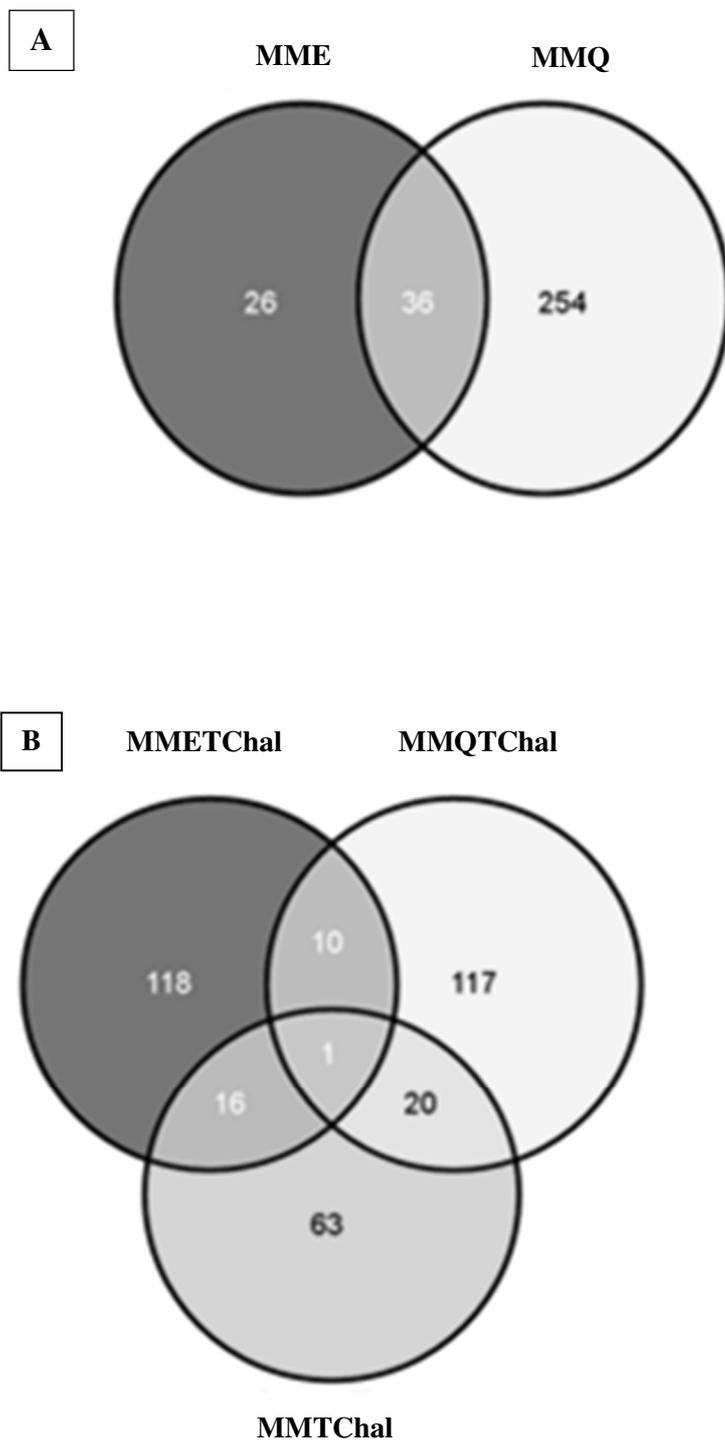
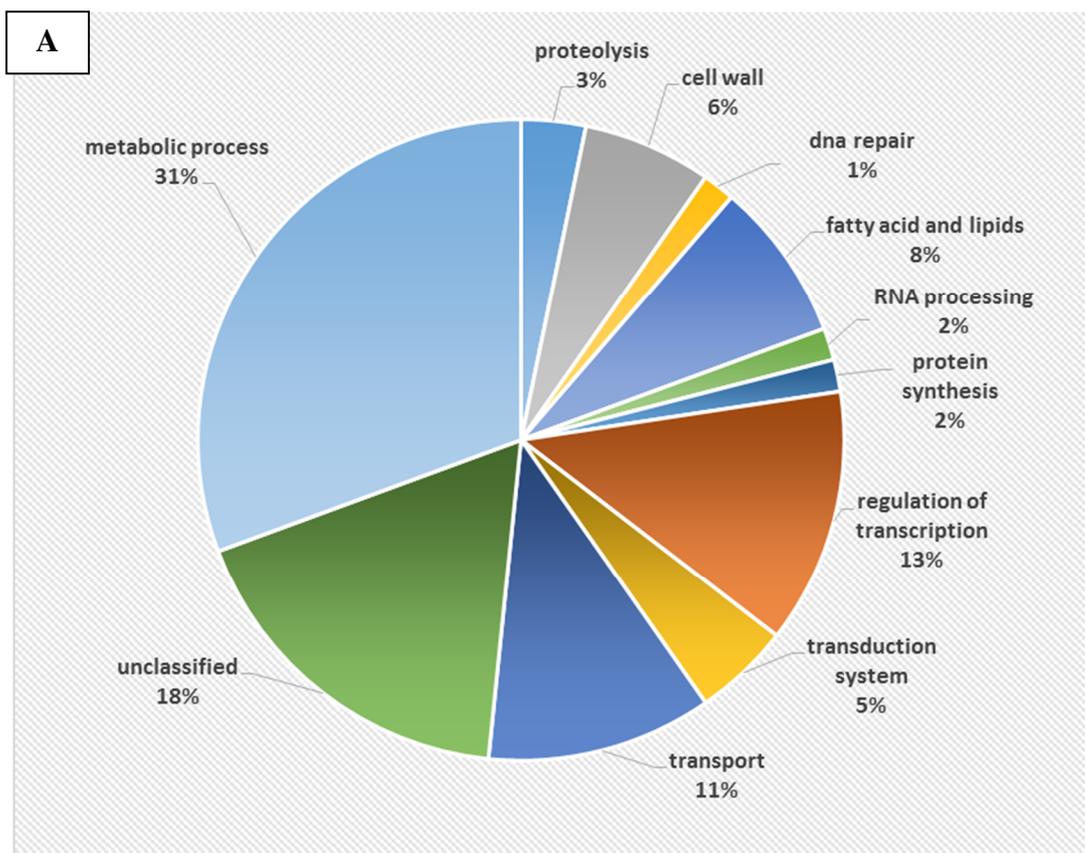


Figura 6: Diagrama de Venn mostrando os genes que foram modulados durante o crescimento de *T. rubrum* em diferentes condições de cultivo. A): Genes modulados durante o crescimento de *T. rubrum* em queratina (MMQ) e elastina (MME) versus MM. B) Genes modulados durante o crescimento de *T. rubrum* exposto à *trans*-chalcona nas diferentes condições estudadas. *T. rubrum* crescido em MMTChal, MMQTChal e MMETChal, comparado com a mesma condição de cultivo ausente de droga.

5.3 CATEGORIZAÇÃO FUNCIONAL DOS GENES MODULADOS

5.3.1 Categorização funcional dos genes modulados durante o crescimento de *T. rubrum* em substratos proteicos

A categorização funcional de acordo com o *Gene Ontology* de todos os genes modulados em resposta aos substratos proteicos demonstrou genes relacionados ao metabolismo de aminoácidos, carboidratos e lipídios, genes envolvidos na síntese de parede celular, transdução de sinal e defesa celular, transportadores de compostos orgânicos e inorgânicos, assim como genes associados com a regulação da transcrição e síntese proteica, além de um elevado número de genes que codificam proteínas hipotéticas. As categorias moduladas durante o crescimento de *T. rubrum* em elastina (A) e queratina (B) encontram-se representadas na Figura 7.



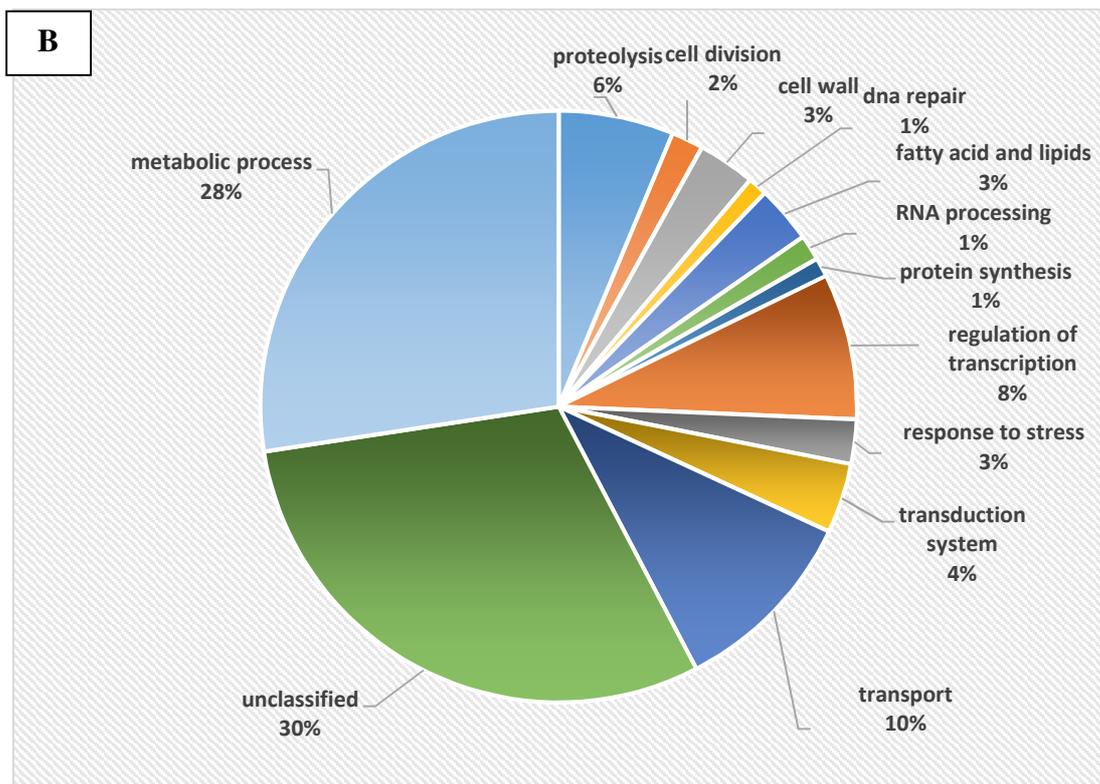


Figura 7: Anotação funcional dos genes modulados em elastina (A) e queratina (B)

A queratina é o principal componente do estrato córneo da pele, que consiste na camada mais externa da pele, local frequentemente acometido por dermatofitoses. Enquanto que a elastina e o colágeno representam as principais proteínas da matrix extracelular da derme, região em que dermatofitoses profundas podem ocorrer, em pacientes imunodeprimidos (NIR-PAZ et al., 2003). O crescimento de *T. rubrum* na presença de queratina e elastina foi ensaiado para avaliar a dinâmica na expressão gênica nesses diferentes substratos proteicos, na tentativa de melhor compreender mecanismos associados à infecção superficial e profunda. Entretanto, as categorias de genes modulados por *T. rubrum* em ambos os substratos proteicos apresentaram, em geral, um perfil similar. A exceção ocorreu para o processo biológico referente à proteólise, em que um número maior de proteases foi modulado em queratina, assim como para a resposta ao estresse, com a indução de hsp70-like (Terg_06505), hsp90-like (Terg_06963) e hsp88-like (TERG_07658). Enquanto que a presença de elastina promoveu a modulação de genes relacionados aos processos de síntese de ácidos graxos e lipídios, além de ser observado a modulação de genes relacionados às funções de regulação de transcrição e síntese da parede celular. Assume-se que a maior ativação dos genes relacionados a essas

funções celulares podem estar envolvidas com o uso de elastina pelo fungo durante a infecção.

As hsps (heat shock proteins) atuam como chaperonas moleculares ou reguladores transcricionais para uma variedade de funções fisiológicas. Em fungos, exercem papéis na transição morfológica, patogenicidade e resposta à drogas (BURNIE et al., 2006). A literatura descreveu que a inibição química da proteína hsp90 pelo composto 17-AAG resultou na repressão dos genes hsp70-like e hsp88-like, durante o crescimento de *T. rubrum* em meio de cultura contendo queratina. Além disso, foi observado a repressão da expressão do fator de transcrição pacC, envolvido com a atividade queratinolítica e virulência de *T. rubrum*. Ainda nesse sentido, a inibição química da hsp-90 diminuiu a capacidade de *T. rubrum* crescer sobre fragmentos de unhas. (JACOB et al., 2015)

A simulação da infecção em meio de cultura com adição de substratos proteicos foi uma abordagem escolhida para tentar compreender os mecanismos de adaptação, na interação fungo-hospedeiro, e sobre virulência de dermatófitos. No presente trabalho, a queratina promoveu a indução de 15 genes codificadores de proteases, com indução significativa para Lap 1 e Mep 4 (Tabela 4).

Na literatura científica alguns autores também descreveram a expressão de genes codificadores de proteases na presença de substratos proteicos. Kaufman et al. (2005) construiu bibliotecas substrativas de *T. mentagrophytes* após seu crescimento em queratina e detectou a expressão do gene que codifica a protease DDP V. Além disso, a expressão da protease DDPV também foi avaliada após o crescimento desse dermatófito em elastina, e não foi observada diferenças de expressão quanto a fonte proteica utilizada. Zaugg et al. (2009) através da abordagem de microarranjo de cDNA avaliaram o perfil de expressão de *T. rubrum* crescido em meio mínimo com queratina e meio de soja + queratina e verificaram alta indução de endoproteases da família de subtilisinas e fungalisinas (Sub 3, Sub 4, Mep 3 e Mep 4), além de exoproteases Lap 1 e Lap 2 e metalocarboxidase. Igualmente, Maranhão; Paião; Martinez-Rossi (2007) utilizando bibliotecas substrativas de cDNA de *T. rubrum* crescido em queratina constataram a expressão de genes que codificam as proteases Sub 3, Sub 5, Mep 3 e Mep 4.

O conhecimento acerca dos genes modulados nas diferentes fontes proteicas podem conduzir a importantes descobertas sobre as estratégias utilizadas pelos dermatófitos para o estabelecimento da infecção superficial e profunda. As Tabelas 4 e 5 representam as proteases e lipases moduladas durante o crescimento de *T. rubrum* em queratina e elastina.

Tabela 4 Proteases e lipases moduladas por *T. rubrum* durante o crescimento em queratina

TERG ID	Anotação	Fold Change
TERG_05923	Metallopeptidase	-6,10
TERG_03293	hypothetical protein	-6,32
TERG_04809	metalloproteinase 2	-8,12
TERG_05652	leucine aminopeptidase 1	20,71
TERG_04324	metalloproteinase 4	24,01
TERG_12606	secreted dipeptidyl peptidase	5,03
TERG_03400	subtilisin-like protease 1	5,17
TERG_03104	signal peptidase i	5,49
TERG_06552	aspartic-type endopeptidase	5,82
TERG_04769	serine carboxypeptidase	5,82
TERG_03248	metalloproteinase 3	6,72
TERG_02214	carboxypeptidase 2	6,79
TERG_08557	carboxypeptidase s1	7,24
TERG_08405	leucine aminopeptidase 2	8,31
TERG_05735	dipeptidyl peptidase 4	8,54
TERG_08201	subtilisin-like protease 5	9,06
TERG_03815	subtilisin-like protease 3	9,88
TERG_01617	subtilisin-like protease 4	9,98
TERG_05317	lipase 1	11,54
TERG_04914	spo7-like protein	5,40
TERG_00899	neutral ceramidase	5,66
TERG_00127	secretory phospholipase a2	52,72
TERG_03747	phospholipase a2	6,79

Tabela 5 Proteases e lipases moduladas durante o crescimento de *T. rubrum* em elastina

TERG ID	Anotação	Fold Change
TERG_01957	alkaline serine protease	6,52
TERG_05652	leucine aminopeptidase 1	8,05
TERG_03459	GDSL lipase acylhydrolase	5,32
TERG_00127	secretory phospholipase a2	7,01

Devido ao caráter queratinolítico dos dermatófitos, as proteases são consideradas fatores chaves para a patogenicidade desses fungos (GRUMBT; MONOD; STAIB, 2011). Análise comparativa do genoma de 7 dermatófitos destacou 4 classes funcionais de genes que podem contribuir para a adaptação e para o sucesso da infecção nesses fungos. Essas funções são representadas por genes envolvidos em transdução de sinais, proteínas com domínio Lys e de síntese de metabólitos secundários e proteases (MARTINEZ et al., 2012). Adicionalmente, pode ser afirmado que os dermatófitos estão entre as espécies mais abundantes em genes codificadores de proteases, que apresentam um alto grau de conservação. Reforçando essa afirmação, foi constatado a predição de

235 genes codificadores de proteases, durante análise comparativa dos genomas de *T. verrucosum* e *Arthroderma benhamiae*. (BURMESTER et al., 2011).

O termo protease é sinônimo de peptidase, peptídeo hidrolase e enzima proteolítica, e refere-se à enzimas que atuam na quebra de pontes peptídicas de proteínas, digerindo essas proteínas em peptídeos e aminoácidos livres. As proteases encontram-se divididas em endoproteases, constituídas por proteases aspárticas, serina proteases da família das subtilisinas (S8A) e metaloproteinases; e exoproteases que incluem as leucinas aminopeptidases (Lap 1 e Lap2) e dipeptidyl-peptidase IV e V. Endo e exoproteases atuam em conjunto na digestão de proteínas. Além das proteases mencionadas, recentemente, foi observado que *T. rubrum* também secreta carboxipeptidases durante seu crescimento em meio de cultura contendo proteína como única fonte de carbono e nitrogênio (MONOD et al., 2002; ZAUGG et al., 2007).

A família das subtilisinas de dermatófitos é composta por 12 genes (Sub1-12) e para a família das metaloproteinases há uma subdivisão em duas famílias: fungalisina (M36) e deuterolisina (M35), contendo 5 genes para cada família. Em contraste, em *Aspergillus spp* é descrito um único gene codificador de metaloproteína (MEP), o qual poderia ter dado origem à parálogos e ortólogos em dermatófitos devido ao alto grau de identidade compartilhado por proteínas MEP por esses dois gêneros fúngicos, esse fato reforça a importância dessas enzimas para o metabolismo e patogenicidade de dermatófitos. (BURMESTER et al., 2011; BALDO et al., 2012; JOUSSON et al., 2004; BROUTA et al., 2002).

Além de proteases, o processo de infecção dos dermatófitos também é devido a expressão de lipases, uma vez que os lipídios são principais constituintes da pele. Nos genomas de *A. benhamiae* e *T. verrucosum* há a presença de 16 genes codificadores de lipases (BURMESTER et al., 2011). Vale ressaltar, que lipases mostram-se induzidas durante o crescimento de fungos em substratos proteicos, mesmo na ausência de lipídios (KUNERT, 2000). A partir dos resultados apresentados na Tabela 5, pode ser notado que durante o crescimento de *T. rubrum* em elastina, a expressão de genes que codificam lipases foram tão importantes quanto os genes codificadores de proteases.

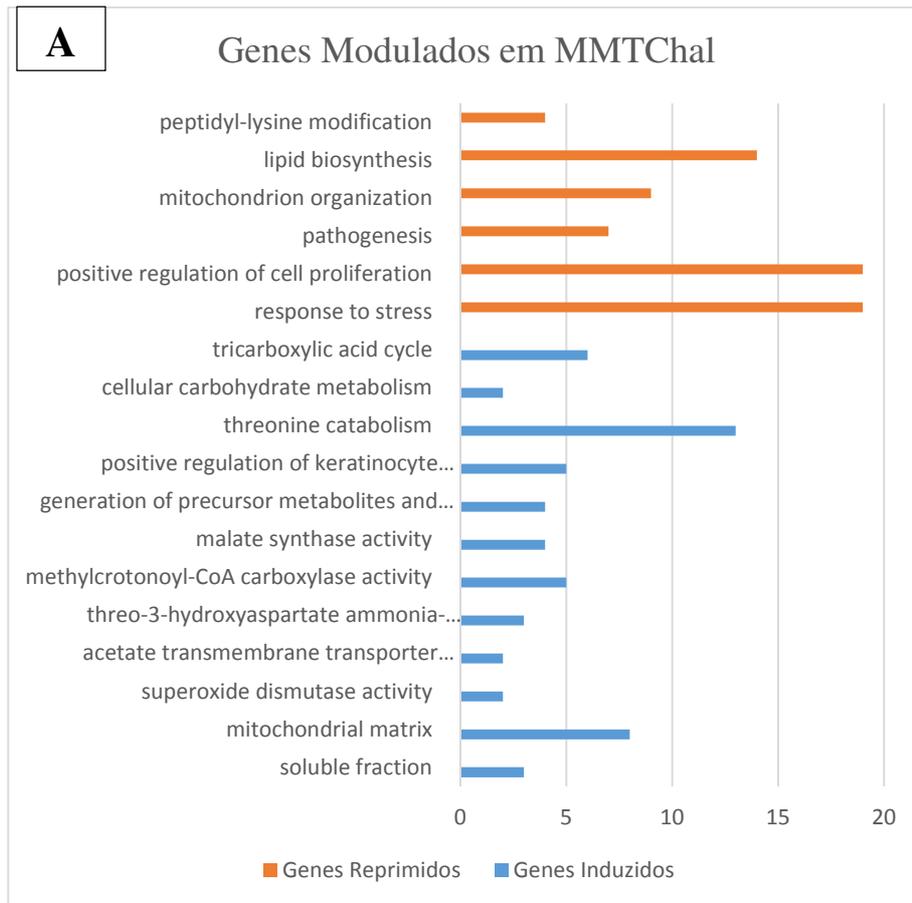
Paralelamente, ambas as fontes proteicas utilizadas promoveram indução de genes codificadores de fatores de transcrição que podem estar envolvidos na utilização da proteína, como já observado em outros trabalhos com abordagens similares (ZAUGG et al., 2009). Um exemplo, foi a indução do fator de transcrição C2H2 em resposta aos dois substratos proteicos utilizados no presente trabalho. Trabalhos na literatura, mostram que

esse gene atua em resposta ao baixo nível de nutrientes como carbono e nitrogênio, e também está relacionado com a diferenciação celular em leveduras (HURTADO; RACHUBINSKI, 1999). Além disso, esse fator de transcrição foi induzido durante o crescimento de *Arthroderma benhamina* em queratina (STAIB et al, 2010). Outros fatores de transcrição, como o gene codificador de proteína alfa box *mating*, o fator de transcrição homeobox e de desenvolvimento sexual *c6* também foram induzidos no presente trabalho, alguns desses fatores são considerados importantes candidados a reguladores durante a infecção (ACHTERMAN; WHITE, 2012).

Os dados de microarranjo, obtidos nesse estudo durante o crescimento de *T. rubrum* em queratina, também mostraram a indução do gene codificador de sulfato redutase, diretamente envolvido com o metabolismo de sulfito, relevante para a manutenção da infecção e proteólise em dermatófitos. (BARRERA et al., 2014).

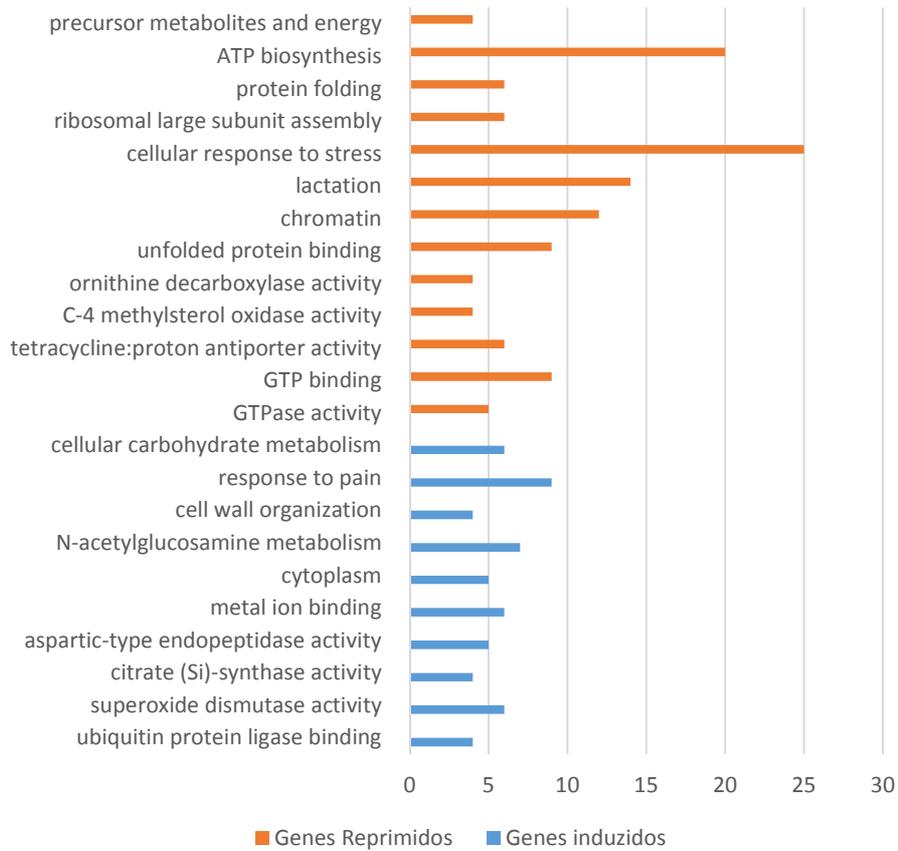
5.3.2 Categorização e enriquecimento funcional dos genes modulados em resposta à *trans*-chalcona

A categorização funcional foi realizada de acordo com *Gene Ontology*, seguido de análise de enriquecimento funcional, que indicou os termos GO que se mostraram mais representativos em resposta à *trans*-chalcona nas diferentes condições de cultivo (MMTChal, MMETChal e MMQTChal), que encontram-se representados na Figura 8.



B

Genes Modulados em MMETChal



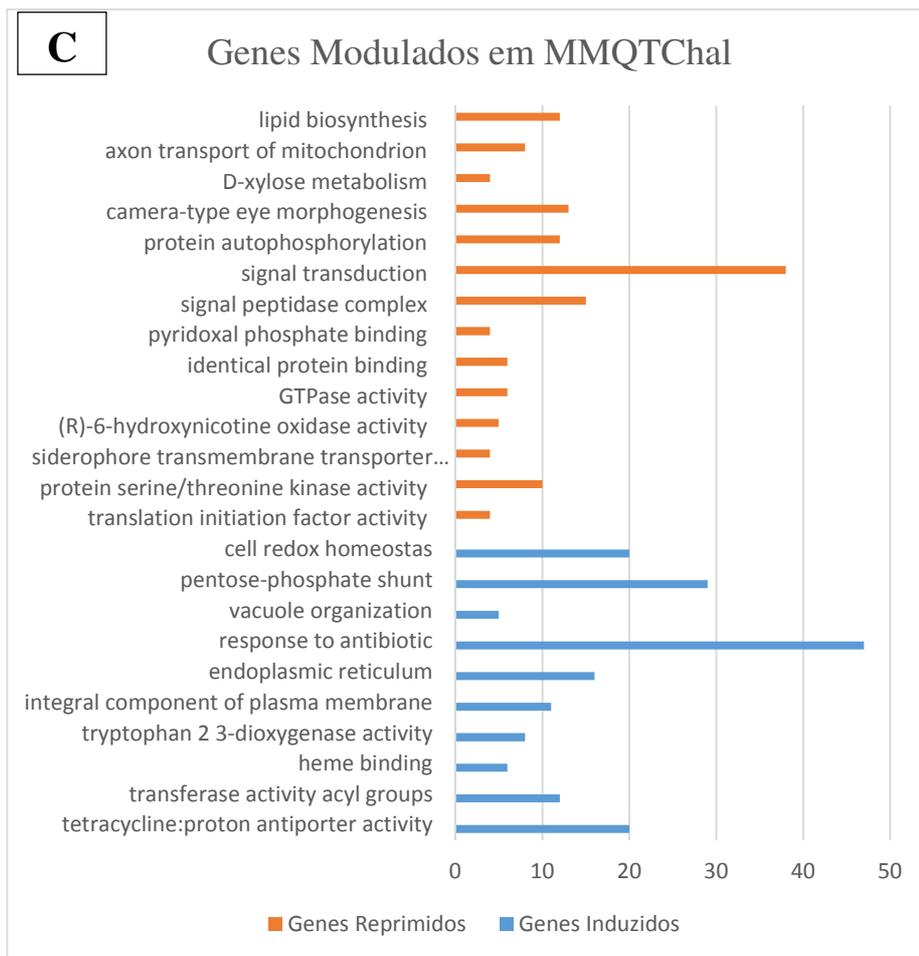


Figura 8: Categorização funcional realizada de acordo com *Gene Ontology* dos genes modulados referente à exposição à *trans*-chalcona para as situações A) MMTChal, B) MMETChal e C) MMQTChal.. Barras laranjas e azuis indicam o número de genes reprimidos e induzidos, respectivamente, de cada categoria. ($p < 0,05$)

Podemos observar que em meio mínimo + *trans*-chalcona houve a repressão de genes envolvidos na proliferação celular, biossíntese de lipídios e patogenicidade, e indução de genes envolvidos no metabolismo alternativo de carbono como TCA e malato sintase (Fig 8 A). Em meio de cultura contendo elastina+ *trans*-chalcona notou-se a repressão de genes envolvidos em estresse celular, além da repressão de genes envolvidos na síntese de ATP, que pode estar relacionado à morte celular do fungo pelo efeito da droga (Fig 8 B). Em meio de cultura contendo queratina+ *trans*-chalcona (Fig 8 C) destacou-se à repressão de genes envolvidos em transdução de sinal e lipídios, além indução de genes relacionados à resposta celular a antibióticos.

5.3.3 Genes relacionados à síntese de lipídios

As análises demonstraram a modulação de genes envolvidos com a síntese de lipídios após o crescimento de *T. rubrum* em proteínas e em resposta à *trans*-chalcona (Tabela 6).

Tabela 6 Genes envolvidos na síntese de ácidos graxos e lipídios modulados após à exposição à *trans*-chalcona

ID	Gene Product Name	Fold Change	Condition
TERG_08235	long chain fatty alcohol oxidase	-5.52	MMTChal
TERG_04851	acyl binding protein family	-2.30	MMTChal
TERG_02787	fatty acid synthase s- acetyl transferase	-5.60	MMTChal
DW707302.1	Enoyl reductase	+4.09	MMETChal
DW710771.1	Ketoacyl reductase	+3.38	MMETChal
TERG_11538	3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) reductase	-7.45	MMKTChal

A partir dos dados apresentados na Tabela 6, pode ser notado que a *trans*-chalcona reprime a maior parte dos genes envolvidos com síntese de ácidos graxos, apenas no meio contendo elastina houve a indução de genes relacionados com a elongação de ácidos graxos como os genes codificadores de enoil-redutase e cetoacil-redutase. A modulação desses genes durante à exposição à *trans*-chalcona observada nos experimentos de microarranjo corroboram os resultados já publicados pelo nosso grupo de pesquisa. Bitencourt et al.(2013) mostrou que durante exposição de *T. rubrum* à *trans*-chalcona houve repressão da expressão do gene que codifica a ácido graxo sintase subunidade beta (FAS1) , redução do nível de ergosterol do micélio de *T.rubrum*, além desse composto

causar moderada inibição da atividade enzimática da FAS, avaliada em *S.cerevisiae*. Realmente, a literatura científica descreve que um dos mecanismos de ação de chalconas é a sua atuação na enzima ácido graxo sintase (FAS) (LIU et al., 2009; BROWN et al., 2007). Além disso, outros compostos sintéticos inibidores (PH11A e PHS11B) de FAS promoveram alterações na modulação de expressão de genes envolvidos no metabolismo de ácidos graxos e esteróis (ZHANG et al., 2007; YU et al., 2007).

5.3.4 Genes envolvidos no transporte de Acetil-COA e ciclo do glioxilato

Os dados das análises de microarranjo revelaram ainda a modulação de genes relacionados ao ciclo do glioxilato, ciclo tricarboxílico e beta oxidação de ácidos graxos, e concomitantemente genes relacionados ao transporte de acetil-COA, que é principal substrato para as vias acima mencionadas (Tabela 7).

Tabela 7 Genes envolvidos no transporte de acetil e de vias correlacionadas modulados durante o crescimento de *T. rubrum* na presença da chalcona

ID gene	Gene Product Name	Fold Change	Condition
DW710004.1	Acyl dehydrogenase	+3.17	MMETChal
TERG_05484	Acyl dehydrogenase	+6.35	MMKTChal
TERG_11813	FAD binding domain-containing protein	+5.95	MMKTChal
TERG_11814	FAD dependente protein	+10.63	MMKTChal
DW691959.1	Acyl oxidase	-6.42	MMTChal
TERG_04250	Carnitil dehydratase	+2.13	MMETChal
TERG_03483	Carnitine acetyltransferase	-5.48	MMKTChal
DW687355.1	Adenylsuccinate liase	-15.01	MMKTChal
TERG_01281	Malate glioxomal	+5.11	MMTChal
DW701542.1	Isopropilmalate isomerase	+2.23	MMETChal
TERG_01052	Succinil ketoacyl transferase	+5.1	MMTChal
TERG_01271	Isocitrate lyase	+2.04	MMETChal
TERG_01272	Methylcitrate mithochondrial	+2.49/+5.92	MMETChal/MMTChal
DW700277.1	Citrate sinthase	-6.27	MMTChal

O acetil-COA exerce papel central no metabolismo de carbono e energia. Devido ao seu caráter anfifílico, não é capaz de atravessa as membranas biológicas. Seu transporte em fungos ocorre através de duas formas, por um carreador de carnitina (peroxissomal) e através de uma via citrato sintase dependente. No primeiro caso, a carnitina acetil transferase é a mediadora, e no segundo tipo de transporte a citrato sintase realiza a condensação de oxaloacetato com acetil – COA acarretando em citrato que atravessa as

membranas das diferentes organelas (PRACHAROENWATTANA; CORNAH; SMITH, 2005). Esse transporte relaciona-se com o metabolismo dos ácidos graxos, ciclo tricarboxílico, ciclo do glioxilato e gluconeogênese, que ocorrem em organelas distintas como demonstrado na Figura 9.

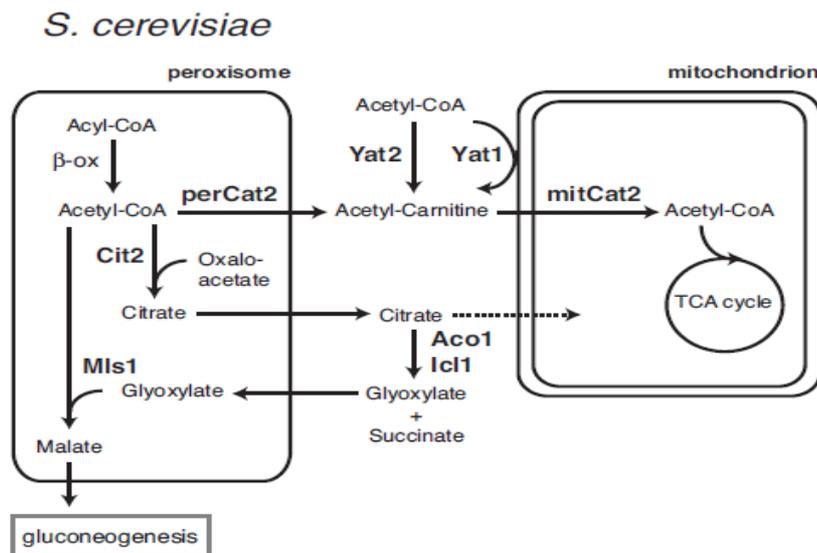


Figura 9 Representação esquemática do transporte de acetil-COA em *Saccharomyces cerevisiae*. (STRIJBIS; DISTEL, 2010). Abreviações: Aco1: aconitase, β-ox: β-oxidação de ácidos graxos, Cit2: peroxisomal citrato sintase, Icl1: isocitrato liase, mitCat2: mitocondrial Cat2, Mls1: malato sintase, perCat2:peroxisomal Cat2, TCA ciclo: ciclo do ácido tricarboxílico, Yat1/Yat2: carnitina acetil-transferase.

Durante a β-oxidação de ácidos graxos de cadeia longa, que ocorre dentro do peroxissomo, o acil-COA incorporado é convertido à acetil-COA após 4 reações enzimáticas realizadas por 3 enzimas (2 enzimas acil-COA oxidases, 1 enzima multifuncional e 1 enzima 3-Cetoacil-COA thiolase). O acetil-COA gerado alimenta o ciclo tricarboxílico, no interior da mitocôndria, através de transportadores de acetil-COA (POIRIER et al., 2006). Enquanto que, uma enzima do ciclo tricarboxílico, a aconitase (ACO), faz a conversão de citrato à isocitrato que é substrato para o ciclo do glioxilato, cujo produto final é a malato, que por sua vez é substrato para a gluconeogênese (STRIJBIS; DISTEL, 2010).

O ciclo do glioxilato é uma variação do ciclo tricarboxílico, está presente em fungos e plantas, cuja função é permitir a utilização de compostos contendo duas unidades de carbono como fonte carbônica para a produção de glicose. Dessa forma, os genes dessa

via são ativados quando a disponibilidade de glicose é baixa. Além disso, as enzimas malato sintase e isocitrato liase, que são exclusivas da via, são consideradas importantes fatores de virulência como demonstrado nos trabalhos realizados com mutantes nulos das enzimas isocitrato liase e malato sintase em ensaios com leveduras (LORENZ; FINK, 2001). Em estudos de expressão gênica realizados com fungos dermatófitos foi observado a indução de genes desta via na presença de queratina (ZAUGG et al., 2009; PERES et al., 2010). O uso de fontes alternativas de carbono é uma adaptação apresentada por patógenos oportunistas à nichos em que os substratos carbônicos são diversificados, como ocorre em *C. albicans* (WILSON et al., 2009, FRADIN et al., 2003).

A ação da *trans*-chalcona está relacionada com metabolismo energético, considerando a repressão de genes da síntese de ácidos graxos e ativação de genes de rotas alternativas para geração de energia, como beta-oxidação de ácidos graxos e ciclo do glioxilato (Tabela 7). Dessa forma, podemos inferir que a *trans*-chalcona apresenta um caráter termogênico, que pode estar diretamente envolvido com seu efeito na redução expressiva do conteúdo de ergosterol, como descrito por Bitencourt et al (2013), e sobre a parede celular. Realmente, a literatura descreve que linhagens de *Schizosaccharomyces pombe* nulas para genes envolvidos com a biossíntese de ergosterol também mostram sensibilidade à inibidores de parede celular, o que sugere uma relação direta entre a redução do conteúdo de ergosterol e alteração na parede celular (FANG et al., 2012).

5.3.5 Transdutores de sinais envolvidos na integridade da parede celular

Após a exposição de *T. rubrum* à *trans*-chalcona, foi observada a modulação de genes transdutores de sinal e proteínas sensoras, que estão relacionados com vias de integridade de parede celular (Tabela 8)

Tabela 8 Genes de transdução de sinais modulados após a exposição à chalcona

ID	Gene Product Name	Fold Chane	Condition
TERG_01124	RAN-interacting protein	+5.37	MMKTChal
TERG_05617	Hypothetical protein	-5.29/- 12.39	MMKTChal/MMTChal
TERG_02263	Hypothetical protein	-5.29	MMKTChal
TERG_04042	serine threonine protein kinase	-8.07	MMKTChal
TERG_00315	RAN protein kinase	-6.02	MMKTChal
TERG_00077	eukaryotic peptide chain release factor GTP-binding subunit	-6.72	MMKTChal
TERG_07097	camk camk1 kin4 protein kinase	-5,87	MMKTChal
TERG_07136	farnesyltransferase beta subunit RAM1	-9.29/-5,37	MMKTChal/MMTChal
TERG_00749	guanine nucleotide exchange	-15.78	MMTChal
TERG_04867	SAM and pH domain- containing protein	-11.78	MMKTChal
TERG_02500	phosphatidylinositol-4- phosphate 5-kinase its3	-11,52	MMTChal
TERG_04523	CMGC CDKL CRK7 protein kinase (divisão celular)	-5.02	MMTChal
TERG_01365	GTP-binding protein	-5.2	MMTChal
TERG_05744	GTP-binding protein	-6.87	MMKTChal
TERG_05987	GTP-binding protein	+8.17/-3.32	MMTChal/MMETChal
TERG_02422	RHO GTPase activator	+2.18	MMETChal
TERG_00689	AUR protein kinase	+3.34	MMETChal
TERG_07570	G-protein signaling	-2.35	MMETChal
TERG_04086	GTP-binding protein 1	-2.36	MMETChal
TERG_00548	elongation factor 1 alpha	-2.6	MMETChal
TERG_02722	WSC domain containing protein	-5.87	MMKTChal

As quinases estão entre as classes de genes mais enriquecidas no genoma de dermatófitos, acredita-se que a especificidade do fungo ao hospedeiro ocorra em função do sensoriamento do ambiente através dos mecanismos de transdução e regulação de sinais (MARTINEZ et al., 2012). Previamente, o sequenciamento e a categorização de 10250 ESTs isoladas a partir de diferentes estágios de desenvolvimento de *T. rubum*, revelaram genes relacionados a metabolismo celular, composição de parede e significativa proporção constituída por reguladores e transdutores de sinais, como os da via MAPK, via Camp-dependente, vias de transdução RAS e envolvendo proteínas-G(WANG et al., 2006).

Os dados apresentados da tabela 8 refletem o efeito da *trans*-chalcona sobre genes codificadores de transdutores de sinais e proteínas sensoras, sendo sua grande maioria reprimidos na condição e nos tempos avaliados.

As proteínas de ligação GTP são proteínas de transdução de sinal que pertencem à cinco grandes famílias: RAS, RAN, RHO/RAC/cdc42, Rab e Arf, sendo conhecidas como pequenas GTPases que regulam processos de proliferação, diferenciação celular e tráfego através da membrana (NOORBAKHS, 2006). As proteínas WSC são pertencentes a uma família de proteínas transmembrânicas sensoras que ativam uma importante via de transdução de sinal em fungos responsável pela integridade de parede celular (CWI), através de uma cascata de sinalização que, em sequência, ativa proteínas GTP como a RHO, mediada pela regulação promovida entre as proteínas GAP (*GTP-activator protein*) e GEF (*guanine exchange factor*). A localização das proteínas RHO na membrana celular é garantida através da ação de geranylgeranyl transferase ou farnesil transferase, que transfere grupos farnesil para a proteína, conferindo maior hidrofobicidade e permitindo a associação dessas proteínas na membrana celular. A ação da proteína RHO pode ocorrer sobre proteínas efetoras ou por meio da ativação de proteínas quinases como Proteína Kinase C (PKC), que por sua vez ativa a cascata de sinalização MAPK que regulará fatores de transcrição (LEVIN, 2005). A partir dos dados obtidos na presente análise e dos resultados já publicados em fungos modelo, podemos sugerir que a exposição à *trans*-chalcona em *T. rubrum* tenha desencadeado um mecanismo de transdução de sinal mediada pela ação da proteína CMGC CDKL. A proteína CMGC CDKL é ortóloga à proteína Cdc28 de *S. cerevisiae*, que exerce função de “checkpoint” da morfogênese, efetuando uma parada no ciclo celular até o rearranjo da actina no citoesqueleto. Além disso, a proteína CMGC CDKL atua em conjunto com a serina treonina quinase, cuja proteína ortóloga em *S. cerevisiae* está relacionada com a sinalização Tor, que está envolvida com a ativação de Mpk1 (integrante da cascata MAP quinase), apresentando papéis na via de integridade de parede celular, como representado na Figura 10.

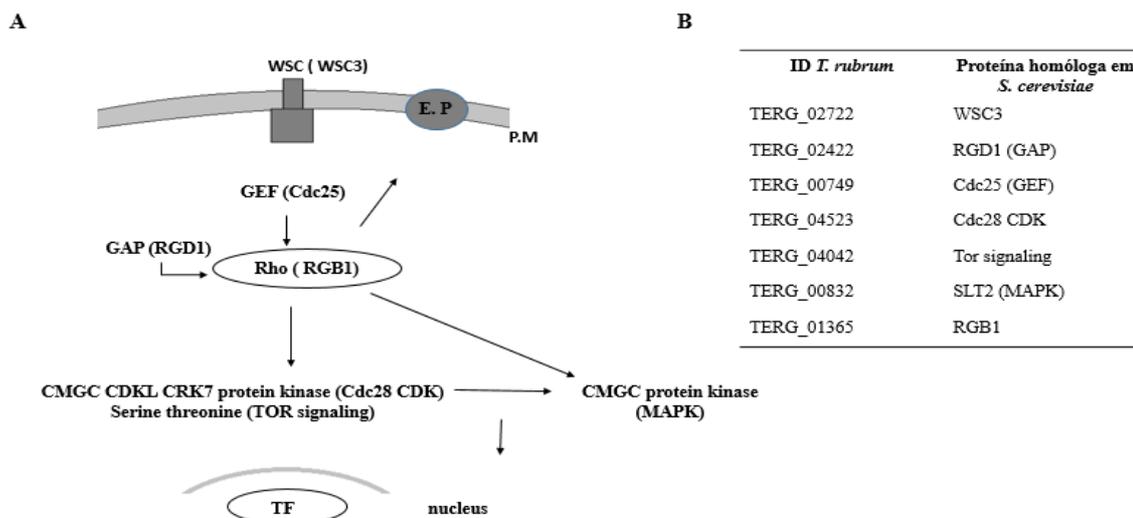


Figura 10: A) Esquema hipotético da via de transdução de sinais relacionada à manutenção da integridade de parede celular ativada por *T. rubrum* após à exposição à *trans*-chalcona. B) Identificador do gene codificador da proteína de *T. rubrum* e ortólogo para *Saccharomyces cerevisiae* s288c. O estímulo é detectado pela proteína sensora WSC3 que recrutará proteínas do tipo GEF para ativação de RHO, que poderá atuar sobre proteínas efetoras (EP) na membrana plasmática (PM). Adicionalmente, a regulação negativa de RHO é indicada pela proteína inibidora do tipo GAP. A cascata de sinalização desencadeada pela proteínas quinases CMGC, CDK e serina treonina quinase, que podem ocorrer concomitantemente, mediam os efeitos para organização da actina e manutenção da integridade da parede celular através da atuação sobre diferentes fatores de transcrição no núcleo, e também através da ativação de Mpk1 (MAPK).

As CMGC quinases compreendem um grupo de serina threonina kinases como as CDK (“cyclin dependent kinase”), MAPK (“mitogen-activated protein kinase”), GSK3 (glycogen synthase kinase 3) e CLK (CDK-like kinase). Além desse grupo há o grupo representado pelas famílias: AGC (PKC, PKA, PKG), família β ARK, família S6 ribossômica kinase e NDR (nuclear Dbf2-related). Representando um grupo menor está a família CK1 (casein kinase1), a CAMK (Ca²/calmodulin-dependent kinase), e ainda as que estão definidas dentro do grupo “outros” e do grupo de “atípicos”, para os quais fazem parte aurona kinase e fosfatidilinositol-4 fosfato kinase, respectivamente (HANKS; HUNTER, 1995).

Alguns genes codificadores de fatores de transcrição foram modulados após a exposição à chalcona, e podem ter sido regulados por vias de sinalização como a descrita na Figura 10, como o fator de transcrição c6 (TERG_04862), fator de transcrição homeobox (TERG_05229), um fator de transcrição específico fúngico (TERG_02843) e o fator de transcrição C2H2 (TERG_08666).

Entre as abordagens utilizadas para o monitoramento da via de integridade de parede celular (CWI) foi realizado o ensaio de Western Blot para a quantificação da fosforilação da proteína MAPK. Isso devido ao fato dos dados de microarranjo sugerirem uma possível ativação de MAPK após exposição de *T. rubrum* à *trans*-chalcona, como descrito anteriormente, através de uma conexão entre vias transdutoras de sinais. A via CWI utiliza a cascata de sinalização MAPK para promover a biossíntese da parede celular e de seus constituintes, além da organização da actina. A medida de fosforilação de MAPK se dissemina na literatura científica para a avaliação de integridade de parede celular pois a fosforilação ocorre em resíduos amplamente conservados de treonina e tirosina, o que permite seu fácil reconhecimento por anticorpos específicos como é o caso dos anticorpos que reconhecem os resíduos de p44/42. (POPOLO; GUALTIERI; RAGNI, 2001). Dessa maneira, a Figura 11 demonstra a quantificação de MAPK total e MAPK fosforilada após o tratamento com *trans*-chalcona.

A quantificação em nível de proteína e de expressão gênica (Figura 11) demonstram que CMGC MAPK de *T. rubrum*, homóloga a MAPK44/42 de *Aspergillus fumigatus* (*score* 729, *e-value*:0,0 e identidade de 85%), mostrou-se ativada como resposta rápida à exposição à *trans*-chalcona e mais tardiamente foi observada a repressão dessa quinase. Drogas que causam estresse sobre a parede celular, interferindo na manutenção da integridade da parede celular, como o corante *congo red*, que se liga a β -1,3 glucana ativam essa sinalização. Igualmente, o uso de calcofluor, que é um agente que interfere na síntese de quitina, desencadeia uma resposta celular rápida ao dano sofrido através de um mecanismo de reparo que é mediado por proteínas RHO e que provoca alterações sobre glucana sintase e actina. (DELLEY; HALL, 1999). Assume-se que essa cascata de sinalização ocorra rapidamente para resposta ao estímulo sofrido, acionando mecanismos de reparo e rotas compensatórias, o que poderia explicar o fato da repressão de MAPK, após à exposição à *trans*-chalcona, ser observada ao longo do tempo.

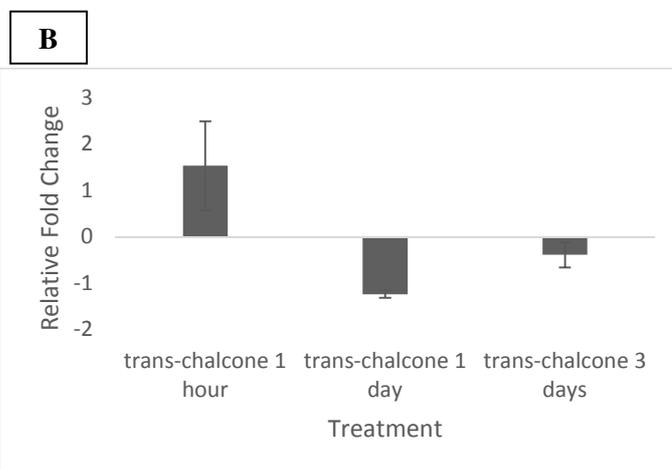
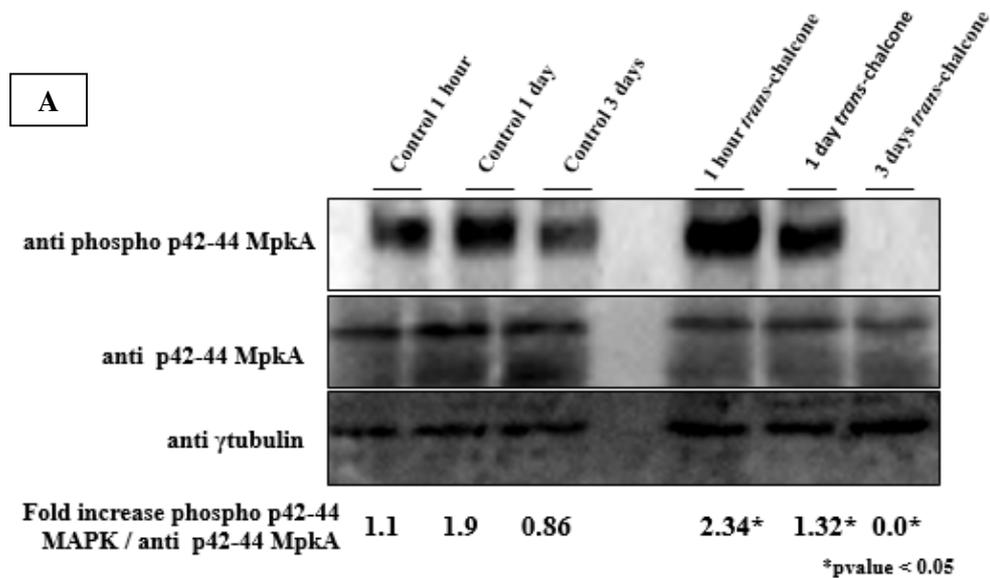


Figura 11: A) Western blot realizado para quantificar a produção e a fosforilação da proteína MAPK p42-44 de *T. rubrum* cultivado em Meio Mínimo adicionado de 0, 24 $\mu\text{g/mL}$ de *trans*-chalcona ou ausente (controle) em 1 à 3 dias. A γ -tubulina foi utilizada como normalizador, e o *fold change* foi obtido pela relação de MAPK fosforilado pelo anticorpo MAPK total. B) Expressão gênica por PCR quantitativo de CMGC/MAPK Erk1 de *T. rubrum* cultivado em meio mínimo adicionado de 0, 24 $\mu\text{g/mL}$ de *trans*-chalcona ou ausente (controle) em 1 à 3 dias. O calibrador foi representado pela mesma condição sem droga.

Os genes modulados de *T. rubrum* envolvidos com transdução de sinais foram submetidos à análise de rede de interação, realizada pela ferramenta *String* (<http://string-db.org/>), sendo observado que entre os transdutores modulados nesse trabalho, a proteína de ligação GTP (TERG_01365) pode interagir com gene codificador de Topo II (score de 0,795), como demonstrado na Figura 12.

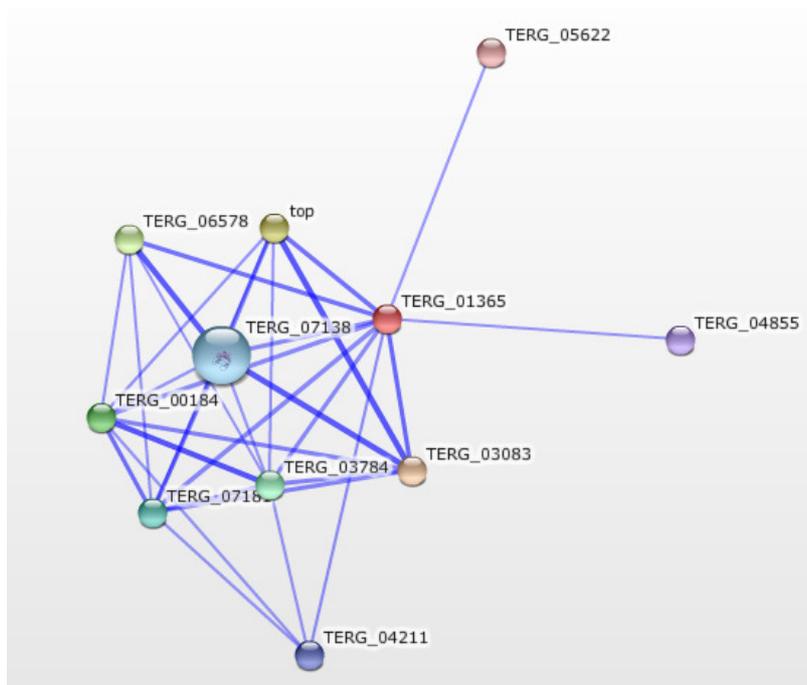


Figura 12: Rede de interação gerada pelo software string, gerado a partir do gene codificador de GTP binding protein (TERG_01365) modulado por *T. rubrum* após a exposição à chalcona. Os genes da via de interação são genes do banco de dados do “string”.

Essa rede de interação sugere que as atividades biológicas das chalconas nas células eucarióticas de fungos e mamíferos possam ser decorrentes da sua ação sobre vias de transdução de sinais. No caso da atividade sobre a enzima topo II, trabalho realizado por Silva et al., (2013), verificaram a repressão significativa do gene topo 2a em células caninas durante o tratamento com *trans*-chalcona e metoxi-chalcona. Além disso, dados da literatura têm apontado alvos do câncer modulados por diferentes chalconas, entre eles a ação sobre kinases da família CDK, a inibição de topo isomerase e aumento da expressão de p21, que estão entre os responsáveis pelo arraste no ciclo celular e desencadeamento de sinais de apoptose. Paralelamente, o fator de transcrição STAT3, que é ativado por tirosina kinases e que exerce múltiplos papéis na transformação maligna do câncer como na angiogênese, no crescimento celular e inflamação através do aumento da expressão Bcl2, VEGF, ciclina D1, parece ser inibido após o tratamento com licochalcona em células de leucemia. (FUNAKOSHI-TAGO et al., 2008).

5.4 VALIDAÇÃO DOS DADOS DE MICROARRANJO

Os dados de microarranjo foram validados utilizando a técnica de RT-PCR quantitativo. Foram selecionados 14 genes para analisar os genes modulados por *T. rubrum* durante seu crescimento sobre elastina e queratina (Figura 13) e em resposta à *trans*-chalcona (Figura 14). Os genes validados codificam proteases, enzimas envolvidas na síntese de parede celular, metabolismo de lipídios e de aminoácidos, transporte de drogas e diferenciação celular. Esses genes foram selecionados baseados nos alvos de ação das chalconas, como a síntese de ácido graxo e parede celular (fatty acid acetyl transferase, farnesyl transferase, chitin synthase) e resistência a drogas (TruMDR2) e também nos genes já descritos envolvidos nos processos de infecção (Mep2, Mep4, Lap1). Genes não descritos no mecanismo de ação das chalconas e de infecção também foram selecionados para a validação por RT-PCR quantitativo devido a sua alta modulação. Em geral, houve boa correlação entre os dados de microarranjo e os experimentos de RT-PCR quantitativo. Dos 18 genes selecionados na análise de microarranjo, 14 apresentaram correlação no RT-PCR quantitativo (78%). O gene Lap1 (aminopeptidase leucina) induzido na presença de queratina e elastina (condição de infecção) e o gene fatty acid acetyl transferase que foi reprimido na presença de *trans*-chalcona foram selecionados para os experimentos de rompimento gênico.

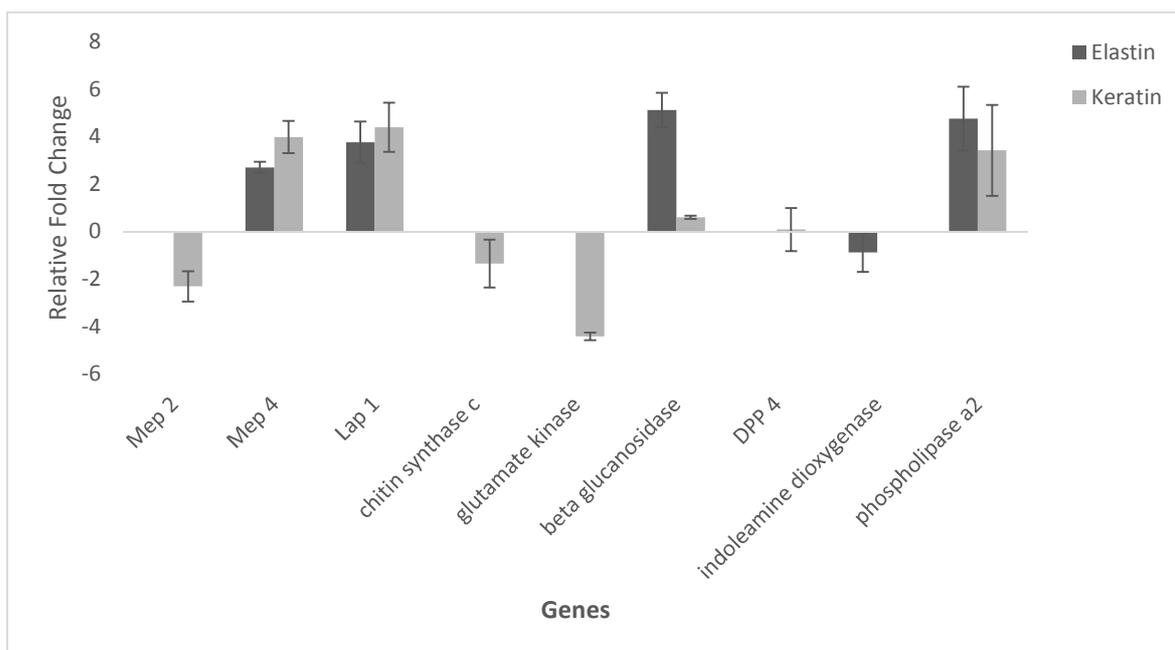


Figura 13: Modulação da expressão gênica de *T. rubrum* CBS118892 crescido sobre elastina e queratina. (Referência de modulação: condição MM)

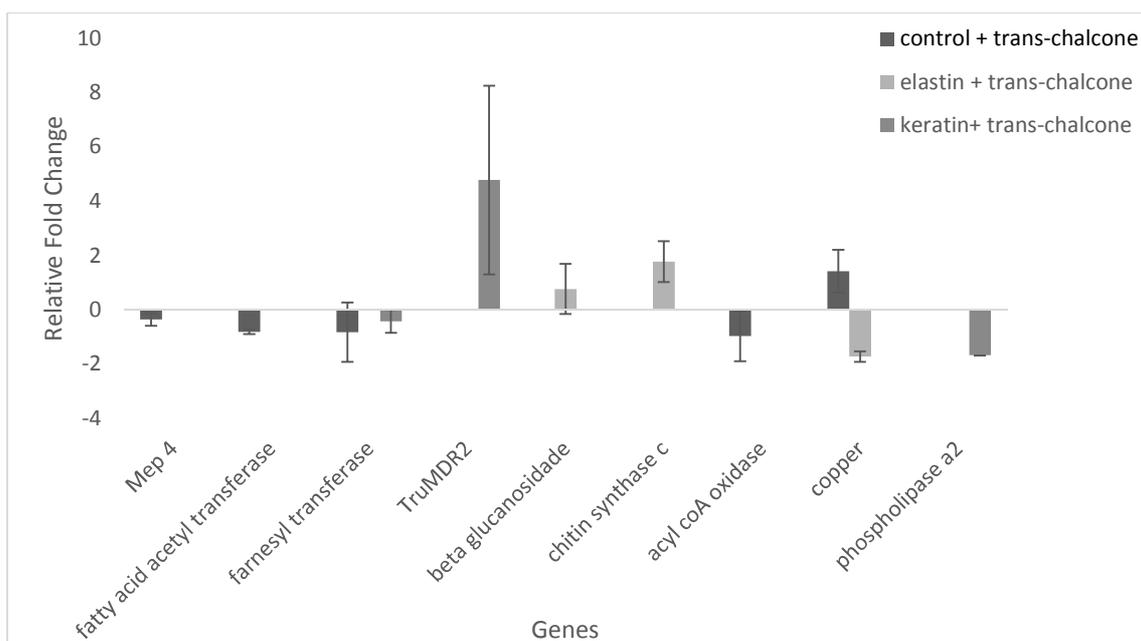


Figura 14 Modulação da expressão gênica de *T. rubrum* CBS118892 após a exposição à *trans*-chalcona. (Referência de modulação: MM, MME ou MMQ).

5.5 GERAÇÃO DE LINHAGEM DE MUTANTE NULO PARA O GENE ÁCIDO GRAXO SINTASE ACETIL TRANSFERASE (FAC)

Foram obtidas 50 colônias após a transformação com o cassete de deleção para o gene da ácido graxo sintase acetil transferase (FAC) .

Para a seleção dos transformantes obtidos para construção Δ FAC foi utilizado meio mínimo adicionado de soro bovino, isso devido ao fato da síntese endógena de ácidos graxos ser importante para a sobrevivência do fungo em situações de auxotrofia. A suplementação do meio com soro foi uma alternativa favorável para a recuperação de transformantes em meio de cultura restrito.

Placas mestras contendo meio mínimo contendo higromicina adicionado de ácido palmítico e ácido palmítico + *trans*-chalcona foram realizadas com o intuito de rastrear os possíveis mutantes nulos para o gene ácido graxo acetil transferase. Em um primeiro momento foram comparadas as colônias entre meio mínimo e meio mínimo + ácido palmítico. O meio de cultura foi suplementado com ácido palmítico pois ele é o produto final da FAS . A perda de função do gene que codifica a ácido graxo sintase acetil transferase (FAC) poderia interferir na síntese de ácido graxo. Em seguida, a comparação foi feita com o meio contendo ácido palmítico +*trans*-chalcona, acreditando-se que os mutantes nulos poderiam apresentar diferenças de susceptibilidade à esse composto, uma vez que o gene da ácido graxo acetil transferase foi reprimido nos dados de microarranjo na presença de *trans*-chalcona, indicando um possível alvo desse antifúngico. Os transformantes que apresentaram um perfil de crescimento que se destacou nessas comparações foram F7, F10, F15, F18, F22, F29, F4t, F46 e F48. (Figura 15 e Figura 16)

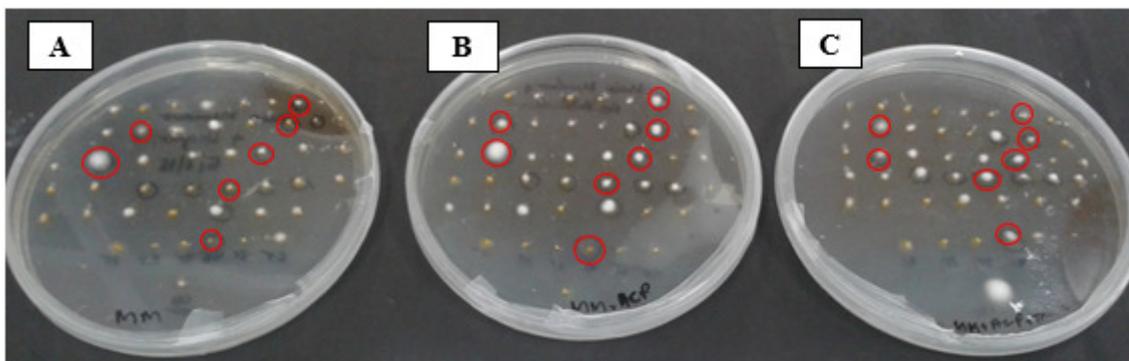


Figura 15: Cultivo das colônias obtidas na transformação com o cassete de deleção do gene FAC. Transformantes: F1-F39, F1t-F4t, após 13 dias de incubação. A) meio mínimo B) meio mínimo + ácido palmítico (0,01%), C) meio mínimo + ácido palmítico + *trans*-chalcona (0,24 µg/mL). Círculos vermelhos indicam colônias com maior crescimento para ácido palmítico e/ou ácido palmítico +*trans*-chalcona.

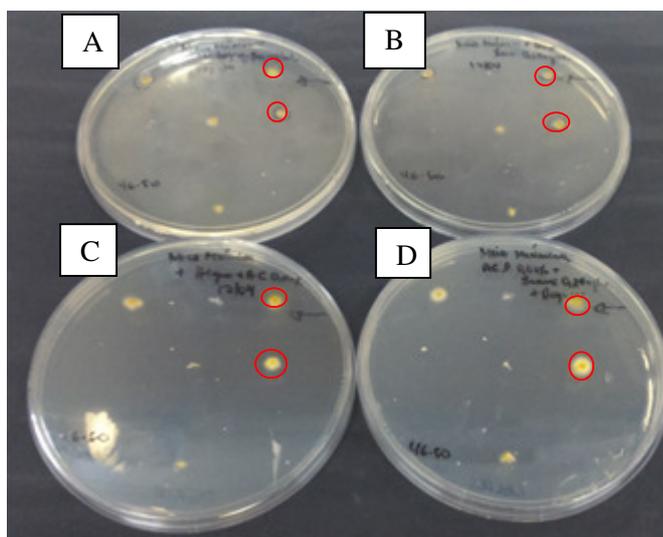


Figura 16: Cultivo das colônias de transformantes F46-F50 pós 14 dias de incubação. A) meio mínimo , B) meio mínimo +*trans*-chalcona (0,24 µg/mL), C) meio mínimo + ácido palmítico (0,01%), D) meio mínimo + ácido palmítico (0,01%) + *trans*-chalcona (0,24 µg/mL). Círculos vermelhos indicam colônias que apresentaram maior crescimento para meio contendo ácido palmítico e/ou ácido palmítico + *trans*-chalcona.

5.6 ANÁLISE DOS TRANSFORMANTES OBTIDOS POR REAÇÕES DE PCR

As reações de PCR foram feitas para os transformantes selecionados a partir das observações realizadas nas placas-mestras. O gene de resistência à higromicina foi amplificado para as transformantes Δ FAC (18), Δ FAC (4t), Δ FAC (46) e Δ FAC (48) (Figura 17) Como controle de amplificação do gene de higromicina foi utilizado o plasmídeo PSCN43. “Primers” sintetizados para cobrir a região da construção Δ FAC foram usados na PCR para os transformantes positivos para o gene de higromicina, e um dos transformantes apresentou amplificação positiva para essa região de cobertura. (Figura 18)

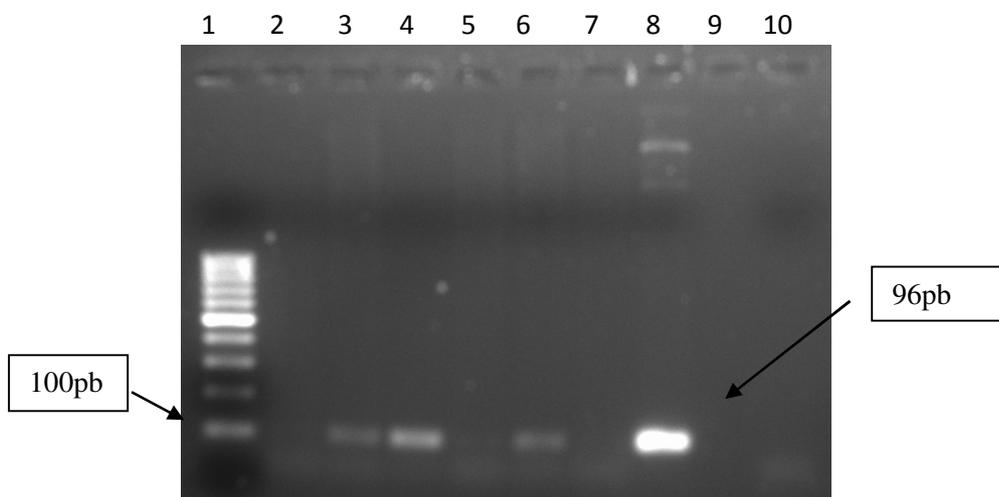


Figura 17: Eletroforese em gel de agarose 2%, referente a amplificação do gene de higromicina (96pb). 1) marcador de 100 pb (Fermentas®), 2) Linhagem CBS 118892, 3) Δ FAC(18), 4) Δ FAC (4t), 5) Δ FAC (46), 6) Δ FAC (48), 7) -, 8) pSCN43 , 9) -, 10) branco.

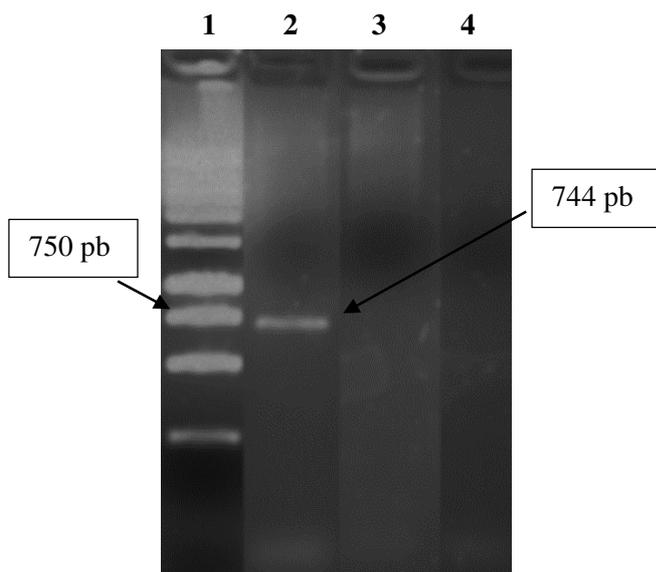


Figura 18: Eletroforese em gel de agarose 1,5% referente a amplificação do cassete de deleção F-AC (744 pb). 1) marcador de peso molecular de 1Kb (Fermentas®), 2) Δ FAC, (18) 3) CBS 118892, 4) branco

Como esperado, a amplificação da região que flanqueia a construção de rompimento foi amplificada apenas no transformante e não foi evidenciada na linhagem CBS, indicando, em associação com os demais dados, a obtenção da linhagem de mutante nulo de ácido graxo acetil transferase, chamada de Δ FAC 18.

5.7 AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES FENOTÍPICAS NA LINHAGEM Δ FAC 18

Sabendo que o gene da F-AC foi modulado em resposta à *trans*-chalcona, o fungo Δ FAC 18 foi submetido ao ensaio de susceptibilidade à esse composto antifúngico através de determinação de concentração inibitória mínima e também através do monitorando do crescimento de “plugs” em meios de cultura contendo concentrações de 24 μ g/mL e 48 μ g/mL de *trans*-chalcona. A figura 19 demonstra o crescimento de *T. rubrum* linhagem CBS118892 e Δ FAC (18) na presença de *trans*-chalcona.

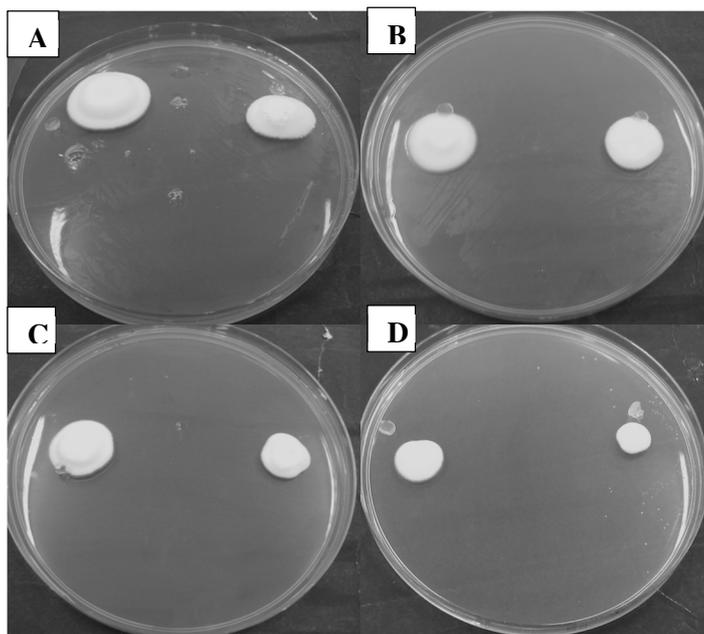


Figura 19: Cultivo da linhagem CBS 118892 e do mutante Δ FAC (18) em meio de cultura adicionado de *trans*-chalcona. A esquerda encontra-se Δ FAC(18) e a direita a linhagem CBS118892 A) Δ FAC (18) e CBS118892 cultivadas em meio Sabouraud contendo 24 μ g/mL de *trans*-chalcona, B) Δ FAC (18) e CBS118892 cultivadas em meio Meio Mínimo contendo 24 μ g/mL de *trans*-chalcona, C) Δ FAC (18) e CBS118892 cultivadas em Meio Sabouraud adicionado de 48 μ g/mL de *trans*-chalcona, D) Δ FAC (18) e CBS118892 cultivadas em Meio Mínimo adicionado de 48 μ g/mL de *trans*-chalcona.

Observa-se claramente que a linhagem Δ FAC 18 desenvolveu maior resistência à *trans*-chalcona quando comparada à linhagem CBS 118892, o que também foi observado pela determinação de CIM, que foi 2 vezes superior para linhagem F18.

Além disso, o crescimento de Δ FAC (18) e CBS 118892 foi monitorado em meio mínimo adicionado de diferentes fontes de ácidos graxos: ácido palmítico (C16 saturado), ácido mirístico (C14 saturado) e ácido oleico (C18 insaturado), como mostrado na Figura 20. Foi utilizada como controle *T. rubrum* transformado com o plasmídeo PSCN43.

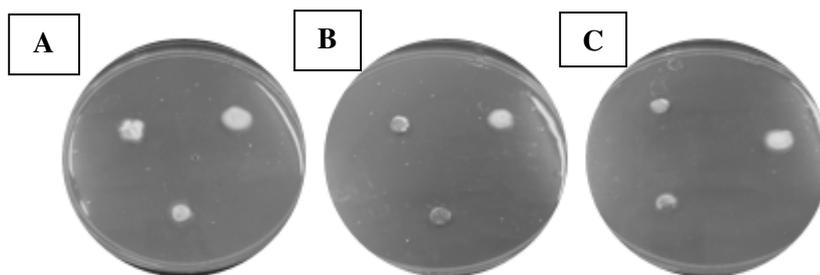


Figura 20: Monitoramento do crescimento de *T. rubrum* : PSCN(esquerda), Δ FAC (18) (direita) e CBS118892 (abaixo) em Meio Mínimo + ácido palmítico 0,01% (A), Meio Mínimo + ácido mirístico 0,01% (B) e Meio Mínimo + ácido oleico 0,01% (C) depois de 7 dias de incubação. Higromicina na concentração de 500 μ g/mL foi utilizada em todos os meios de cultivo analisados.

A partir dessa análise, pode-se observar que Δ FAC (18) apresenta um crescimento discretamente superior as demais linhagens nos meios contendo ácido mirístico e ácido oleico, e um notável destaque para seu desenvolvimento é observado no meio suplementado com ácido palmítico, que é o produto final da síntese realizada pelo complexo enzimático da FAS. O diâmetro do crescimento para Δ FAC (18) tanto para suplementação com ácido mirístico como para oleico foi de 1,7 cm, nesses mesmos ácidos graxos a linhagem CBS118892 e o transformante PSCN43 apresentaram um diâmetro de 1,2 cm, em média. No entanto, na presença de ácido palmítico, Δ FAC(18) apresentou um diâmetro de 2,05 cm e as linhagem CBS e o transformante PSCN43 mostraram diâmetros de 1,3 cm e 1,5 cm, respectivamente. Esses dados podem sugerir alguma auxotrofia apresentada pelo Δ FAC(18).

5.8 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE Δ FAC (18) EM FRAGMENTOS DE UNHAS

Trabalhos da literatura têm demonstrado que a disrupção de genes importantes para a patogenicidade de dermatófitos acarretam na diminuição da capacidade desses fungos em crescerem sobre fragmentos de unhas. (FERREIRA-NOZAWA. et al., 2006). Dessa forma, a Figura 21 retrata o crescimento de Δ FAC(18) e CBS118892 em fragmentos de unhas como única fonte de carbono e nitrogênio.

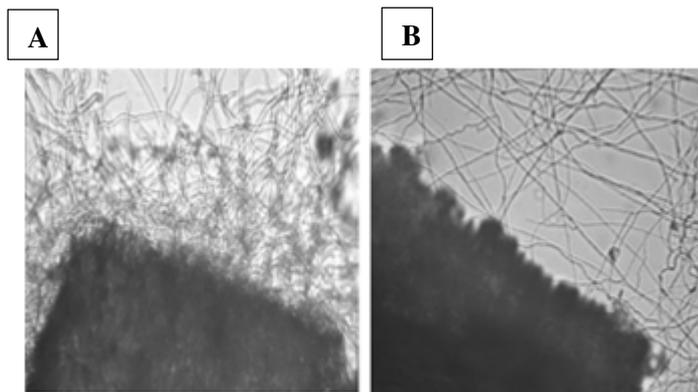


Figura 21: Comparação entre o crescimento da linhagem CBS118892 (A) e Δ FAC18 (B) em fragmentos de unhas. Efeito observado por microscopia óptica após 3 dias da incubação de conídios a 28°C. Objetos escuros observados na parte esquerda inferior correspondem aos fragmentos de unhas.

Nota-se que a linhagem Δ FAC (18) apresentou uma diminuição de crescimento sobre as unhas quando comparado à linhagem CBS118892, além disso, as hifas desenvolvidas apresentaram –se mais finas e alongadas. É conhecido que espécies de dermatófitos que desenvolvem hifas finas e longas apresentem menor capacidade queratinolítica do que os que desenvolvem hifas alargadas e achatadas, os quais são considerados com potencial atividade degradadora. (FILIPELLO-MARCHISIO et al, 1994)

VI CONCLUSÃO

O perfil transcricional de *T. rubrum* foi em geral similar nas duas fontes proteicas estudadas com algumas nuances, relacionadas à maior atividade proteolítica observada para queratina em comparação com a elastina, com destaque para as proteases Mep 4 e Lap 1, e também referente à indução das chaperonas HSP70-like, HSP88-like e HSP 90-like durante o crescimento de *T. rubrum* em queratina.

A *trans*-chalcona modulou genes referentes ao metabolismo energético, reprimindo genes envolvidos com a síntese de lipídios e induzindo genes pertencentes às vias de geração de energia alternativas como beta oxidação de ácidos graxos e ciclo do glioxilato. Paralelamente, esse composto modulou genes transdutores de sinais, relacionados com integridade de parede celular, o que possibilitou a descrição de um modelo hipotético desse mecanismo em *T. rubrum*. A atividade de *trans*-chalcona sobre genes transdutores envolvidos com CWI foi confirmada pelos experimentos de fosforilação da MAPK.

O gene FAC (ácido graxo acetil transferase) está envolvido com a atividade antifúngica de *trans*-chalcona, parece ser fundamental para síntese endógena de ácidos graxos e possivelmente para a virulência de *T. rubrum*, porque o mutante Δ FAC (18) mostrou-se mais resistente à *trans*-chalcona, apresentou uma diminuição de crescimento em fragmentos de unhas e maior desenvolvimento com a suplementação de ácido palmítico.

Dessa forma, a *trans*-chalcona mostra-se como um potencial composto antifúngico contra *T. rubrum*, e seu modo de ação parece estar envolvido com a síntese de ácidos graxos e metabolismo energético com interferências sobre a parede celular. Seu múltiplo efeito é considerado atrativo, pois confere à esse composto maior eficácia e diminuição de surgimento de linhagens fúngicas com resistência.

REFERÊNCIAS

ACHTERMAN, R. R.; WHITE, T. C. Dermatophyte Virulence Factors: Identifying and Analyzing Genes That May Contribute to Chronic or Acute Skin Infections. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, p. 1–8, 2012.

AGARWAL, A. K. Genome-wide Expression Profiling of the Response to Polyene, Pyrimidine, Azole, and Echinocandin Antifungal Agents in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 37, p. 34998–35015, 2003.

AMEEN, M. Epidemiology of superficial fungal infections. **Clinics in Dermatology**, v. 28, n. 2, p. 197–201, 2010.

ASHBURNER, M.; BALL, C. A.; BLAKE, J. A. Gene Ontology: tool for the unification of biology. **Nature Genetics**, v. 25, n. 1, p. 25–29, 2000.

BAEZA, L. C. et al. cDNA representational difference analysis used in the identification of genes expressed by *Trichophyton rubrum* during contact with keratin. **Microbes and Infection / Institut Pasteur**, v. 9, n. 12-13, p. 1415–21, 2007.

BALDO, A. et al. Mechanisms of skin adherence and invasion by dermatophytes. **Mycoses**, v. 55, p. 218–223, 2012.

BARRERA, A. et al. Analysis of the Protein Domain and Domain Architecture Content in Fungi and Its Application in the Search of New Antifungal Targets. **PLoS Computational Biology**, v. 10, n. 7, p. e1003733, 2014.

BATOVSKA, D. I.; TODOROVA, I. T. Trends in utilization of the pharmacological potential of chalcones. **Current clinical pharmacology**, v. 5, p. 1–29, 2010.

BERGOLD, A. M., GEORGIADS, S. Novidades em fármacos antifúngicos: uma revisão new antifungic drugs: a review. **Visão Acadêmica**, v. 5, p. 159–172, 2004.

BITENCOURT, T. A. et al. Trans-chalcone and quercetin down-regulate fatty acid synthase gene expression and reduce ergosterol content in the human pathogenic dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **BMC Complement Altern Med**, v. 13, p. 229, 2013.

BOECK, P. et al. Antifungal activity and studies on mode of action of novel xanthoxyline-derived chalcones. **Archiv der Pharmazie**, v. 338, n. 2-3, p. 87–95, 2005.

BROUTA, F. et al. Secreted metalloprotease gene family of *Microsporum canis*. **Infection and immunity**, v. 70, n. 10, p. 5676–83, 2002.

BROWN, A. K. et al. Flavonoid inhibitors as novel antimycobacterial agents targeting Rv0636, a putative dehydratase enzyme involved in *Mycobacterium tuberculosis* fatty acid synthase II. **Microbiology**, v. 153, n. 10, p. 3314–3322, 2007.

BURMESTER, A. et al. Comparative and functional genomics provide insights into the pathogenicity of dermatophytic fungi. **Genome Biology**, v. 12, n. 1, p. R7, 2011.

BURNIE, J. P. et al. Fungal heat-shock proteins in human disease. **FEMS Microbiol Rev**, v. 30, n. 1, p. 53–88, 2006.

BUTTS, A.; KRYSAN, D. J. Antifungal drug discovery: something old and something new. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 9, p. e1002870, 2012.

CAMPBELL, A. W.; ANYANWU, E. C.; MORAD, M. Evaluation of the drug treatment and persistence of onychomycosis. **TheScientificWorldJournal**, v. 4, p. 760–777, 2004.

CERVELATTI, E. P. et al. Electrophoretic molecular karyotype of the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 1, p. 99–102, 2004.

CHAYAKULKEEREE, M. et al. Fatty acid synthesis is essential for survival of *Cryptococcus neoformans* and a potential fungicidal target. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 10, p. 3537–45, 2007.

CHEN, J. et al. Substrate adaptation of *Trichophyton rubrum* secreted endoproteases. **Microbial Pathogenesis**, v. 48, n. 2, p. 57–61, 2010.

CHEN, S. C. A; SORRELL, T. C. Antifungal agents. **The Medical journal of Australia**, v. 187, n. 7, p. 404–409, 2007.

CHINELLI, P. A V et al. Dermatophyte agents in the city of São Paulo, from 1992 to 2002. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 45, n. 5, p. 259–263, 2003.

CLSI, PROTOCOLO 38A. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica dos Fungos Filamentosos** :. v. 22, 2002.

COVE, D. J. The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology and Biological Oxidation**, v. 113, n. 1, p. 51–56, 1966.

DA SILVA, B. C. M. et al. Dermatophytosis and immunovirological status of HIV-infected and AIDS patients from Sao Paulo city, Brazil. **Mycoses**, v. 57, n.6 p.371-376 , 2014.

DELLEY, P. A.; HALL, M. N. Cell wall stress depolarizes cell growth via hyperactivation of RHO1. **Journal of Cell Biology**, v. 147, n. 1, p. 163–174, 1999.

DUTCHER, J. D. The discovery and development of amphotericin B. **Diseases of the chest**, v. 54, p. Suppl 1:296–298, 1968.

ELEWSKI, B.; TAVAKKOL, A. Safety and tolerability of oral antifungal agents in the treatment of fungal nail disease: a proven reality. **Therapeutics and clinical risk management**, v. 1, n. 4, p. 299–306, 2005.

FACHIN, A. L. et al. Role of the ABC transporter TruMDR2 in terbinafine, 4-nitroquinoline N-oxide and ethidium bromide susceptibility in *Trichophyton rubrum*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. 8, p. 1093–1099, 2006.

FACHIN, A. L.; MAFFEI, C. M.; MARTINEZ-ROSSI, N. M. In vitro susceptibility of *Trichophyton rubrum* isolates to griseofulvin and tioconazole. Induction and isolation of a resistant mutant to both antimycotic drugs. Mutant of *Trichophyton rubrum* resistant to griseofulvin and tioconazole. v. 135, n. 3, p. 141–143, 1996.

FANG, Y. et al. A genomewide screen in *Schizosaccharomyces pombe* for genes affecting the sensitivity of antifungal drugs that target ergosterol biosynthesis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 4, p. 1949–1959, 2012.

FERREIRA-NOZAWA, M. S. et al. The pH signaling transcription factor PacC mediates the growth of *Trichophyton rubrum* on human nail in vitro. **Medical Mycology**, v.44, p.641-645, 2006.

FILIPELLO-MARCHISIO V, FUSCONI A, RIGO S. Keratinolysis and its morphological expression in hair digestion by airborne fungi. **Mycopathologia**, v. 127 ,p. 103-115, 1994.

FRADIN, C. et al. Stage-specific gene expression of *Candida albicans* in human blood. **Molecular microbiology**, v. 47, n. 6, p. 1523–43, 2003.

FUNAKOSHI-TAGO, M. et al. Licochalcone A is a potent inhibitor of TEL-Jak2-mediated transformation through the specific inhibition of Stat3 activation. **Biochemical Pharmacology**, v. 76, n. 12, p. 1681–1693, 2008.

GHANNOUM, M. A.; RICE, L. B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 501–517, 1999.

GODOY-MARTINEZ, P. et al. Onychomycosis in São Paulo, Brazil. v. 168, n. 3, p. 111–116, 2009.

GRAYBILL, J. R. Systemic antifungal drugs. **Revista Iberoamericana de Micologia**, p. 168–173, 2000.

GRUMBT, M.; MONOD, M.; STAIB, P. Genetic advances in dermatophytes. **FEMS microbiology letters**, v. 320, n. 2, p. 79–86, 2011.

HANKS, S. K.; HUNTER, T. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 9, n. 8, p. 576–96, 1995.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical biochemistry**, v. 48, n. 2, p. 422–427, 1972.

HATA, K. et al. Efficacy of Oral E1210, a New Broad-Spectrum Antifungal with a Novel Mechanism of Action, in Murine Models of Candidiasis, Aspergillosis, and Fusariosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 10, p. 4543–4551, 2011.

HURTADO, C. A.; RACHUBINSKI, R. A. MHY1 encodes a C2H2-type zinc finger protein that promotes dimorphic transition in the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Journal of bacteriology**, v. 181, n. 10, p. 3051–7, 1999.

JACOB, T. R. et al. Heat Shock Protein 90 (Hsp90) as a Molecular Target for the Development of Novel Drugs Against the Dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. November, p. 1–10, 2015.

JENNI, S. et al. Architecture of a fungal fatty acid synthase at 5 Å resolution. **Science (New York, N.Y.)**, v. 311, n. 5765, p. 1263–1267, 2006.

JOUSSON, O. et al. Secreted subtilisin gene family in *Trichophyton rubrum*. **Gene**, v. 339, p. 79–88, 2004.

KANEHISA, M.; GOTO, S. KEGG: Kyoto Encyclopaedia of Genes and Genomes. **Nucl. Acids Res.**, v. 28, n. 1, p. 27–30, 2000.

KASPEROVA, A.; KUNERT, J.; RASKA, M. The possible role of dermatophyte cysteine dioxygenase in keratin degradation. **Medical Mycology**, v. 51, n. 5, p. 449–454, 2013.

KAUFMAN, G. et al. Green fluorescent protein (GFP) as a vital marker for pathogenic development of the dermatophyte *Trichophyton mentagrophytes*. **Microbiology**, v. 150, n. 8, p. 2785–2790, 2004.

KAUFMAN, G. et al. Markers for host-induced gene expression in *Trichophyton dermatophytosis*. **Infect Immun**, v. 73, n. 10, p. 6584–6590, 2005.

KITAMURA, A. et al. Discovery of a Small-Molecule Inhibitor of β -1,6-Glucan Synthesis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. 670–677, 2009.

KNECHTLE, P. et al. The natural diene-furan fatty acid EV-086 is an inhibitor of fungal delta-9 fatty acid desaturation with efficacy in a model of skin dermatophytosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 1, p. 455–466, 2014.

KOMOTO, T. T. et al. Gene Expression Response of *Trichophyton rubrum* during Coculture on Keratinocytes Exposed to Antifungal Agents. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** v. 2015, 2015.

KUNERT, J. Physiology of keratinophilic fungi. **Revista Iberoamericana de Micología**, p. 77–85, 2000.

ŁĄCZKA, I. et al. Antifungal action of the oxathiolone-fused chalcone derivative. **Mycoses**, v. 54, n. 5, p. e407–14, 2011.

LAMOKE, F. et al. Trans-Chalcone prevents VEGF expression and retinal neovascularization in the ischemic retina. **Experimental eye research**, v. 93, n. 4, p. 350–4, 2011.

LEVIN, D. E. Cell Wall Integrity Signaling in *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall Integrity Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 69, n. 2, p. 262–291, 2005.

LEWIS, R. E. Current concepts in antifungal pharmacology. **Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic**, v. 86, n. 8, p. 805–817, 2011.

LIU, H. et al. Fatty acid synthase inhibitors from *Geum japonicum* Thunb. var. *chinense*. **Chemistry & biodiversity**, v. 6, n. 3, p. 402–10, 2009.

LIU, T. et al. Analysis of gene expression changes in *Trichophyton rubrum* after skin interaction. **Journal of medical microbiology**, v. 63, n. Pt 5, p. 642–8, 2014.

LIU, T. T. et al. Genome-Wide Expression Profiling of the Response to Azole , Polyene , Echinocandin , and Pyrimidine Antifungal Agents in *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 49, n. 6, p. 2226–2236, 2005.

LORENZ, M. C.; FINK, G. R. The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. **Nature** v. 536, n. 2000, p. 83–86, 2001.

MAIER, T.; JENNI, S.; BAN, N Architecture of mammalian fatty acid synthase at 4.5Å^o resolution. v. 1258, n. 2006, p. 1258–1263, 2006.

MARANHÃO, F. C. A.; PAIÃO, F. G.; MARTINEZ-ROSSI, N. M. Isolation of transcripts over-expressed in human pathogen *Trichophyton rubrum* during growth in keratin. **Microbial Pathogenesis**, v. 43, n. 4, p. 166–172, 2007.

MARTINEZ, D. A. et al. Comparative genome analysis of *Trichophyton rubrum* and related dermatophytes reveals candidate genes involved in infection. **mBio**, v. 3, n. 5, p. e00259–12–e00259–12, 2012.

MARTINEZ-ROSSI, N. M.; PERES, N. T. A.; ROSSI, A. Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 166, n. 5-6, p. 369–83, 2008.

MONOD, M. et al. Secreted proteases from pathogenic fungi. **International journal of medical microbiology : IJMM**, v. 292, n. 5-6, p. 405–419, 2002.

MONOD, M. Secreted proteases from dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 166, n. 5-6, p. 285–294, 2008.

MUKHERJEE, P. K. et al. Clinical *Trichophyton rubrum* strain exhibiting primary resistance to terbinafine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 1, p. 82–86, 2003.

NAJAFIAN, M. et al. Core structure of flavonoids precursor as an antihyperglycemic and antihyperlipidemic agent: an in vivo study in rats. **Acta biochimica Polonica**, v. 57, n. 4, p. 553–60, 2010.

NEGRI, M. et al. Early state research on antifungal natural products. **Molecules**, v. 19, n. 3, p. 2925–2956, 2014.

NIR-PAZ, R. et al. Deep Infection by *Trichophyton rubrum* in an Immunocompromised Patient. **CASE REPORTS Deep Infection by Trichophyton rubrum in an Immunocompromised Patient. Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 11, p. 5298–5301, 2003.

NIU, Y. et al. 3,5,2,4-Tetrahydroxychalcone, a new non-purine xanthine oxidase inhibitor. **Chemico-Biological Interactions**, v. 189, n. 3, p. 161–166, 2011.

NOORBAKHSR, R. ET AL. Molecular Characterization of GTP Binding Protein Gene in Dermatophyte Pathogen *Trichophyton rubrum*. **Iranian Journal Health**, v. 8, n. 1, p. 223–230, 2011.

PARKS, L. W.; SMITH, S. J.; CROWLEY, J. H. Biochemical and physiological effects of sterol alterations in yeast - A review. **Lipids**, v. 30, n. 3, p. 227–230, 1995.

PERES, N.T. A.; ROSSI, A. Dermatofitos : interação patógeno-hospedeiro e resistência a antifúngicos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 5, p. 657–667, 2010.

PERES, N. T. A et al. Transcriptional profiling reveals the expression of novel genes in response to various stimuli in the human dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **BMC microbiology**, v. 10, p. 39, 2010.

PIGATTO, M. C. et al. Farmacocinética dos novos antifúngicos de uso sistêmico utilizados em pacientes imunocomprometidos. **Pharmacokinetics of new systemic antifungal drugs used in immunocompromised patients. Rev. Bras. Farm. Rev. Bras. Farm**, v. 90, n. 901, p. 86–94, 2009.

PILATOVA, M. et al. In vitro antiproliferative and antiangiogenic effects of synthetic chalcone analogues. **Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA**, v. 24, n. 5, p. 1347–55, 2010.

POIRIER, Y. et al. Peroxisomal β -oxidation—A metabolic pathway with multiple functions. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1763, n. 12, p. 1413–1426, 2006.

POPOLO, L.; GUALTIERI, T.; RAGNI, E. The yeast cell-wall salvage pathway. **Medical mycology: official publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 39 Suppl 1, p. 111–121, 2001.

PRACHAROENWATTANA, I.; CORNAH, J. E.; SMITH, S. M. Arabidopsis Peroxisomal Citrate Synthase Is Required for Fatty Acid Respiration and Seed Germination. v. 17, n. July, p. 2037–2048, 2005.

RAHMAN, M. A. Chalcone : A Valuable Insight into the Recent Advances and Potential. **Chem. Sci. J.**, v. 2011, n. 3, p. CSJ–29, 2011.

RYDER, N. S.; MIETH, H. Allylamine antifungal drugs. **Current topics in medical mycology**, v. 4, p. 158–88, jan. 1992.

SANGAMWAR, A. T.; DESHPANDE, U. D.; PEKAMWAR, S. S. Antifungals: need to search for a new molecular target. **Indian journal of pharmaceutical sciences**, v. 70, n. 4, p. 423–430, 2008.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature methods**, v. 9, n. 7, p. 671–5, jul. 2012.

SCHWEIZER, E.; HOFMANN, J. Microbial type I fatty acid synthases (FAS): major players in a network of cellular FAS systems. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 68, n. 3, p. 501–517, 2004.

SEEBACHER, C.; BOUCHARA, J. P.; MIGNON, B. Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. n. 5-6, 2008.

SILVA, G. et al. In vitro action of flavonoids in the canine malignant histiocytic cell line DH82. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 18, n. 12, p. 15448–63, 2013.

SILVEIRA, H. C. S. et al. Transcriptional profiling reveals genes in the human pathogen *Trichophyton rubrum* that are expressed in response to pH signaling. **Microbial pathogenesis**, v. 48, n. 2, p. 91–6, 2010.

SILVEIRA-GOMES, F. et al. Dermatophytosis diagnosed at the Evandro Chagas Institute, Pará, Brazil. **Brazilian journal of microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 44, n. 2, p. 443–6, 2013.

STAIB, P. et al. Differential gene expression in the pathogenic dermatophyte *Arthroderma benhamiae* in vitro versus during infection. **Microbiology (Reading, England)**, v. 156, n. Pt 3, p. 884–95, 2010.

ŠTEFANIŠINOVÁ, M. et al. Study of DNA interactions with cyclic chalcone derivatives by spectroscopic techniques. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 81, p. 666–671, 2011.

STRIJBIS, K.; DISTEL, B. Intracellular acetyl unit transport in fungal carbon metabolism. **Eukaryotic Cell**, v. 9, n. 12, p. 1809–1815, 2010.

SUPEK, F. et al. REVIGO Summarizes and Visualizes Long Lists of Gene Ontology Terms. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, p. e21800, 2011.

TAINWALA, R.; SHARMA, Y. Pathogenesis of dermatophytoses. **Indian journal of dermatology**, v. 56, n. 3, p. 259–261, 2011.

VANDEPUTTE, P.; FERRARI, S.; COSTE, A. T. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. **International journal of microbiology**, v. 2012, p. 713687, 2012.

VÊNICIO, R. Z. N. et al. BayGO: Bayesian analysis of ontology term enrichment in microarray data. **BMC bioinformatics**, v. 7, p. 86, 2006.

VERMOUT, S. et al. Pathogenesis of Dermatophytosis. **Mycopathologia**, v. 166, n. 5-6, p. 267–275, 2008.

WALKER, S. S. et al. Discovery of a novel class of orally active antifungal beta-1,3-D-glucan synthase inhibitors. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 11, p. 5099–5106, 2011.

WANG, L. et al. Analysis of the dermatophyte *Trichophyton rubrum* expressed sequence tags. **BMC genomics**, v. 7, p. 255, 2006.

WARNOCK, D. W. Amphotericin B: an introduction. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 28 Suppl B, p. 27–38, 1991.

WEITZMAN, I.; SUMMERBELL, R. The dermatophytes. **Clinical microbiology reviews**, v. 8, n. 2, p. 240–259, 1995.

WHITE, T. C. et al. Generating and testing molecular hypotheses in the dermatophytes. **Eukaryotic cell**, v. 7, n. 8, p. 1238–45, 2008.

WILSON, D. et al. Identifying infection-associated genes of *Candida albicans* in the postgenomic era. **FEMS Yeast Research**, v. 9, n. 5, p. 688–700, 2009.

YU, L. et al. Global gene expression of *Trichophyton rubrum* in response to PH11B, a novel fatty acid synthase inhibitor. **Journal of applied microbiology**, v. 103, n. 6, p. 2346–52, 2007.

ZAUGG, C. et al. *Trichophyton rubrum* secreted and membrane-associated carboxypeptidases. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 298, p. 669–682, 2008.

ZAUGG, C. et al. Gene Expression Profiling in the Human Pathogenic Dermatophyte *Trichophyton rubrum* during Growth on Proteins. **Eukaryotic Cell**, v. 8, n. 2, p. 241–250, 2009.

ZDOBNOV, E. M.; APWEILER, R. InterProScan--an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 17, n. 9, p. 847–848, 2001.

ZHAI, L. et al. The antileishmanial activity of novel oxygenated chalcones and their mechanism of action. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 43, p. 793–803, 1999.

ZHANG, W. et al. cDNA microarray analysis of the expression profiles of *Trichophyton rubrum* in response to novel synthetic fatty acid synthase inhibitor PHS11A. **Fungal Genet Biol**, v. 44, n. 12, p. 1252–1261, 2007.

ZHANG, X. et al. Inhibitory Effect of 2,4,2,4-Tetrahydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-chalcone on Tyrosinase Activity and Melanin Biosynthesis. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 32, n. 1, p. 86–90, 2009.

ZHAO, X. et al. Requirement for the *Candida albicans* FAS2 gene for infection in a rat model of oropharyngeal candidiasis. n. 1996, p. 1–6, 1996.