

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

**Análise global do perfil transcricional e *splicing* alternativo no dermatófito
Trichophyton rubrum exposto à doses subinibitórias de ácido undecanóico**

Niege Silva Mendes

Ribeirão Preto – SP

2015

NIEGE SILVA MENDES

**Análise global do perfil transcricional e *splicing* alternativo no dermatófito
Trichophyton rubrum exposto à doses subinibitórias de ácido undecanóico**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
como requisito parcial para obtenção do título
de doutor em Ciências.

Área de concentração: Genética.

Orientador : Prof. Dr. Antonio Rossi Filho

Co-orientadora: Profa. Dra. Nilce Maria
Martinez Rossi

Ribeirão Preto

2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

Mendes, Nieve Silva

Análise do perfil transcricional e *splicing* alternativo no dermatófito *Trichophyton rubrum* exposto à doses subinibitórias de ácido undecanóico. Ribeirão Preto, 2015.

143 p. : il.; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.
Área de concentração: Genética.

Orientador: Prof . Dr. Antonio Rossi Filho

Co-orientadora: Profa. Dra. Nilce Maria Martinez Rossi

Palavras-chave: 1. Dermatófitos. 2. Transcriptoma. 3. Ácido undecanóico. 4. Splicing alternativo. 5. Bioinformática

FICHA DE APROVAÇÃO

Nome: Nieve Silva Mendes

Título: Análise do perfil transcricional e *splicing* alternativo no dermatófito *Trichophyton rubrum* exposto à doses subinibitórias de ácido undecanóico.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Ciências.

Área de concentração: Genética.

Aprovado em: __/__/__

Banca examinadora

Prof. Dr. : _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. : _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. : _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. : _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. : _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

Este projeto foi realizado com o apoio financeiro das seguintes entidades e instituições:

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP/USP

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

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES

Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência - FAEPA
(FMRP/USP)

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Este documento foi elaborado de acordo com:

Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT): NBR 6023, NBR 6024, NBR 6027 e NBR 6028.

Universidade de São Paulo. Sistema Integrado de Bibliotecas. Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: documento eletrônico e impresso Parte I (ABNT), São Paulo, 2009.

Dedico

Ao meu companheiro Gustavo pelo amor, dedicação, apoio e incentivo em todos os meus planos e projetos.

Aos meus pais e irmãos pelo amor incondicional e apoio em todos os momentos, minha eterna gratidão por tudo que fizeram e ainda fazem por mim.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Rossi Filho, pela oportunidade de desenvolvimento pessoal e profissional, por sempre estar aberto a discussões científicas ou conversas pessoais, por me ensinar o árduo caminho da pesquisa, pela paciência nos momentos de dúvidas e erros, por vibrar a cada conquista, pelo incentivo a sempre seguir em frente apesar das dificuldades, por me ensinar que “bioquímica também é cultura”. Muito obrigada por me orientar desde os meus primeiros passos no caminho da pesquisa.

A Profa. Dra. Nilce Maria Martinez Rossi, por me acolher em seu laboratório de portas abertas, por toda estrutura oferecida para desenvolvimento do meu projeto e pelas valiosas contribuições neste projeto.

Aos meus pais pelo apoio, amor sem limites e incentivo em seguir meus objetivos, por me formarem, tudo que sou devo a vocês, não há palavras que expressem meu amor e gratidão por vocês!

Ao meu amado noivo, pelos momentos felizes, por me apoiar em tudo, por ser este companheiro maravilhoso... Minha admiração e amor por você crescem a cada dia.

Aos meus irmãos e sobrinho por todo amor, carinho, amizade e confiança. Por me apoiar nos momentos difíceis e sempre me lembrarem de que estão ao meu lado.

A minha avó Lúcia por ser este exemplo de mulher, pelo amor e tamanha dedicação à nossa família,

Aos companheiros de laboratório que convivi durante os últimos anos: Nalu, Henrique, Jeny, Diana, Juliana, Luciene, Rodrigo Cazzaniga, Gabriela, Tiago, Larissa, Rodrigo Santos, Aline, Elza, Maíra, Ludmila e Lucia. Agradeço-os pelo apoio e colaboração com o ambiente de trabalho. Aprendi muito com vocês.

Aos técnicos do laboratório de bioquímica e biologia molecular Silvinha e Beto pela amizade apoio e presteza.

Aos técnicos do Laboratório de Genética e Biologia Molecular de Fungos Wanderci Massaro, Mendelson Mazucato, Marcos Diogo pelo apoio e ajuda no preparo de materiais, pela amizade e convívio harmonioso.

Ao técnico de informática Pablo Rodrigo Sanches, por me “socorrer” com minhas eternas dúvidas em bioinformática.

Ao Professor Dr. Rafael Silva-Rocha por todo ensinamento em bioinformática e paciência, por toda colaboração e presteza, muito obrigada!

Aos docentes, pós-graduandos e funcionários dos departamentos de Genética e bioquímica da FMRP-USP, pela convivência e amizade.

Aos amigos dentro e fora da USP, por me proporcionarem momentos de diversão e lazer, sem os quais seria impossível seguir em frente.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade e contribuições que serão feitas a este trabalho.

As secretárias do Departamento de Genética Susie, Maria Aparecida, Ana Claudia e Silvia pela atenção, sempre estarem dispostas a ajudar, carinho e amizade dispensados.

À FAPESP, CNPq, CAPES, FAEPA e Pró-Reitoria de Pós-graduação pelos auxílios recebidos.

E a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho. Muito Obrigada!

RESUMO

MENDES, N. S. **Análise global do perfil transcricional e *splicing* alternativo no dermatófito *Trichophyton rubrum* exposto à doses subinibitórias do ácido undecanóico.** Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

O dermatófito *Trichophyton rubrum* é um fungo filamentosos, antropofílico, que invade tecidos queratinizados causando infecções superficiais e cutâneas. Algumas drogas são usadas para o tratamento das dermatofitoses, sendo o ácido undecanóico (AUN) uma delas. O AUN é o mais tóxico dos ácidos graxos saturados de cadeia média, utilizado como medicamento de uso tópico. O estudo de expressão gênica e mecanismos regulatórios são fundamentais para ampliar o conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na resposta à exposição a estes agentes citotóxicos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar os mecanismos moleculares envolvidos no processo adaptativo da exposição ao ácido undecanóico, através da análise global do transcriptoma e mecanismos regulatórios como o processamento alternativo. Para tanto o micélio de *T.rubrum* foi submetido ao ácido undecanóico por 3 e 12 h de exposição, em triplicata biológica, e o RNA resultante foi submetido ao sequenciamento por RNAseq. O sequenciamento gerou aproximadamente 58 milhões de *reads* por biblioteca, as quais foram filtradas e alinhadas com o genoma de referência utilizando-se os *softwares* *FASTQC* e *bowtie2*, respectivamente. A análise de expressão gênica diferencial foi feita por meio do pacote do *Bioconductor* *DESeq* e, para esta análise, foi utilizada a amostra de 0h como referência. Foram identificados 492 genes diferencialmente expressos em resposta ao AUN, sendo 385 e 210 genes modulados em resposta a 3 e 12 horas de exposição, respectivamente. Estes genes estão relacionados a vários processos celulares envolvendo transporte transmembrana, degradação de xenobióticos, metabolismo de lipídeos e aminoácidos, secreção de enzimas proteolíticas e patogênese, sugerindo que o AUN ativa duas principais vias de sobrevivência em resposta a este agente estressor, a degradação e o efluxo da droga. Posteriormente, foram realizadas as análises de processamento alternativo quanto ao uso diferencial de exons por meio do algoritmo HTSeq e DEXSeq e retenção de introns utilizando-se algoritmos construídos na linguagem *Perl*. Os genes envolvidos em algum tipo de processamento alternativo estão relacionados com funções metabólicas variadas

como tradução, transporte vesicular, metabolismo lipídico, biogênese ribossomal, sequência de ligação ao DNA, regulação da transcrição e processamento do pré-mRNA. Estes resultados contribuem para uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na resposta de sobrevivência perante a exposição ao AUN.

Palavras chave: Dermatófitos, transcriptoma, AUN, *splicing* alternativo e bioinformática

ABSTRACT

MENDES, N. S. **Comprehensive analysis of the transcriptional profile and alternative splicing in the dermatophytes *Trichophyton rubrum* exposed to subinibitory doses of undecanoic acid.** Ph.D. (thesis) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

The dermatophyte *Trichophyton rubrum* is a filamentous fungus, anthropophilic that invades keratinized tissue causing superficial infections on the skin. Some drugs are used for the treatment of dermatophytosis, being the undecanoic acid (AUN) one of them. The AUN the most toxic of the saturated medium chain fatty acids, is used as a topical medicine. The study of gene expression and the regulatory mechanisms are fundamental to understand the molecular mechanisms involved in response to exposure of these cytotoxic agents. So, the aim of this study was to characterize the molecular mechanisms involved in the adaptive process of the exposure to undecanoic acid, by the global analysis of the transcriptome and regulatory mechanisms such as alternative splicing. To this end, the mycelium of *T. rubrum* was exposed to undecanoic acid for 3 or 12 hours in biological triplicate, and the resulting RNA was sequenced by RNA-Seq. The sequencing generated approximately 58 million of reads per library, which were filtered and aligned with the reference genome using the softwares and Bowtie2 and FASTQC, respectively. The analysis of differential gene expression was performed through the Bioconductor package DESeq and, for this analysis, we used as reference sample the 0h time. We identified 492 differentially expressed genes in response to UDA, being 385 and 210 genes modulated in response to 3 and 12 hours of exposure, respectively. These genes are related to various cellular processes involving the transmembrane transport, xenobiotics degradation, lipids and amino acids metabolism, secretion of proteolytic enzymes and pathogenesis, suggesting the activation of two major survival pathways in response to this stressor, degradation and drug efflux, by UDA. Also, the alternative splicing analysis was performed through the differential use of exons using the algorithms HTSeq and DEXSeq and intron retention using algorithms built in Perl language. The genes involved in some kind of alternative splicing are associated with various metabolic functions such as translation, vesicular transport, lipid metabolism, ribosomal biogenesis,

DNA binding sequence, transcription regulation and processing of pre-mRNA. These results contribute to increase the knowledge of the molecular mechanisms involved in the survival response upon exposure to the AUN.

Keywords: Dermatophyte, transcriptome, undecanoic acid, alternative splicing and bioinformatics.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Aspectos macro e microscópicos de <i>Trichophyton rubrum</i>	23
Figura 2: Estrutura química do AUN.	26
Figura 3: Representação esquemática do princípio do sequenciamento por PCR em fase sólida.....	29
Figura 4: Formação do spliceossomo e processamento do pré-mRNA.	31
Figura 5: Regulação do splicing.....	32
Figura 6: Diferentes tipos de splicing alternativo.	33
Figura 7: Desenho experimental I.	43
Figura 8: Desenho experimental II.....	44
Figura 9: Eletroforese de RNA do experimento I.	55
Figura 10: Eletroforese de RNA do experimento II.	55
Figura 11: Distribuição dos genes modulados nos tempos de 3 e 12 horas de exposição ao AUN.	58
Figura 12: Diagrama de Venn dos tempos de 3 e 12 horas.	59
Figura 13: Categorização funcional dos genes modulados em resposta à exposição ao AUN por 3 horas.	61
Figura 14: Categorização funcional dos genes modulados em resposta à exposição ao AUN por 12 horas.	62
Figura 15: Vias metabólicas envolvidas na resposta à exposição ao AUN por 3 horas.....	67
Figura 16: Vias metabólicas envolvidas na resposta exposição ao AUN por 12 horas.....	68
Figura 17: Ativação da via metabólica de degradação de ácidos graxos.	71
Figura 18: Ativação da via de transporte peroxissomal.	74
Figura 19: Ciclo do glioxilato e TCA.....	76
Figura 20: Via de biossíntese e degradação de aminoácidos.	77
Figura 21: Real Time PCR dos genes envolvidos no metabolismo lipídico e detoxificação celular. ...	80
Figura 22: Real Time PCR dos genes envolvidos na proteólise e patogênese e transporte.	81
Figura 23: Real Time PCR dos genes envolvidos no ciclo do glioxilato e metabolismo de aminoácidos.	82

Figura 24: Representação gráfica dos genes que apresentam uso alternado de exons nos tempos de 3 e 12 horas em exposição ao AUN.....	86
Figura 25: Histograma de retenção de introns em 0, 3 e 12 horas.	87
Figura 26: Categorização funcional dos genes que apresentaram potencial de splicing alternativo.....	88
Figura 27: : Utilização diferencial do exon 10, do gene que codifica a proteína trimethyllysine dioxygenase.....	90
Figura 28: Utilização diferencial do exon 1, do gene que codifica a proteína de transporte SEC13.	91
Figura 29: Utilização diferencial do exon 4, do gene que codifica a proteína Hex 1 de T. rubrum.....	92
Figura 30: Validação das análises de retenção de introns usando RT-PCR.....	94

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Primers utilizados para as reações de <i>Real Time</i> PCR.	48
Tabela 2: Iniciadores utilizados para a análise de RT-PCR.	52
Tabela 3: Quantificação das amostras e análise de pureza das amostras de RNA do experimento I. ...	54
Tabela 4: Quantificação das amostras e análise de pureza das amostras de RNA do experimento II. ...	55
Tabela 5: Taxa de alinhamento das sequências com o genoma de referência.	57
Tabela 6: Genes modulados em resposta ao AUN.	59
Tabela 7: Genes relacionados ao citocromo P450.	63
Tabela 8: Genes relacionados aos transportadores do tipo ABC e MFS.	65
Tabela 9: Genes relacionados à proteólise.	66
Tabela 10: Genes relacionados ao metabolismo lipídico.	69
Tabela 11: Genes envolvidos no transporte peroxissomal.	73
Tabela 12: Genes envolvidos no ciclo do glioxilato.	75
Tabela 13: Genes envolvidos no metabolismo de aminoácidos.	78
Tabela 14: Correlação de Pearson.	84
Tabela 15: Genes selecionados para o teste da utilização diferencial de éxons e exons diferencialmente expressos.	89
Tabela 16: Genes selecionados para confirmação e categorização funcional.	93
Tabela 17: Contagem de <i>reads</i> e tamanho esperado dos íntrons retidos.	93
Tabela 18: Tamanhos dos amplicons esperados no gel de agarose com e sem retenção de íntrons.	94

SUMÁRIO

I.	INTRODUÇÃO	21
1.1	Dermatófitos:	21
1.2	Trichophyton rubrum e a relação entre patógeno-hospedeiro	22
1.3	Agentes inibidores	24
1.3.1	Ácido undecanóico	25
1.4	Análise da expressão gênica em larga escala.....	27
1.5	Splicing e splicing alternativo.....	30
II.	HIPÓTESE.....	35
III.	OBJETIVOS	37
3.1	Objetivo geral	37
3.2	Estratégias.....	37
4.1	Linhagem	39
4.2	Manutenção e Estoque da Linhagem.....	39
4.3	Meios de cultura e soluções	39
4.3.1	Meio MEA (Atlas, 1993).....	39
4.3.2	Meio Sabouraud (Atlas, 1993).....	39
4.3.3	Meio RPMI-1640.....	40
4.3.4	Solução estoque de AUN.....	40
4.3.5	Tratamento da água com DEPC (Sambrook et al., 1989).....	41
4.3.6	Gel de agarose 1% para RNA (Sambrook et al., 1989)	41
4.3.7	Gel de agarose 1% para DNA (Sambrook et al., 1989).....	41
4.3.8	Tampão de migração MOPS 5x (Sambrook et al., 1989)	41
4.3.9	Tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) (Sambrook et al., 1989).....	41
4.4	Obtenção de suspensão de conídios.....	42
4.5	Determinação da Concentração Inibitória Mínima.....	42
4.6	Condições de cultivo.....	42
4.7	Extração do RNA total.....	44
4.8	Análise do transcriptoma em resposta ao AUN.....	45
4.9	Síntese de cDNA.....	46
4.10	Real Time PCR.....	47
4.11	Análise global de splicing alternativo.....	50
4.12	RT-PCR	51

rdgB/HAM1family non-canonical purine NTP pyrophosphatase	52
Dehydrogenase hypothetical protein (dual specificity)	52
V. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima	54
5.2 Verificação da qualidade e quantificação das amostras de RNA.....	54
5.3 Análise de qualidade e mapeamento das reads	56
5.4 Análise do perfil transcricional.....	57
5.5 Categorização funcional dos genes diferencialmente expressos.....	60
5.5.1 Genes relacionados à oxidação-redução	63
5.5.2 Genes relacionados ao transporte	64
5.5.3 Genes relacionados à patogenicidade e proteólise.....	66
5.6 Inferência das vias metabólicas	67
5.6.1 Genes relacionados ao metabolismo lipídico.....	68
5.6.2 Genes relacionados ao transporte peroxissomal	72
5.6.3 Genes relacionados ao ciclo do glioxilato	75
5.6.4 Genes relacionados ao metabolismo de aminoácidos.....	77
5.7 Análise da influência da mudança de meio de cultivo na expressão gênica e validação do sequenciamento por Real time PCR.....	79
5.8. Análise de splicing alternativo.....	85
5.8.1. Exons com potencial uso diferencial e contagem de introns retidos	85
5.8.2. Análise funcional in silico dos genes envolvidos no splicing alternativo	87
5.8.3 Teste do uso alternado de exons	89
5.8.4 Confirmação in vitro da retenção de introns por RT-PCR	92
VI CONCLUSÃO	97
VII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
ANEXOS.....	110

INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

Os fungos são organismos eucariotos, heterotróficos, uni ou pluricelulares, altamente diversificados em suas características morfo e fisiológicas e podem se desenvolver em uma ampla variedade de habitats, incluindo a microbiota de homens e animais. Algumas espécies podem causar infecções em animais e humanos, sendo assim considerados patógenos. A maioria das infecções fúngicas superficiais tem como principal agente causador os dermatófitos, que constituem um grupo de fungos filamentosos capazes de invadir tecidos queratinizados, causando infecções denominadas dermatofitoses (Weitzman e Summerbell, 1995; Grumbt *et al.*, 2011).

1.1 Dermatófitos:

Os dermatófitos são fungos que invadem tecidos queratinizados, utilizando a queratina para captação de nutrientes necessários para seu desenvolvimento. A capacidade de infecção deste fungo está associada à atividade queratinolítica extracelular, resultante de um grande número de proteases já identificadas em diferentes espécies (Monod *et al.*, 2002; Sriranganadane *et al.*, 2011).

A classificação dos dermatófitos pode ser realizada de duas formas: Considerando-se a morfologia ou seu habitat primário. Morfologicamente, podem ser classificados em três gêneros distintos: *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton*. Quanto ao habitat primário, podem ser divididos em espécies geofílicas que são habitantes do solo, zoofílicas dos animais, e antropofílicas dos seres humanos. As geofílicas podem causar infecções em humanos, provocando reação inflamatória aguda. Porém, as espécies antropofílicas têm como característica a infecção crônica e de progressão lenta (Weitzman e Summerbell, 1995; Seebacher *et al.*, 2008).

Estes patógenos são causadores de micoses superficiais cutâneas restritas a pêlos, unhas e ao estrato córneo da pele e seus anexos. As lesões decorrentes destas infecções são circulares, eritematosas e pruriginosas, comumente denominadas “tinea”, seguida pelo sítio anômico de infecção; *tinea pedis* (pé), *tinea capitis* (couro cabeludo), *tinea corporis* (corpo), *tinea unguinal* (unhas) ou onicomicose (Weitzman e Summerbell, 1995; Degreef, 2008; Kelly, 2012; Westerberg e Voyack, 2013; Segal *et al.*, 2015).

As infecções por dermatófitos são consideradas um problema de saúde pública, uma

vez que acometem 10 – 20% da população mundial, resultando em impactos socioeconômicos para diversos países (White *et al.*, 2008; Grumbt *et al.*, 2011; Nenoff *et al.*, 2013). Embora as dermatofitoses raramente causem a morte, são difíceis de tratar e contribuem para a dor e sofrimento da população acometida (Martinez-Rossi *et al.*, 2012). Dentre os agentes etiológicos mais comuns de dermatofitoses está o *Trichophyton rubrum*, que causa a maioria das onicomicoses e infecções crônicas no mundo (Segal *et al.*, 2015).

1.2 *Trichophyton rubrum* e a relação entre patógeno-hospedeiro

O organismo *T. rubrum* é classificado taxonomicamente como pertencente ao Filo: Ascomycota, subdivisão: *Pezizomycotina*; Classe: *Eurotiomucetes*; Ordem: *Onygenales*; Família: *Arthrodermataceae*; Subfamília: *mitosporic Arthrodermataceae*; Gênero: *Trichophyton*; Espécie: *Trichophyton rubrum* (Elewski, 1998; Farr *et al.*, 2007).

Quando cultivado em meio sabouraud apresenta colônias de crescimento lento, cor branca, aspecto algodinoso ou cotonoso (figura 1A), com o reverso vermelho escuro (figura 1B), sendo que esta coloração é devido à produção de pigmentos que se difundem no meio de cultura. Microscopicamente, visualizam-se hifas multisseptadas e macroconídios longos, cilíndricos, escassos e com parede lisa. Os microconídios são numerosos, delgados, em formato de chave semelhante à lágrima e são formados por septações laterais das hifas (figura 1C) (Kern e Blevins, 2004).

O *T. rubrum* é um fungo antropofílico que usualmente acomete pacientes imunocompetentes, causando infecções superficiais e cutâneas. No entanto, em pacientes imunossuprimidos pode ser invasivo causando o surgimento de granulomas dermatofíticos (Gong *et al.*, 2007; Ilkit *et al.*, 2012).

Ao iniciar uma infecção, os dermatófitos se deparam com os mecanismos primários de defesa do hospedeiro, como a pele e sua microbiota normal, exposição à luz ultravioleta, falta de umidade, pH ácido e elevação de temperatura. Além disso, uma das principais barreiras naturais contra infecções é a descamação dos tecidos superficiais, renovando o estrato córneo da pele. Para evitar a eliminação juntamente com a descamação do epitélio, o *T. rubrum* se adere à célula por meio de glicoproteínas de parede celular contendo mananas que funcionam como adesinas, as quais reconhecem e se ligam aos resíduos de manose e galactose presentes na superfície da célula hospedeira (Esquenazi *et al.*, 2004; Kaufman *et al.*, 2007; Vermout *et al.*, 2008).

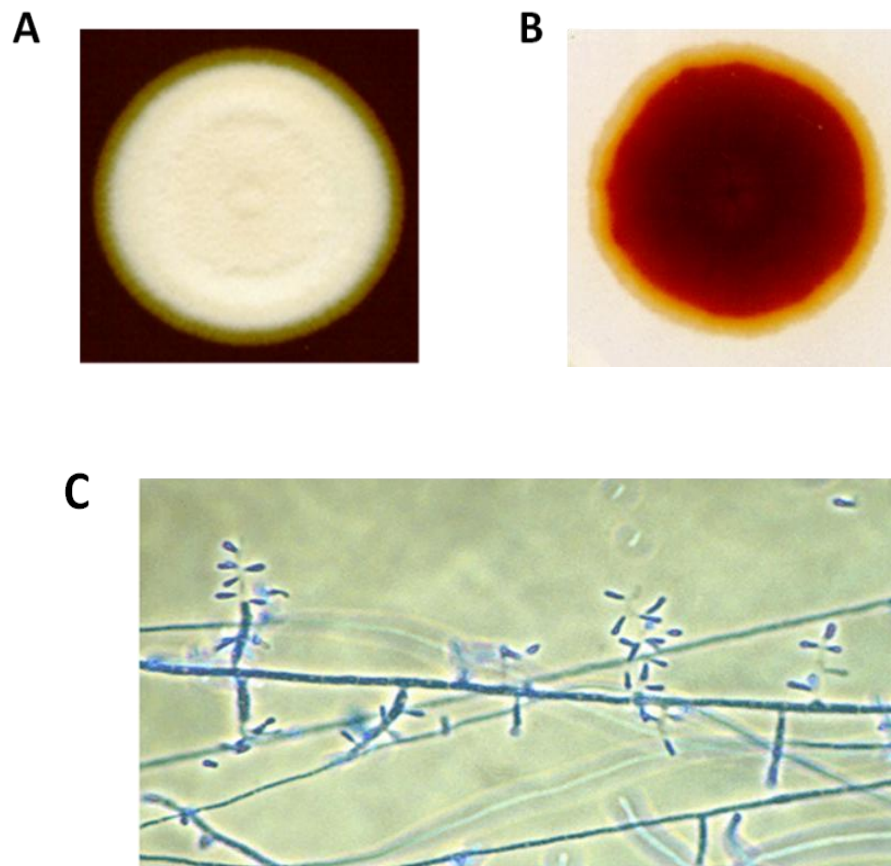


Figura 1: Aspectos macro e microscópicos de *Trichophyton rubrum*.

A – Frente da colônia de *T. rubrum* em meio sabouraud. B – Reverso da colônia no mesmo meio. C – Microscopia óptica destacando-se os microconídios.

Fonte: <http://www.mycologyadelaide.edu.au/gallery/dermatophytes>.

O microrganismo já aderido à célula necessita de nutrientes para o desenvolvimento e manutenção da infecção. Para tanto, o fungo secreta enzimas com a finalidade de degradar macromoléculas presentes no tecido do hospedeiro, as quais são captadas pelas células e então metabolizadas. Esta maquinaria enzimática constitui um fator de virulência bem caracterizado em dermatófitos, possibilitando a hidrólise de componentes estruturais da pele e a invasão tecidual (Kaufman *et al.*, 2007; Vermout *et al.*, 2008). Esta resposta adaptativa é regulada, entre outros fatores, pelo pH ambiente, e baseia-se na expressão de proteínas estruturais e de parede celular, como as queratinases, lipases, nucleases, fosfatases, fosfolipases (Leng *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2010; Martinez-Rossi *et al.*, 2012).

1.3 Agentes inibidores

No final do século XIX, as micoses superficiais eram tratadas com sais inorgânicos como o permanganato de potássio ou o cloreto de mercúrio. No início do século XX, acriflavina, violeta genciana, ácido benzóico, acetilsalicílico foram introduzidos na prática médica, como os primeiros antifúngicos orgânicos de uso tópico (Martinez-Rossi *et al.*, 2008). Somente em 1950 a griseofulvina foi introduzida no mercado, utilizada como o primeiro antifúngico para tratamento de micoses superficiais.

Existem poucos antifúngicos disponíveis no mercado, a maioria pertencente a uma pequena variedade de classes químicas que atuam sobre uma mesma via metabólica, a do ergosterol (Pena-Muralla, 2002; Westerberg e Voyack, 2013). Dentre as classes de antifúngicos utilizados atualmente estão polienos, azóis, alilaminas, pirimidinas, as equinocandinas e os ácidos graxos.

Os principais polienos manipulados para tratamento de infecções fúngicas são a nistatina e a anfotericina B. Estas drogas atuam ligando-se ao ergosterol, acarretando a formação de poros na membrana plasmática e o extravasamento do conteúdo citoplasmático, levando à morte celular. Uma grande desvantagem do uso deste composto é o efeito nefrotóxico apresentado. Entretanto, novas formulações utilizando complexos lipídicos associados à droga estão sendo desenvolvidas, o que diminui o efeito colateral (Ostrosky-Zeichner *et al.*, 2010; Kaminski, 2014).

Os inibidores da classe dos azóis podem ser de uso tópico, como os imidazóis, miconazol, tioconazol e cetoconazol, de uso interno como o itraconazol, fluconazol, e também os que são eficazes tanto para o tratamento de micoses superficiais quanto para as micoses sistêmicas como o posaconazol e voriconazol. Estas drogas agem no metabolismo fúngico inibindo a enzima esterol 14- α -demetilase, do citocromo P450, inibindo a síntese do ergosterol e levando à desestabilização da membrana celular, devido à diminuição da quantidade de ergosterol e ao acúmulo de lanosterol (Blyth, 2011). Mesmo que os azóis de última geração como o posaconazol e voriconazol apresentam maior espectro de ação, novas gerações de medicamentos antifúngicos da classe dos azóis estão sendo desenvolvidos visando maior atividade contra infecções antifúngicas (Ostrosky-Zeichner *et al.*, 2010; Musiol e Kowalczyk, 2014).

A terbinafina é um antifúngico da classe das alilaminas, muito utilizada no tratamento de dermatofitoses, juntamente com itraconazol. Esta droga tem como mecanismo de ação o bloqueio da síntese do ergosterol por meio da inibição da enzima esqualeno epoxidase, que é

responsável pela conversão de esqualeno em lanosterol. Sendo assim, apresenta tanto efeito fungistático, pela diminuição da quantidade de ergosterol na membrana celular, quanto fungicida, pelo acúmulo de esqualeno que é tóxico para a célula (Gupta e Cooper, 2008).

Os inibidores fúngicos mais recentes no mercado farmacêutico são as equinocandinas, que atualmente contam com três representantes: a caspofungina, a anidulafungina e a micafungina. Estas drogas atuam interferindo na biossíntese da parede celular, por meio da inibição da enzima (1,3)- α -OGs inibidores fúngicos mais recentes no mercado farmacêutico são as equino (Stan *et al.*, 2014).

Existem outras classes de antifúngicos que não atuam na via do ergosterol, um deles é a acriflavina. Esta droga atua como intercalante de DNA, entrando livremente na célula e interferindo em um grande número de processos celulares como a replicação, tradução, recombinação, processamento de RNA (Seto e Tomasz, 1977; Segato *et al.*, 2008; Persinoti *et al.*, 2014) e formação de Z-DNA (Walker *et al.*, 1985). Este composto pode levar a morte celular provavelmente devido à mutagenicidade ou outros efeitos tóxicos (Lee *et al.*, 1996). A atividade mutagênica é resultado principalmente de mutações *frameshift* devido à inserção ou deleção de nucleotídeos na molécula de DNA (Funatsuki *et al.*, 1997). Este efeito mutagênico observado em fungos também ocorre na célula do hospedeiro, acarretando assim o desuso deste agente inibidor.

1.3.1 Ácido undecanóico

Os ácidos graxos possuem propriedades antimicóticas descritas desde o século 19. No início do século vinte observou-se que, nos ácidos graxos saturados, o aumento da eficácia de sua atividade antifúngica seria proporcional ao aumento do número de átomos de carbono na cadeia. Outros estudos descreveram que o ácido valérico (C₅) possui atividade antifúngica, não havendo portanto relação entre o comprimento da cadeia e as propriedades fungicidas dos ácidos graxos saturados de cadeia curta e média (Peck, 1939). Posteriormente, foi relatado que os ácidos graxos de cadeia longa apresentavam maior propriedade fungistática e fungicida que os de cadeia média e curta (Keeney *et al.*, 1945) Porém, estudos posteriores demonstraram que os ácidos graxos saturados de cadeia média (C7 a C11) são mais tóxicos que os de cadeia longa (acima de C12), sendo o ácido undecanóico (AUN) o mais tóxico da série C7 a C18. Assim, dentre os ácidos graxos saturados de cadeia média, destaca-se o AUN devido sua alta toxicidade. A sua estrutura química está mostrada na figura 2 (Garg e Muller, 1993; Bogatcheva *et al.*, 2011).

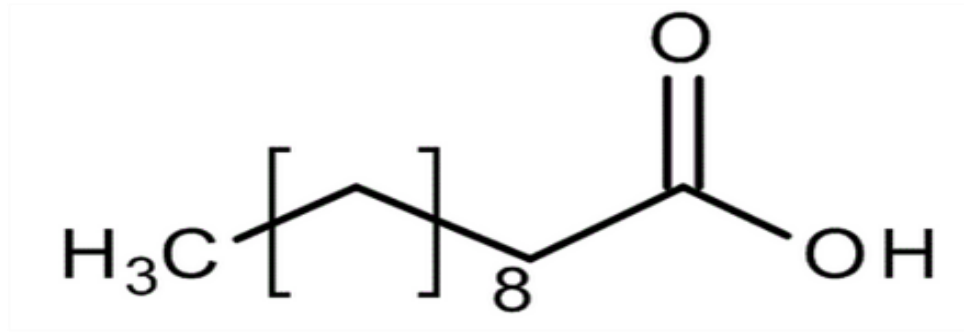


Figura 2: Estrutura química do AUN.

Fonte: <http://www.merckmillipore.com/brazil/chemicals/acido-undecanoico>.

O AUN atua em diversos processos celulares dos dermatófitos como a conidiação (Das *et al.*, 1977), composição lipídica (Das e Banerjee, 1983), inibição da respiração exógena e oxidação da glicose (Das e Banerjee, 1981a), secreção de queratinases e lipases que são consideradas importantes fatores de virulência, e estímulo da produção de fosfolipase A extracelular (Das e Banerjee, 1982b). Além disso, linhagens resistentes a esta droga não foram capazes de infectar cobaias, sugerindo que este efeito seja devido à inibição de queratinases e lipases de forma direta pelo AUN (Das e Banerjee, 1982b). No entanto, essa hipótese foi questionada posteriormente através de experimentos mostrando que, na bactéria *Acinetobacter calcoaceticus*, a produção de lipase é reprimida pelos ácidos graxos, principalmente os de cadeia longa, ou por seus produtos de degradação na etapa de transcrição gênica (Kok *et al.*, 1996). Entretanto, o envolvimento do AUN no controle da expressão e secreção destas enzimas, bem como a possível relação entre os mecanismos de resistência ao AUN e a secreção de enzimas importantes para a patogenicidade de *T. rubrum* ainda não foram elucidados.

Mais recentemente, foram desenvolvidas novas formulações do AUN, as quais abordam seu uso conjugado a peptídeos antimicrobianos para aumentar o espectro de ação destes compostos que, em sua maioria, são altamente ativos contra bactérias, mas não são efetivos contra fungos. A ligação de ácidos lipofílicos de diferentes tamanhos (ácido heptanóico, ácido palmítico e, principalmente, AUN) à extremidade N-terminal de um análogo da magainina, aumentou a atividade antifúngica deste peptídeo contra alguns fungos como *Cryptococcus neoformans*, *C. albicans* e *A. fumigatus* (Avrahami e Shai, 2002; 2003). Estes lipopeptídeos sintéticos atuam diretamente na membrana plasmática da célula, apresentando a habilidade de atravessar a parede celular, interagir e aumentar a permeabilidade da membrana citoplasmática (Makovitzki *et al.*, 2006; Makovitzki *et al.*, 2007). Outras formulações químicas envolvendo o AUN foram desenvolvidas através da

introdução de um grupamento hydroxamínico na molécula, inserindo assim um quelante de ferro, com a finalidade de potencializar a eficácia desta droga (Ammendola *et al.*, 2009).

Além disso, foi relatado que a resistência ao AUN, em *Aspergillus nidulans*, está relacionada com uma mutação no gene *lipA*, que codifica uma Lipase. Trata-se de uma mutação de transversão, que confere uma diferença na sequência de aminoácidos da enzima, próxima ao sítio catalítico, podendo acarretar alterações nas propriedades catalíticas da enzima resultando na resistência a esta droga (Brito-Madurro *et al.*, 2005; Brito-Madurro *et al.*, 2008). O envolvimento de lipases na suscetibilidade ao AUN reforça a hipótese que essas enzimas contribuem para a patogenicidade em fungos, já que, conforme mencionado, linhagens resistentes a essa droga perdem a capacidade infectiva (Das e Banerjee, 1982b).

Desvendar os mecanismos moleculares de adaptação e resistência a drogas pode levar a identificação de novos alvos terapêuticos para o tratamento de infecções fúngicas, o que vem ganhando relevância devido ao aumento da incidência de organismos resistentes aos antifúngicos disponíveis no mercado, bem como ao número restrito de classes de agentes inibidores. Trabalhos em larga escala avaliando o perfil de expressão gênica na presença e ausência de drogas, e em linhagens sensíveis e resistentes, são realizados por diversos pesquisadores na tentativa de elucidar mecanismos moleculares envolvidos na resposta e na resistência a antifúngicos, e assim nortear o uso das drogas existentes e revelar novos alvos terapêuticos (Agarwal *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2007).

1.4 Análise da expressão gênica em larga escala

Os fungos apresentam uma resposta adaptativa frente a diversos estímulos ambientais como mudança de pH, temperatura, fonte de carbono e exposição a drogas. Este mecanismo de resposta envolve a ativação ou repressão de genes para a sobrevivência perante o estresse sofrido.

Foram desenvolvidas várias técnicas para análise da expressão diferencial de genes em larga escala, dentre elas pode-se citar as bibliotecas de EST (*Expressed Sequenced Tags*), SSH (*Suppressive Subtractive Hybridization*) (Diatchenko *et al.*, 1996), SAGE (*Serial Analyses of Gene Expression*) (Velculescu *et al.*, 1995) e microarranjos de cDNA (Schena *et al.*, 1998).

Uma das metodologias mais atuais para análise de expressão gênica é o RNA-Seq. Este tipo de sequenciamento é cada vez mais utilizado com a finalidade de avaliação do transcriptoma em condições distintas e estes estudos foram realizados em diversos organismos

como o *Saccharomyces cerevisiae* (Nagalakshmi *et al.*, 2008), *Schizosaccharomyces pombe* (Wilhelm *et al.*, 2008), *Aspergillus sp* (Gibbons *et al.*, 2012; Cerqueira *et al.*, 2014); *Candida albicans* (Dhamgaye *et al.*, 2014; Linde *et al.*, 2015) e *Trichophyton rubrum* (Liu *et al.*, 2014; Persinoti *et al.*, 2014).

Dentre as novas plataformas de sequenciamento de nova geração, algumas são amplamente conhecidas no mercado como: A plataforma 454 FLX da Roche, a HiSeq e MiSeq da Illumina, SOLiD System da Applied Biosystems e o HeliscopeTrue Single Molecule Sequencing (tSMS) da Helicos (Wang *et al.*, 2009; De Carvalho, 2010).

Para o sequenciamento na plataforma Hiseq é empregada a técnica PCR de fase sólida, na qual são fixados adaptadores às extremidades, sendo que a extremidade 5' é fixada a superfície sólida, e a 3' permanece livre para que ocorra o início da reação de sequenciamento dos fragmentos mobilizados, como mostrado na figura 3. No primeiro ciclo de amplificação, ocorre a síntese da segunda fita do fragmento imobilizado no suporte. Na etapa de anelamento, o fragmento forma uma estrutura em “ponte” na superfície sólida ocorrendo também à extensão da fita complementar. No ciclo de desnaturação, as fitas são separadas e linearizadas. Esses ciclos são repetidos 50 vezes (ou mais dependendo do tamanho da *read* processada) gerando assim milhares de cópias de cada fragmento, os quais permanecem próximos uns dos outros, formando um cluster de sequenciamento. Logo após ocorrem as etapas de desnaturação com a finalidade de separar os duplex formados e, nos próximos ciclos de amplificação, nucleotídeos terminadores marcados são fornecidos para as reações de sequenciamento que ocorrem dentro de cada cluster. Feita a incorporação dos nucleotídeos, é realizada a leitura do sinal de fluorescência. Seguida de uma etapa de lavagem para remoção dos reagentes excedentes, do terminal 3' bloqueado e do fluoróforo incorporado no ciclo anterior para dar continuidade ao sequenciamento. A leitura das bases é feita pela análise sequencial das imagens capturadas em cada ciclo. Em geral, leituras de 35-100 bases são obtidas de cada cluster (Shendure *et al.*, 2008).

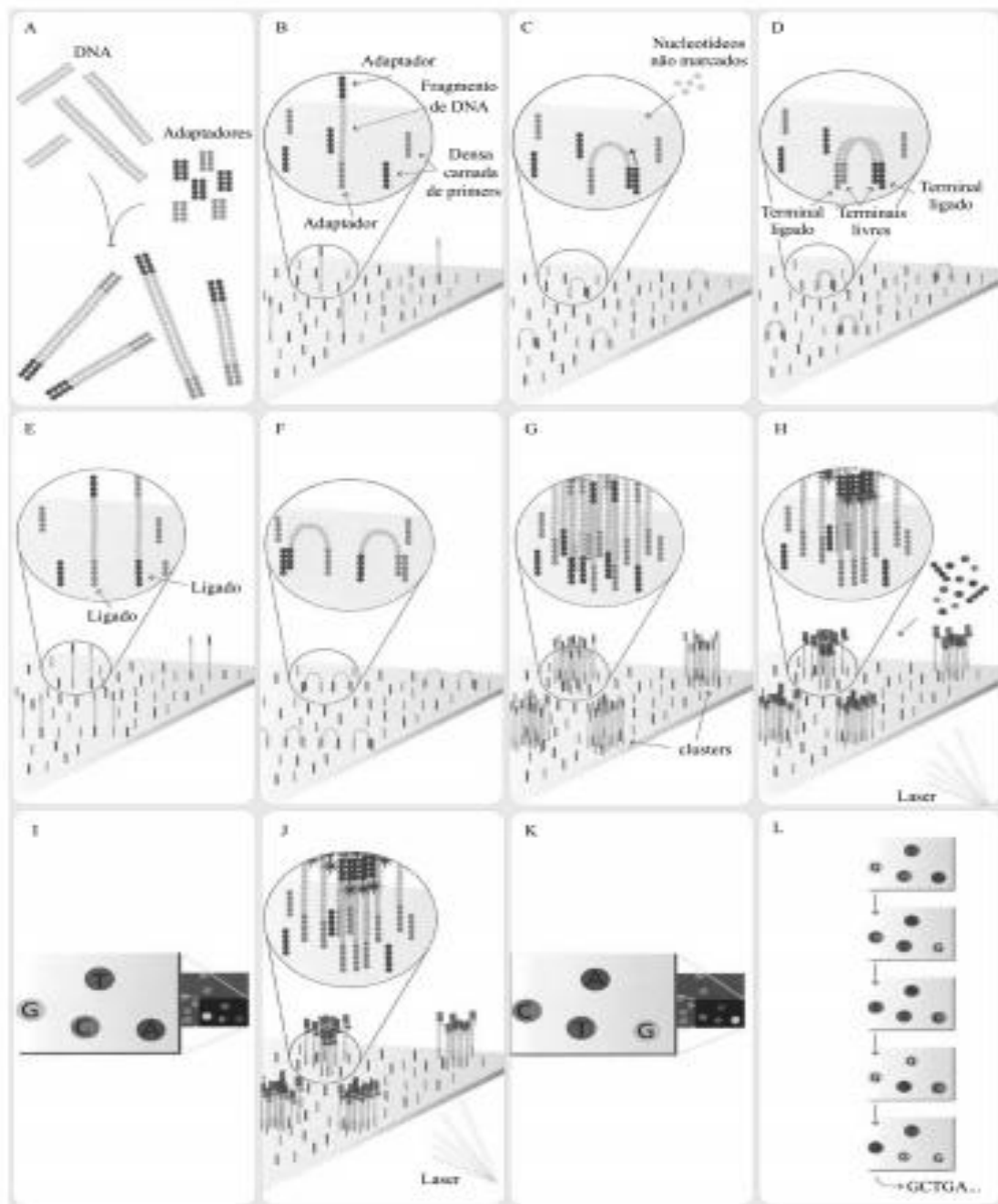


Figura 3: Representação esquemática do princípio do sequenciamento por PCR em fase sólida.

O cDNA é fragmentado aleatoriamente e ligado a adaptadores A e B em ambas as extremidades (A). As moléculas de cDNA fita simples são aderidas por afinidade ao suporte sólido onde estão também aderidos oligonucleotídeos complementares aos adaptadores A e B (B). Durante a etapa de anelamento (C), no primeiro ciclo de amplificação, o adaptador da extremidade livre da molécula aderida ao suporte encontra seu oligonucleotídeo complementar no suporte, formando uma estrutura em ponte. Uma vez fornecidos os reagentes necessários, a PCR é iniciada utilizando a extremidade 3' livre como primer (C e D). Na etapa de desnaturação (E), a "ponte" é desfeita mediante elevação de temperatura. Repete-se a etapa de anelamento (F), formando novas estruturas em ponte e iniciando um novo ciclo de amplificação. Após uma série desses ciclos, serão obtidos clusters de moléculas idênticas ligadas ao suporte (G). Com a incorporação de nucleotídeos terminadores marcados e excitação a laser (H), sinais fluorescentes são gerados, os quais são captados por um dispositivo de leitura e interpretado como um dos quatro possíveis nucleotídeos componentes da cadeia (I). O processo de incorporação de nucleotídeo marcado, excitação e leitura são repetidos para cada nucleotídeo componente da sequência (J, K). A leitura é feita de forma sequencial, o que permite a montagem da sequência completa de cada cluster (L).

Fonte: De Carvalho, 2010.

Atualmente, a técnica de RNA-Seq é utilizada como ferramenta para estudo do transcriptoma, análise de região regulatória, de microRNAs e RNAs não codificadores, descoberta de novos transcritos, inferência de novas isoformas expressas, dentre outras aplicações (Khatoon *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014; Persinoti *et al.*, 2014; Schliebner *et al.*, 2014; Linde *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2015). A grande vantagem do uso destas novas tecnologias é a maior acurácia, pois os resultados fornecidos possuem a resolução de um nucleotídeo.

1.5 *Splicing e splicing alternativo*

Em eucariotos, os genes expressos têm como precursores o pré-mRNA, que sofre processamento para a formação do transcrito maduro. *Splicing* ou processamento é a retirada de sequências não codantes (introns) e posterior junção dos exons, formando mRNA maduro (Staley e Woolford, 2009; Will e Luhrmann, 2011).

O processamento do pré-mRNA é feito em duas etapas, as quais envolvem duas reações sequenciais de transesterificação. Estas reações requerem o reconhecimento preciso das sequências de junção de introns, que é realizado por ribonucleoproteínas denominadas snRNP (*small nuclear ribonucleoprotein*). Existem no total cinco snRNP que, juntamente com os fatores de *splicing*, compõem uma estrutura denominada spliceossomo, onde ocorre o processamento de introns. Cada snRNP contém uma região rica em U sendo por isso denominadas U1, U2, U4, U5 e U6 (Staley e Woolford, 2009; Hogg *et al.*, 2010; Will e Luhrmann, 2011).

A primeira etapa da formação do spliceossomo é o reconhecimento de elementos *cis*, que são sequências de nucleotídeos que definem a junção intron-exon. Elas são constituídas por um sítio de *splicing* na região 5' (5'ss), outro na região 3' (3'ss), e uma adenina situada a 20 - 40 pares de base acima do sítio 3' chamado BP (*branched point*) seguida de uma região polipirimidinica (Staley e Woolford, 2009; Montes *et al.*, 2012).

O primeiro complexo estável do spliceossomo é o complexo E, formado pelo reconhecimento e ligação do U1snRNP na região 5'ss, e dos fatores promotores de *splicing* SF1 e U2AF na região 3'ss e BP. Estes promotores recrutam U2snRNP que se liga ao BP formando o complexo A. O Complexo B é formado pela subsequente ligação de U4-U5-U6. Posteriormente, ocorre um rearranjo de RNA-RNA e RNA-proteína no núcleo do spliceossomo provocado pela saída de U1 e U4 do complexo, produzindo então o complexo C (ou catalítico) que é responsável pela catálise, excisão do intron e ligação dos exons. Todo o

processo de formação do spliceossomo e retirada do intron pode ser visto na figura 4 (Hogg *et al.*, 2010; Will e Luhrmann, 2011; Montes *et al.*, 2012; Zhou e Fu, 2013).

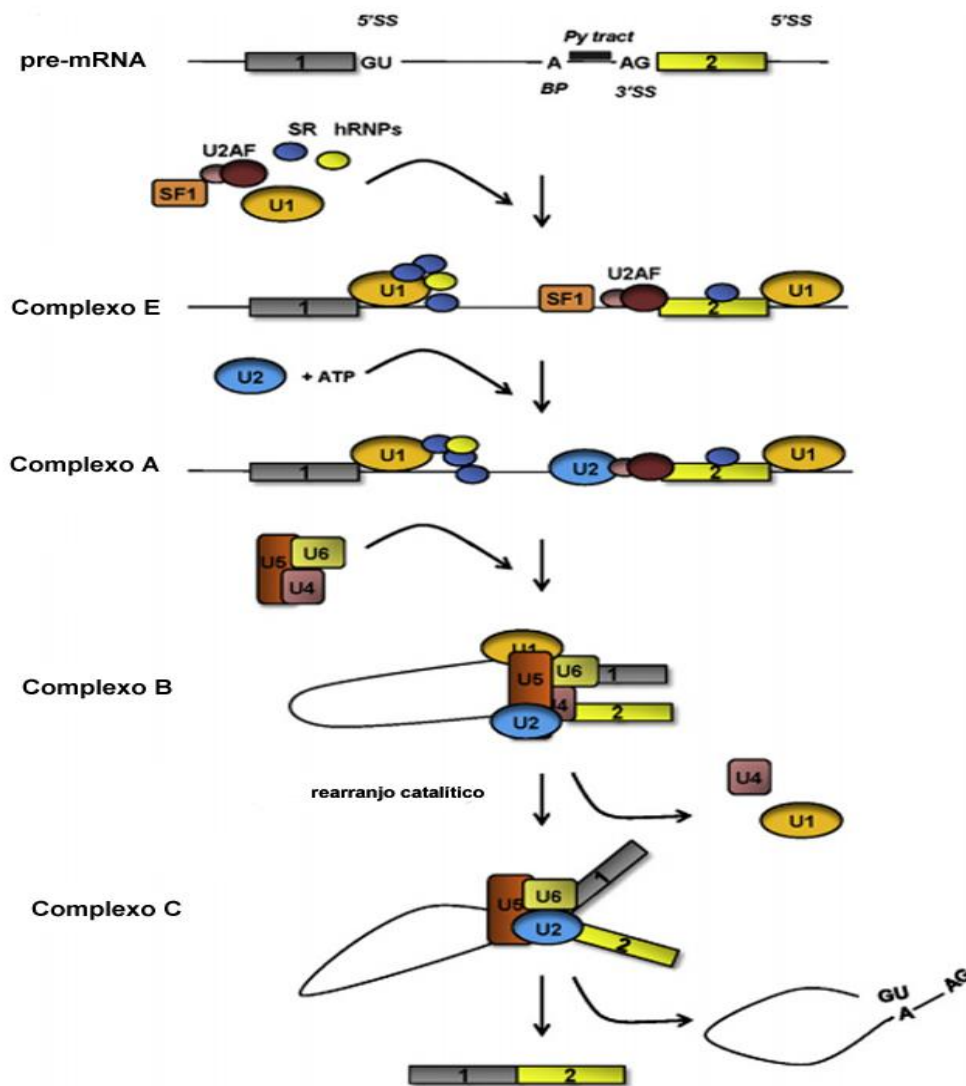


Figura 4: Formação do spliceossomo e processamento do pré-mRNA.

O spliceossomo é composto de um núcleo contendo cinco snRNP e outras proteínas adicionais. O primeiro passo na formação do spliceossomo é a formação do complexo E, no qual U1 se liga ao sítio 5' ss (GU), e SF1 e U2AF se ligam ao BP e ao sítio 3' ss (AG). U2snRNP se liga BP de uma maneira ATP dependente formando o complexo A. Os passos subsequentes são a ligação de U4-U5-U6 snRNPs, formando assim o complexo B. No complexo catalítico C, são feitas as reações de ligação dos exons e excisão do intron.

Fonte: Montes *et al.*, 2012.

No *splicing* alternativo, ao contrário do que ocorre no *splicing* constitutivo, os introns dos pré-mRNAs podem sofrer um processamento diferenciado ou mesmo não ocorrer, formando uma ou mais isoformas de mRNAs. Nos eucariotos, este processo ocorre devido à perda ou diminuição da capacidade de reconhecimento dos sinais de *splicing* nas sequências de intron/exon, que são sinais cruciais para que o *splicing* ocorra corretamente. Além disso, no

processamento de introns existe a ocorrência de elementos *cis* e *trans* intrônicos ou exônicos, os quais podem induzir ou silenciar a ocorrência do processamento gênico. Os elementos *cis* regulatórios são ISS, ISE, ESS, ESE, que também participam na regulação do *splicing* alternativo. Os elementos *trans* regulatórios mais conhecidos são as ribonucleoproteínas nucleares heterogêneas (hnRNPs) e as proteínas ricas em serina/arginina (SR), que se ligam aos elementos indutores ou silenciadores de *splicing*, como ilustrado na figura 5 (Hogg *et al.*, 2010; Montes *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2013).

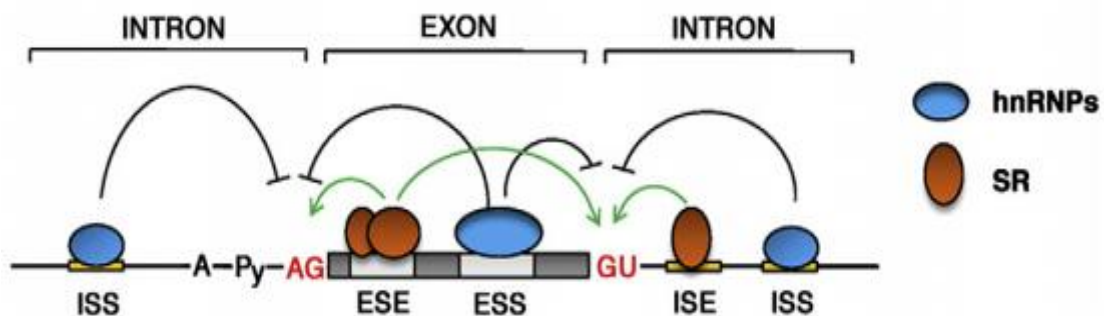


Figura 5: Regulação do *splicing*.

O núcleo de sequências *cis* que definem as junções intron-exon está em vermelho, e as sequências 3' associadas estão em cinza. Os elementos *cis* regulatórios são os indutores ou repressores de introns e exons são ISE, ESE, ISS e ESS respectivamente. A atuação elementos *trans* como os fatores de regulação de *splicing* SR e hnRNPs, que se ligam aos indutores e repressores interagindo com componentes spliceossomais. Em geral, as SR se ligam aos indutores facilitando o reconhecimento do exon (setas verdes), porém a hnRNP inibe este processo (setas pretas).

Fonte: Montes *et al.*, 2012.

Em organismos eucariotos, o *splicing* alternativo é um evento regulatório frequente, sendo uma das principais funções deste processo é a produção de uma maior variedade de proteínas que podem ou não ser funcionais. Na figura 6 estão ilustrados os principais tipos de *splicing* alternativos descritos na literatura que são: o saltador de exons, mais comum em mamíferos, o exon pode ser tanto retido quanto removido em uma região flanqueada por introns; uso alternado dos sítios 5' ou 3', resultando em introns de tamanhos variados e, conseqüentemente influenciando na estrutura do mRNA; retenção de introns, mais comum em ascomicetos, o intron fica retido gerando uma isoforma proteica diferente e, finalmente, a inclusão de um exon no final do mRNA pode excluir outro exon, gerando um processamento chamado de exons mutuamente excludentes (Kempken, 2013).

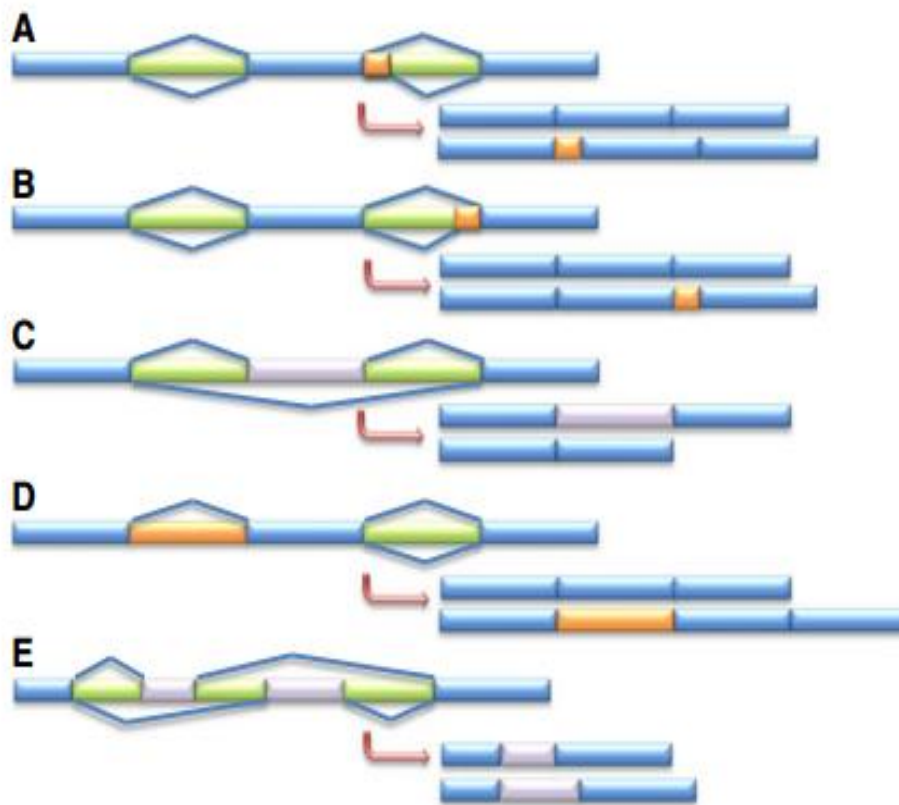


Figura 6: Diferentes tipos de splicing alternativo.

A- Uso alternativo do sítio 5', B- Uso alternativo do sítio 3', C- Saltador de exons, D- Retenção de introns e E- Exons mutuamente excludente.

Fonte: Kempken, 2013.

Trabalhos anteriores mostram que o processamento alternativo é um mecanismo regulatório importante para a sobrevivência e adaptação fúngica perante as mudanças ambientais. Este mecanismo parece ser modulado em resposta a diferentes estímulos, como visto para o gene *pacC* em *Aspergillus nidulans* e *hex-1* em *Neurospora crassa* (Leal *et al.*, 2009; Trevisan *et al.*, 2011).

Portanto, o estudo de expressão gênica e mecanismos regulatórios, em resposta a droga, é fundamental para ampliar o conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na resposta fúngica a este estímulo. Estas drogas, como o AUN, podem ser excelentes escolhas terapêuticas por terem um mecanismo de ação diferente das drogas usuais e ser acessível a grande parte da população.

HIPÓTESE



II. HIPÓTESE

Os ácidos graxos são utilizados como agentes antifúngicos desde o início do século XX. Dentre os ácidos graxos saturados de cadeia média, o AUN é o mais tóxico, sendo ainda hoje utilizado em pomadas de uso tópico. Diante do surgimento de fungos resistentes aos antifúngicos de escolha e o pequeno número de alvos terapêuticos existentes, tornou-se necessário o desenvolvimento de novas drogas ou reformulação das já existentes diminuindo seu efeito tóxico. Neste contexto, o AUN aparece como uma ótima alternativa para o uso terapêutico, porém há a necessidade de ampliar o conhecimento sobre os mecanismos moleculares envolvidos na resposta da exposição ao AUN. A análise global dos RNAs transcritos e sequenciamento em larga escala (RNAseq) poderia revelar aspectos gerais do metabolismo do fungo quando exposto ao AUN, incluindo a modulação de genes relacionados à sua extrusão, a sua metabolização, e a eventos de splicing alternativo. Ampliar o conhecimento desses aspectos pode direcionar para a modificação química do AUN, ou desenvolver novas drogas, e mesmo estabelecer novas estratégias terapêuticas.

OBJETIVOS

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste projeto é caracterizar os aspectos metabólicos envolvidos no processo adaptativo da exposição ao AUN, através da análise global do transcriptoma e mecanismos regulatórios como o processamento alternativo.

3.2 Estratégias

- ✓ Determinar a concentração inibitória mínima do AUN para o dermatófito *T. rubrum*.
- ✓ Analisar os genes diferencialmente expressos em resposta ao AUN visando identificar vias metabólicas envolvidas na adaptação ao estresse provocado pela droga, representando tanto o mecanismo de ação da droga quanto à resposta do fungo à presença da droga.
- ✓ Validar o perfil transcricional obtido no sequenciamento, por meio de PCR em tempo real, selecionando-se genes que atuem em vias específicas de interesse para confirmação.
- ✓ Avaliar ocorrência de *splicing* alternativo em resposta à exposição ao AUN, utilizando-se os dados do sequenciamento, por meio de pesquisa de retenção de introns e *exon skipping*.
- ✓ Analisar genes específicos quanto ao uso diferencial de exons e confirmar a retenção de introns por meio RT-PCR de alguns genes selecionados.

MATERIAIS E MÉTODOS

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Linhagem

Para a realização deste trabalho foi utilizada a linhagem de *Trichophyton rubrum* CBS118892, doada pelo *Centraalbureau voor Schimmelcultures* (CBS – Holanda).

4.2 Manutenção e Estoque da Linhagem

Para a preservação do fungo por períodos mais longos, foram utilizados tubos de ensaio contendo meio MEA inclinado, estocado à temperatura ambiente. Para repiques periódicos, o organismo em questão foi inoculado em meio MEA sólido, o qual foi incubado a 30 °C por 15 dias.

4.3 Meios de cultura e soluções

4.3.1 Meio MEA (Atlas, 1993)

Reagentes	Quantidade
Extrato de malte	20 g
Glicose	20 g
Peptona	1 g
Água destilada (q.s.p)	1000 mL

O meio foi autoclavado a 120 °C e 1 atm de pressão durante 20 min. O pH foi ajustado para 5,7. Para preparação do meio sólido foi adicionado ágar em uma concentração 2,0 % (v/v).

4.3.2 Meio Sabouraud (Atlas, 1993)

Reagentes	Quantidade
Glicose	20 g
Peptona	10 g
Água destilada (q.s.p)	1000 mL

O meio foi autoclavado a 120 °C e 1 atm de pressão durante 20 min. O pH foi ajustado para 5,7.

4.3.3 Meio RPMI-1640

Reagentes	Quantidade	Reagentes	Quantidade
L-arginina	0,2 g	Biotina	0,0002 g
L-asparagina (anidro)	0,050 g	D-pantotênico	0,00025 g
Ácido L-aspártico	0,020 g	Cloreto de colina	0,003 g
L-cisteína.2HCl	0,0652 g	Ácido fólico	0,001 g
Ácido L-glutâmico	0,02 g	Mio-inositol	0,035 g
L-glutamina	0,030 g	Niacinamida	0,001 g
Glicina	0,01 g	Ácido p-aminobenzóico	0,001 g
L-histidina	0,015 g	Piridoxina HCl	0,001 g
L-hidroxiprolina	0,02 g	Riboflavina	0,0002 g
L-isoleucina	0,05 g	Tiamina HCl	0,001 g
L-leucina	0,05 g	Vitamina B12	0,000005 g
L-lisina Hcl	0,04 g	Nitrato de cálcio	0,1 g
L-metionina	0,015 g	Cloreto de potássio	0,4 g
L-fenilalanina	0,015g	Sulfato de magnésio (anidro)	0,0488 g
L-prolina	0,02 g	Cloreto de sódio	6 g
L-serina	0,03 g	D-glicose	2 g
L-treonina	0,02 g	Fosfato de sódio dibásico (anidro)	0,8 g
L-triptofano	0,005 g	Glutathiona reduzida	0,001 g
L-tirosina.2Na	0,02 g	Vermelho de fenol	0,0053 g
L-valina	0,02 g		

Para dissolução do meio liofilizado, foram dissolvidos 10,4 g de RPMI-1640[®] (Gibco[®] BRL) em 900 mL de água destilada. Nesta solução, adicionou-se MOPS (ácido 3-(N-morfolina) propanosulfônico) na concentração final de 0,165 M mantendo-se a agitação constante do meio até a dissolução completa. Em seguida, adicionou-se hidróxido de sódio 1M para ajuste do pH para 7,0. O volume final foi acertado para 1 L de meio, que foi esterilizado utilizando-se um sistema de filtração com membrana de náilon de 22 µm e estocado a 4 °C.

4.3.4 Solução estoque de AUN

O AUN foi diluído utilizando-se etanol como solvente, a solução estoque preparada na concentração de 1 mg/mL, e mantida a 4 °C. O AUN foi diluído utilizando-se etanol como solvente, a solução estoque preparada na concentração de 1 mg/mL, e mantida a 4 °C .

4.3.5 Tratamento da água com DEPC (Sambrook *et al.*, 1989)

Para evitar a degradação do RNA, a água destilada foi tratada com DEPC (dietilpirocarbonato) 0,1% (v/v) e incubada a 37 °C por 18-20 horas. Após este tratamento, a água foi autoclavada a 1 atm de pressão e 120 °C durante 45 minutos.

4.3.6 Gel de agarose 1% para RNA (Sambrook *et al.*, 1989)

Reagentes	Quantidade
Agarose	1,0 g
Tampão MOPS 5X	19,64 mL
Formaldeído 12,3M	17,86 mL
Água tratada com DEPC (q.s.p.)	100 mL

4.3.7 Gel de agarose 1% para DNA (Sambrook *et al.*, 1989)

Com a finalidade de avaliação do cDNA, foi feita uma corrida eletroforética do gel de agarose, utilizando-se tampão de migração TAE 1X.

Reagentes	Quantidade
Agarose	1,0 g
Tampão TAE 1X	100 mL

4.3.8 Tampão de migração MOPS 5x (Sambrook *et al.*, 1989)

Com a finalidade de avaliação da integridade do RNA, foi feita uma corrida eletroforética do RNA em gel de agarose, utilizando-se tampão de migração MOPS 1X.

Reagentes	Quantidade
Acetato de sódio 50 mM pH 7,0	800 mL
EDTA 0,5 M pH 8,0	10 mL
MOPS	20,6 g
Água tratada com DEPC (q.s.p.)	1000 mL

4.3.9 Tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) (Sambrook *et al.*, 1989)

Reagentes	Quantidade
Tris-base	242 g
Ácido acético glacial	51,1 mL
EDTA 0,5 M	100 mL
Água destilada	(q.s.p) 1000 mL

A solução autoclavada a 1 atm de pressão e 120 °C durante 20min. O pH foi ajustado para 8,0.

4.4 Obtenção de suspensão de conídios

Placas contendo meio sólido MEA, com *Trichophyton rubrum* crescido, foram raspadas e os conídios obtidos foram resuspendidos em solução salina esterilizada 0,9%. Esta suspensão foi filtrada em lã de vidro esterilizada e posteriormente foi feita a contagem dos conídios em câmara de Neubauer no microscópio óptico.

4.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima

Para obtenção da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de AUN para *T. rubrum* foi adotado o método de microdiluição em meio RPMI, recomendado pela NCCLS para determinação da CIM em fungos filamentosos. Para tanto, 0,1 mL de uma suspensão de conídios contendo 3×10^4 conídios/mL, foi inoculada em meio RPMI contendo concentrações da droga que variaram de 50 a 1,56 µg/mL (diluição seriada). O teste foi realizado em triplicata, em placas de 96 poços, incubando-se a 28 °C por 5 dias. Após este período, foi observado o crescimento do fungo através da turvação do meio de cultivo. Meios sem inóculo, sem droga e apenas com etanol foram utilizados como controles. Como controle do inóculo, a suspensão de conídios foi diluída a uma concentração de 3×10^3 conídios/mL e inoculada em meio MEA.

4.6 Condições de cultivo

Para os experimentos de sequenciamento (experimento I), foi inoculada uma suspensão de conídios com concentração final de 10^6 conídios/mL de meio, em meio líquido sabouraud, incubado por 96 horas, a 28 °C, em uma rotação de 120 rpm. Este cultivo foi considerado o tempo zero hora (controle) do experimento. Em seguida, o micélio foi coletado, lavado e transferido para o meio RPMI contendo AUN, na concentração de 17,5 µg/mL, que corresponde a 70% da CIM de AUN para esta linhagem. Após os períodos de 3h e 12h de

incubação no meio com droga, os micélios foram recolhidos por filtração, secos, congelados e armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a extração de RNA total, na figura abaixo se observa o delineamento deste experimento.

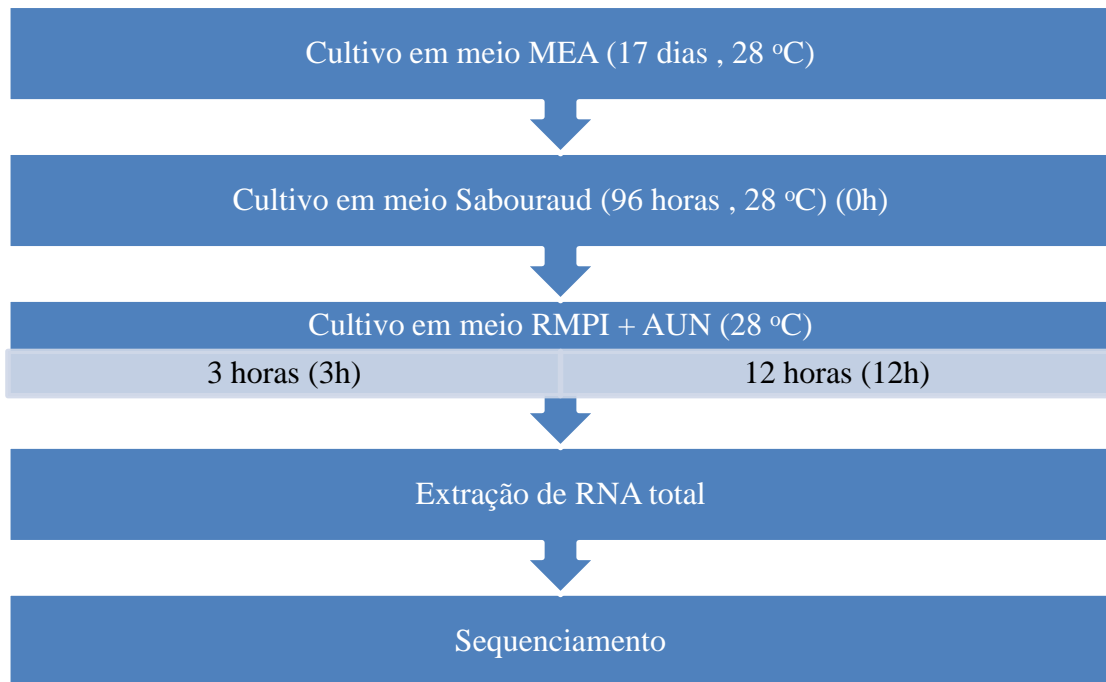


Figura 7: Desenho experimental I.

O experimento de expressão gênica (experimento II) foi realizado para analisar o efeito da transferência da massa micelial do meio Sabouraud para o meio RPMI, na modulação de genes diferencialmente expressos em resposta ao AUN. A concentração celular do inóculo foi igual à utilizada no experimento I. O crescimento em meio sabouraud (0h controle sabouraud) foi feito da mesma forma que o tempo 0h, do experimento I. Após o crescimento em sabouraud, o micélio foi transferido para o meio RPMI, incubado por duas horas para adaptação ao novo meio, sendo este tempo considerado o tempo controle do meio RPMI. Após este período de adaptação, o micélio foi coletado e incubado com ou sem adição de AUN na concentração de $17,5\text{ }\mu\text{g/mL}$, nos tempos de 3 e 12 horas. Os tempos sem droga foram denominados 3 e 12 horas controle, e os tempos com a exposição à droga foram denominados 3 horas e 12 horas AUN, respectivamente. Os micélios foram filtrados, secos e armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a extração de RNA total. Na figura 7 observa-se o delineamento deste experimento.

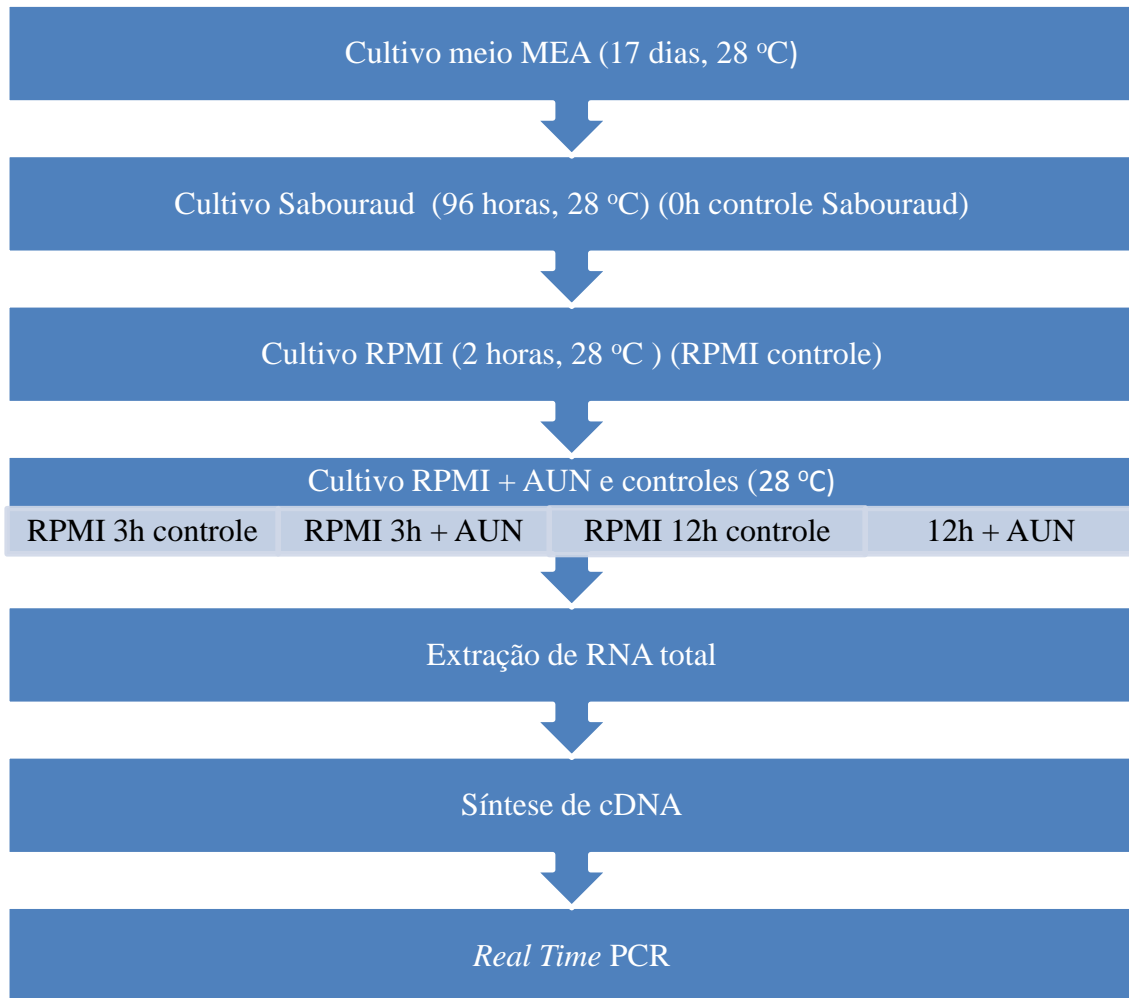


Figura 8: Desenho experimental II.

4.7 Extração do RNA total

O RNA total foi extraído com materiais livres de RNase, utilizando-se o Kit RNASpin Mini RNA Isolation Kit, da empresa G.E.[®] O procedimento para a extração foi feito seguindo as orientações recomendadas pelo fabricante, e ao final o material genético obtido foi ressuspendido em água DEPC.

As concentrações de RNA dos experimentos I e II foram determinadas por espectrofotometria utilizando-se o NanoDrop, Thermo[®]. As amostras de RNA foram tratadas com *DNase-I* (da empresa fermentas[®]), para retirada de qualquer DNA contaminante. Posteriormente, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%, para a verificação da integridade das amostras. Buscando-se maior acurácia na detecção de

degradação do RNA foi feita, para o experimento I, a análise utilizando-se o aparelho 2100 Bioanalyzer Expert, da empresa Agilent[®]. As amostras foram mantidas a -80 °C até o sequenciamento.

4.8 Análise do transcriptoma em resposta ao AUN

Neste trabalho, foram sequenciadas nove bibliotecas de cDNA, sendo 0, 3 e 12 horas com suas respectivas triplicatas biológicas. Na primeira réplica de cada amostra foram obtidas bibliotecas fita-específica com fragmentos de 100pb. As demais réplicas foram correspondentes às bibliotecas pareadas, com fragmentos de 50pb.

Obtidos os dados brutos do sequenciamento, o passo inicial das análises foi a retirada das sequências de baixa qualidade, utilizando-se o software *FastQC* (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/index.html>). Para tanto, foi estabelecido um filtro de qualidade que consiste em sequências com valores maiores que 20, um corte em acordo com o *Phred Score*. As sequências que não estavam dentro deste parâmetro foram descartadas.

Em seguida, iniciou-se a etapa de alinhamento das sequências de boa qualidade, utilizando-se como referência o genoma de *T. rubrum* disponível no banco de dados do *Broad Institute* (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/dermatophyte_comparative/MultiDownloads.html). Esta análise foi realizada utilizando-se o algoritmo *Bowtie2* (Langmead e Salzberg, 2012), que foi criado para alinhar sequências com 50pb ou menos com maior eficiência e acurácia, além disso, suporta *gaps* para sequências que apresentam 100pb ou mais. A cobertura média dos transcritos e os alinhamentos foram inspecionados visualmente utilizando-se o software *Integrative genomics viewer* (IGV) (Robinson *et al.*, 2011; Thorvaldsdottir *et al.*, 2012).

Após a etapa de alinhamento das bibliotecas submetidas ao filtro de qualidade, foram obtidos os valores de *reads count*. Esta metodologia de contagem de fragmentos por gene baseia-se na distribuição binomial negativa, aplicada para calcular a variação da expressão de um transcrito entre diferentes amostras, levando em conta a significância estatística do diferencial de expressão gênica (Anders e Huber, 2010). Para aumentar a precisão dos dados, antes dos testes estatísticos foi aplicado um filtro independente, que tem o objetivo de minimizar a ocorrência de falso positivo devido a *reads* de baixa contagem (Bourgon *et al.*,

2013). Posteriormente, foi aplicado o teste estatístico FDR (*False Discovery Rate*) sobre a significância estatística do valor de expressão gênica entre as amostras. Estas análises foram realizadas com o uso do pacote DESeq (Anders e Huber, 2010), manipulado no ambiente estatístico R.

Com os perfis transcricionais determinados, procedeu-se à categorização funcional dos genes diferencialmente expressos de acordo com o *Gene Ontology* (Blake e Harris, 2008) utilizando-se o algoritmo *Blast2GO* (Gotz *et al.*, 2008). As categorias super-representadas em cada condição foram determinadas a partir da análise de enriquecimento por meio do algoritmo *BayGO* (Vencio *et al.*, 2006). Para identificar as vias metabólicas, nas quais os genes modulados em resposta ao AUN poderiam estar envolvidos, foi realizada a anotação por meio do *Kegg Orthology* (Kanehisa *et al.*, 2009) utilizando-se o KAAS (*Kegg Automatic Annotation Server*). O organismo modelo de referência nesta análise foi o fungo filamentosso patogênico *Aspergillus fumigatus*.

4.9 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi feita utilizando-se o Kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription*[®] (Applied Biosystems[®]). Para que a reação ocorresse foi necessário 2 µg de RNA total de cada amostra, tratados com uma unidade de *DNase-I*. A reação de transcrição reversa foi feita utilizando-se 2 µL de tampão [10X], 0,8 µl dNTP mix [2,5X], 2,0 µL random primer [10X] e 1 µL de multiscribe reverse transcriptase. O volume final foi completado com q.s.p 10 µL com água DEPC esterilizada e as incubações necessárias para as reações foram de 10 min a 25 °C, seguida por 2 horas a 37 °C e finalmente, 5 min a 85 °C.

A concentração de cDNA de cada amostra foi determinada utilizando-se o aparelho Nanodrop[®], pela leitura da absorbância das preparações em 260 nm, utilizando $1_{od260} = 35$ mg/mL de cDNA como valor padrão. O grau de pureza foi avaliado pela leitura OD 260/280 nm, que para este tipo de amostra deve ser próxima a 2,0. Determinada a concentração, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% e a seguir estocadas a -20°C.

4.10 *Real Time PCR*

Alguns genes foram selecionados para a validação por *Real Time PCR*, utilizando-se triplicata biológica e técnica dos experimentos I e II. Estas PCRs foram realizadas por meio da metodologia de detecção por *Sybr Green*, de acordo com as instruções do fabricante, no aparelho *StepOnePlus Real Time PCR* (Applied Biosystems®).

Para realização destes experimentos, foi necessária a construção de oligonucleotídeos iniciadores específicos desenhados utilizando-se o software *Gene runner* (<http://www.generunner.net/>). Todos os iniciadores apresentaram temperatura de anelamento de 60 °C. Os *primers* utilizados estão descritos na tabela 1.

Tabela 1: Primers utilizados para as reações de *Real Time* PCR.

ID	Descrição do produto gênico	Primers (5' - 3')	Amplicon (pb)	Eficiência (%)	Concentração (nm)
TERG_12530	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 3-ketoacyl-CoA thiolase peroxisomal A)	F: CTCCTTATGAAGCGTTCTACCG R: AGAGGCTTAACACCGACAAC	89	98.09	700
TERG_04038	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 acyl-CoA dehydrogenase)	F: ACTCTAAGGATTGCTGATGGC R: CATTGAGTAACCTATCCGCCTC	133	100.05	700
TERG_01184	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 12797 fatty acid-binding protein)	F: AGATCGACGCTTTCCCTTC R: CGTTGGTGAGGGTGAAGG	126	99.42	300
TERG_07691	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 sterol carrier protein)	F: GTTTGGAAATGCTGGTGTCTG R: TGTACTCGGTTTGGAAATTGGG	128	97.92	700
TERG_02214	carboxypeptidase 2	F: ACGAAGGCGTCGTCACTACT R: AAAGCAACAAAGGCAAGAGC	118	101.89	700
TERG_06625	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 serine protease)	F: GCTCGATGTTAGGCATTACC R: GGTGGCGAACTTATAGGACTG	119	95.60	400
TERG_08557	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 carboxypeptidase S1)	F: GGTTTCGCTTGTTCACGGTG R: AATTCGTGGGTGTCAGTGTAG	96	100.03	700
TERG_03719	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 MFS sugar transporter)	F: TTGAGAAGGTTGAAGGGCTG R: ACTGTTTCGTCCATTCCCTG	145	96.84	700
TERG_05575	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 MFS multidrug transporter)	F: GAGGTTTGTCTGGATCGTCTG R: CCCTGATTCAAGTCATACGAG	87	99.23	800
TERG_11637	Isocitrate lyase	F: TATCCATCGTCTGGGAGAGC R: GCTTAGCGTATGCCTTGGAA	144	108.63	700
TERG_08130	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 ABC ATPase)	F: AAAGGCCGGAGTCCATTATG R: TCGAGGTCAACTTCAACATCAG	150	98.45	800
TERG_03078	hypothetical protein (<i>T. tonsurans</i> CBS 112818 fatty acid hydroxylase)	F: CCATGACAATACTCTACGGCTC R: GGCTGATCCTTGGGTACTTTG	142	95.82	800
TERG_01346	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 lipase/serine esterase)	F: TGCGGGAAATCTCACATACG R: GAGCTATCAGTCCACCCAATG	149	101.03	700
TERG_01281	malate synthase, glyoxysomal	F: ACCCCTAACCAACTCTTTGTC	145	102.92	700

TERG_07544	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 lipase)	R: GAAGCCATCCCTCCATGTAAG F: TGCCAAAGACGGTAAAGAGG	113	95.40	800
TERG_01252	Catalase A	R: TGAGAACAGAGTCGAAAACCG F: GGAGAGCTATGGTGTGGTTAC	143	100.45	500
TERG_06509	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 glutamate synthase)	R: GTTCCCTCTCGTAATTCCTGTG F: CCCACTCTACCCTTGCTATTG	71	98.74	800
TERG_05742	DNA-dependent RNA polymerase II RPB140	R: ATCTTCACCGCCTTCGCCAGTATT F: CCTCTACACTTTCCTCATCTTCG	59	94.99	200
TERG_01475	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 DNA-dependent RNA polymerase II RPB140)	R: TGACAAGACCACAAGCCTG F: TTTGGAACCCAGCGGTAAGT R: CGAGCACTGGCACTGTCAGA	63	93.69	200

(*) TERG: Número de acesso do gene no genoma de *T. rubrum* disponível no site do *Broad Institute* (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/dermatophyte_comparative/Multi_Downloads.html).

Para a análise de *Real Time* PCR foi feita a curva de dissociação, para a exclusão de todos os produtos inespecíficos da reação. Para tanto, foi realizada a quantificação de cada gene analisado, inclusive dos genes de referência, utilizando diluições seriadas de cDNA de 25 ng, 50 ng, 100 ng, 200 ng e 400 ng, para calcular a eficiência da reação e, conseqüentemente, a qualidade dos oligonucleotídeos. Subseqüentemente, foi determinada a concentração ideal para cada par de oligonucleotídeo. Para tanto, utilizou-se a concentração fixa de cDNA de 50ng e diluições seriadas dos *primers* de 200 nm, 300 nm, 400 nm, 500 nm, 600 nm, 700 nm, 800 nm, e 900 nm. Os valores de eficiência e concentração de cada par de iniciadores estão descritos na tabela 1.

Posteriormente, foi realizada a reação de *RealTime* PCR propriamente dita, visando a quantificação relativa da expressão gênica nas condições de estudo. Cada reação foi realizada em um volume final de 12,5 µl, a qual continha 1 µl de cada oligonucleotídeo iniciador, 6,25 µl de *SYBR Green* (PCR mix) e 50 ng de cDNA. As condições de ciclagem foram: um passo inicial de 2 minutos a 50 °C e 10 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15 seg, e 60 °C por 1 min.

As análises de expressão gênica dos experimentos de *Real Time* PCR foram feitas por meio da quantificação relativa dos genes de interesse, utilizando-se a metodologia $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Scheffe *et al.*, 2006). Nesta análise, a normalização dos dados foi feita com dois controles endógenos, DNA-dependent RNA polymerase II (rpbII) e a DNA topoisomerase II (Jacob *et al.*, 2012) A amostra de referência foi o tempo de 0h. As análises foram realizadas utilizando o software *StepOne Software v2.2* e o *GraphPad Prims v5*.

4.11 Análise global de *splicing* alternativo

A análise global de processamento alternativo foi realizada utilizando-se duas estratégias principais: a análise da utilização diferencial de exons e da retenção de introns.

Para a análise da utilização diferencial de exons, primeiramente foi realizado o alinhamento das bibliotecas contra o genoma de referência, utilizando-se o algoritmo *Bowtie2*, como descrito anteriormente. Após, foi feita a contagem do número de *reads* por exons nos genes anotados de *T. rubrum* e a normalização dos dados, por meio do pacote HTSeq (Anders *et al.*, 2015). Posteriormente, foi aplicado o teste estatístico FDR (*False Discovery Rate*) sobre a significância do valor de expressão de cada exon. Em seguida, foram selecionados os

exons de alguns genes para serem testados quanto a sua utilização diferencial entre as condições analisadas. Para isso, foi empregado o DEXSeq, que consiste em um pacote do Bioconductor (Anders *et al.*, 2012).

A análise de retenção de introns foi feita nos três tempos de forma independente, utilizando-se somente as bibliotecas fita-específica. Esta análise foi feita através da geração de *scripts* na linguagem *Perl*. Primeiramente, fez-se a localização dos introns no genoma de referência, posteriormente os introns localizados foram alinhados contra as bibliotecas obtidas no sequenciamento por meio do *software Bowtie2*, em seguida foi feita a contagem de *reads* para cada intron retido em cada gene. Obtidos os *reads count*, fez-se a normalização dos dados utilizando-se o tamanho das bibliotecas geradas, obtendo-se o valor de contagem de *reads/MB* para cada intron, de cada gene retido, e em cada um dos tempos analisados.

Como resultado destas análises acima mencionadas, foi obtida uma visão geral destes dois tipos de *splicing* alternativo em *T. rubrum* em resposta ao AUN, por meio da identificação dos genes que apresentaram,este processo biológico. Porém, não se sabe quanto à funcionalidade dos genes envolvidos neste processo. Para tanto, foi feita a categorização funcional destes genes em acórdância com o *Gene Ontology* (Blake e Harris, 2008), utilizando-se o algoritmo *Blast2GO* (Gotz *et al.*, 2008). As categorias representadas em cada condição foram determinadas a partir da análise de enriquecimento por meio do algoritmo *BayGO* (Vencio *et al.*, 2006).

4.12 RT-PCR

A validação dos eventos de *splicing* alternativo foi feita empregando-se a técnica de RT-PCR, e para tal objetivo foram selecionados 5 genes. Cada reação teve um volume final de 20 μL , sendo: 1 μL de cDNA (concentração de 150 ng), 2 μL de tampão (10X), 0.8 μL de MgCl_2 (concentração de 50 mM), 0.5 μL de cada oligonucleotídeo (concentração de 10 pmol), 0.8 μL de dNTP (concentração de 10 mM), 0.5 mL de taq polimerase, água destilada (q.s.p.) 20 μL . A ciclagem utilizada para a amplificação dos fragmentos foi: 95 °C por 2 min, seguido de 35 ciclos de 95 °C por 30 s, utilizando a temperatura de anelamento adequada para cada reação (variando de 56 a 60 °C dependendo do par de *primer* utilizado) por 30 s e 72 °C por 1-2 min (dependendo do tamanho do amplicom). Os *primers* usados neste experimento estão listados na tabela 2.

Tabela 2: Iniciadores utilizados para a análise de RT-PCR.

ID	Produto gênico	Sequências dos primers (5'-3')	
TERG_07943	hypothetical protein	F:	CAAGGGTGGCATCTGTGA
		R:	CGTCTGCCGATTCAAGGA
TERG_04458	3/HAM1family non-canonical purine NTP pyrophosphatase	F:	CGCAAGAGAGAAAATGTCGT
		R:	TGCTGCTGTTTCTGTTCTTC
TERG_06493	hypothetical protein (mRNA cleavage factor complex component pcf11)	F:	CAAATAAGCAATCTGACCG
		R:	ATTCTGACGCTGGATGTAG
TERG_06846	inosine-5'-monophosphate	F:	GTGGGCGGACAGAGTTT
		R:	CGGCAATGAGATATGGGACGAA
TERG_04507	hydrogenase hypothetical protein (dual specificity)	F:	GATATAACGTCTACATTGGCAG
		R:	GACGAGCCTGGTAGAGCAT
TERG_06637	Actin	F:	GAATCTCCCCCTCATGCTT
		R:	GCCTGGGCTTCCGACACT

RESULTADOS E DISCUSSÃO



V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) observada para o AUN foi 25 µg/mL, em RPMI. Este experimento foi feito em triplicata biológica e técnica. Para a realização dos experimentos de expressão gênica I e II, foi utilizada a concentração sub-inibitória da droga, que corresponde a 70% da CIM, neste caso é 17,5 µg/mL. Há relatos de concentrações de CIM, em outras linhagens de *T. rubrum* em meio Sabouraud, que variam entre 30 - 50 µg (Das e Banerjee, 1981b; Brito-Madurro *et al.*, 2005; Peres *et al.*, 2011). Portanto, há dois fatores que justificam o valor da CIM encontrado neste experimento; A mudança de meio de cultivo e a linhagem, embora a espécie seja a mesma.

5.2 Verificação da qualidade e quantificação das amostras de RNA

Após a realização dos cultivos, foi feita a extração de RNA total das amostras obtidas. As quantificações dos RNAs extraídos dos experimentos I e II estão apresentadas nas tabelas 3 e 4. Na tabela 3, pode se constatar as quantificações das amostras de RNAs obtidas nos tempos de cultivo de 0, 3 e 12 horas, do experimento I. Na tabela 4, as quantificações apontadas são referentes às amostras do experimento II, nos tempos e condições experimentais de controle Sabouraud, controle RPMI, controles RPMI 3 e 12 horas e 3 e 12 horas AUN. Em ambos os experimentos, as amostras estão em triplicata biológica.

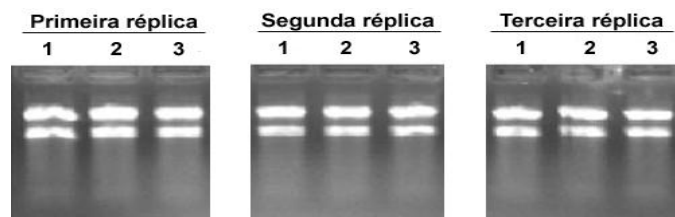
Tabela 3: Quantificação das amostras e análise de pureza das amostras de RNA do experimento I.

Amostra	Concentração (ng/□l)	Relação 260/280	Relação 260/230	RIN
0h 1ª réplica	950	2,10	2,30	9.0
0h 2ª réplica	1181	2,15	2,40	9.6
0h 3ª réplica	1890	2,17	2,42	8.1
3h 1ª réplica	1095	2,11	2,23	10
3h 2ª réplica	1141	2,14	2,06	8.2
3h 3ª réplica	1578	2,16	2,26	9.1
12h 1ª réplica	1716	2,19	2,40	9.5
12h 2ª réplica	1120	2,16	2,15	9.6
12h 3ª réplica	1057	2,14	2,24	8.5

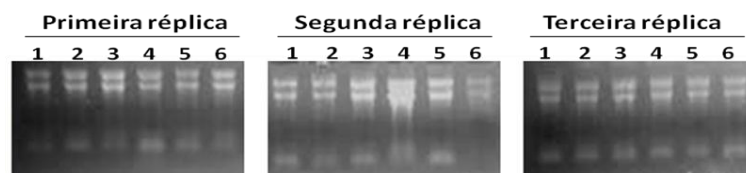
Tabela 4: Quantificação das amostras e análise de pureza das amostras de RNA do experimento II.

Amostra	Concentração (ng/ul)	Relação 260/280	Relação 260/230
Controle Sabouraud 1ª réplica	1.485	2,12	2,19
Controle Sabouraud 2ª réplica	1.794	2,15	2,31
Controle Sabouraud 3ª réplica	911	2,14	2,16
Controle RPMI 1ª réplica	1.052	2,16	2,08
Controle RPMI 2ª réplica	837	2,14	2,14
Controle RPMI 3ª réplica	1.220	2,14	2,06
3 horas RPMI 1ª réplica	1.299	2,14	2,10
3 horas RPMI 2ª réplica	1.410	2,16	2,09
3 horas RPMI 3ª réplica	856	2,11	1,96
3 horas AUN 1ª réplica	1.222	2,15	2,02
3 horas AUN 2ª réplica	1.270	2,15	2,20
3 horas AUN 3ª réplica	1.305	2,16	2,11
12 horas RPMI 1ª réplica	1.285	2,16	2,06
12 horas RPMI 2ª réplica	917	2,16	1,87
12 horas RPMI 3ª réplica	1.716	2,19	2,04
12 horas AUN 1ª réplica	1.311	2,17	2,09
12 horas AUN 2ª réplica	1.449	2,12	1,95
12 horas AUN 3ª réplica	1.314	2,13	2,10

Para checagem da integridade das amostras de RNA extraídas nas diferentes condições de cultivo de *T. rubrum*, foi realizada a eletroforese em gel de agarose em condições denaturantes. Os géis de RNA estão ilustrados nas figuras , 9 e 10.

**Figura 9: Eletroforese de RNA do experimento I.**

Foram analisados os tempos de 0h, 3h, e 12h, em triplicata biológica.

**Figura 10: Eletroforese de RNA do experimento II.**

Foram analisadas as condições: 1) controle sabouraud, 2) controle RPMI, 3) e 4) controles RPMI 3 e 12 horas, respectivamente e 5) e 6) 3 e 12 horas AUN, respectivamente.

Analisando-se os géis de agarose e as quantificações dos experimentos I e II constata-se a boa qualidade e pureza das amostras de RNA. No entanto, para a realização do sequenciamento, foi necessária uma análise mais minuciosa quanto à integridade das amostras do experimento I. Para tanto, foi empregada uma metodologia de maior acurácia, utilizando-se o bioanalisador.

No bioanalisador, é realizada uma corrida eletroforética em um capilar. Nesta corrida, os fluoróforos, contidos na matriz do gel, se ligam ao marcador de peso molecular e ao RNA, resultando na emissão de fluorescência, que é quantificada. O resultado é exibido na forma de um gráfico, onde se pode calcular o valor da integridade do RNA (RIN) por meio da análise das distâncias dos picos dos RNAs ribossomais. Os valores de RIN são demonstrados em uma escala de 1 a 10, sendo que, quanto maior a pontuação maior a qualidade e/ou integridade do RNA.

Para que o experimento de sequenciamento fosse realizado, foi necessário que as amostras de RNA tivessem ótima qualidade, o que é indicado por valores de RIN superiores a 8.0. Na tabela 3, observa-se que os valores de RIN das amostras de RNA do experimento I estão entre 8.1 e 10, indicando alto grau de integridade das amostras. Desta forma, os RNAs do experimento I foram enviados para a empresa Eurofins para o sequenciamento.

5.3 Análise de qualidade e mapeamento das *reads*

Nove bibliotecas foram sequenciadas, sendo três condições experimentais distintas (0, 3 e 12 horas) em triplicata biológica. Como resultado desta corrida foi obtido em média 58 milhões de *reads* por biblioteca. Feito o sequenciamento, o passo inicial das análises foi a retirada das sequências de baixa qualidade, utilizando-se o software *FastQC* (Patel e Jain, 2012). Na tabela 5, verifica-se a quantidade de sequências de baixa qualidade que foram removidas, representando de 1 a 14% do valor total das sequências obtidas por condição. O maior valor de corte ocorreu devido à necessidade de remoção de sequências correspondente a adaptadores, porém a quantidade de *reads* cortadas não influenciou significativamente na cobertura média do transcriptoma.

Em seguida, foi feito o alinhamento das sequências de boa qualidade, por meio do algoritmo *Bowtie2* (Langmead e Salzberg, 2012). A cobertura média dos transcritos e os alinhamentos foram inspecionados visualmente utilizando-se o software *Integrative genomics*

viewer (IGV) (Robinson *et al.*, 2011; Thorvaldsdottir *et al.*, 2012). Na tabela 5, observa-se que a taxa de alinhamento com o genoma de referência variou de 50 a 84% entre as bibliotecas.

Tabela 5: Taxa de alinhamento das sequências com o genoma de referência.

Amostras	Reads brutas	Reads de qualidade	de Reads alinhadas utilizando Bowtie2	Porcentagem de alinhamento
0h I	40.489.531	40.149.007	27.473.437	68.43%
0h II	28.987.947	27.213.240	23.039.089	84.66%
0h III	28.893.017	27.136.542	22.525.587	83.01%
3h I	60.724.079	60.235.207	30.221.364	50.17%
3h II	67.859.806	63.440.961	37.801.840	59.59%
3h III	28.182.638	26.438.636	20.611.097	77.96%
12h I	45.617.478	44.174.487	25.165.161	56.97%
12h II	30.746.489	28.524.813	16.251.516	56.98%
12h III	12.463.078	10.635.512	5.600.236	52.66%

Apesar da baixa taxa de alinhamento em algumas bibliotecas, o número de *reads* gerado é superior ao número mínimo de *reads* para alcançar a sensibilidade da técnica de *tiling arrays*, que é estimada em cerca de quatro milhões de sequências. (Agarwal *et al.*, 2010). Além disso, a baixa taxa de alinhamento pode ser devido a alguns fatores, como regiões de baixa qualidade no genoma de referência e regiões de baixa qualidade do sequenciamento. De qualquer forma, a taxa de alinhamento foi satisfatória para as condições analisadas, não prejudicando a sensibilidade da técnica.

5.4 Análise do perfil transcricional

Após a etapa de alinhamento, foram calculados os valores de *reads count* (Anders e Huber, 2010). Para aumentar a precisão dos dados, foi aplicado um filtro independente antes da análise estatística (Bourgon *et al.*, 2013). Posteriormente, foi aplicado o teste estatístico FDR (*False Discovery Rate*) sobre a significância do valor de expressão gênica entre as amostras. Estas análises foram realizadas com o uso do algoritmo DESeq (Anders e Huber, 2010), manipulado no ambiente estatístico R.

Deste modo, foram considerados diferencialmente expressos os genes que

apresentaram o filtro independente acima de 40%, e significância estatística menor que 0.05, valores mínimos indicados na literatura (Bourgon *et al.*, 2013). Além disso, foi aplicado um valor de corte estridente baseado no valor de expressão e foram considerados diferencialmente expressos os genes que apresentaram variação de expressão superior ou inferior a $\log_2 \text{fold change}$ 1,5 ou -1,5, respectivamente, como representado na figura 11. Este corte minimiza a ocorrência de falso positivo devido a genes que apresentam baixos valores de expressão. Para cada um dos tempos de exposição à droga foi gerada uma lista de genes diferencialmente expressos, apresentados na tabela suplementar 1.

Objetivando a melhoria da anotação dos genes feita para este organismo, realizou-se uma reanotação utilizando-se como referência o genoma de outros dermatófitos, também disponível no site do *Broad Institute*. Estes organismos foram escolhidos por apresentarem alto grau de similaridade com o genoma de *Trichophyton rubrum* e os produtos gênicos terem maior identidade. Os dermatófitos utilizados nesta reanotação foram identificados entre parênteses na listagem de genes diferencialmente expressos, os quais estão apresentados na tabela suplementar 1. Com a reanotação, observa-se uma melhoria significativa na anotação inicial de *T. rubrum*, o que favorece a análises dos dados e conseqüentemente uma melhor escolha dos genes a serem confirmados. A distribuição dos genes diferencialmente expressos e os valores de corte realizados podem ser observados na figura 11.

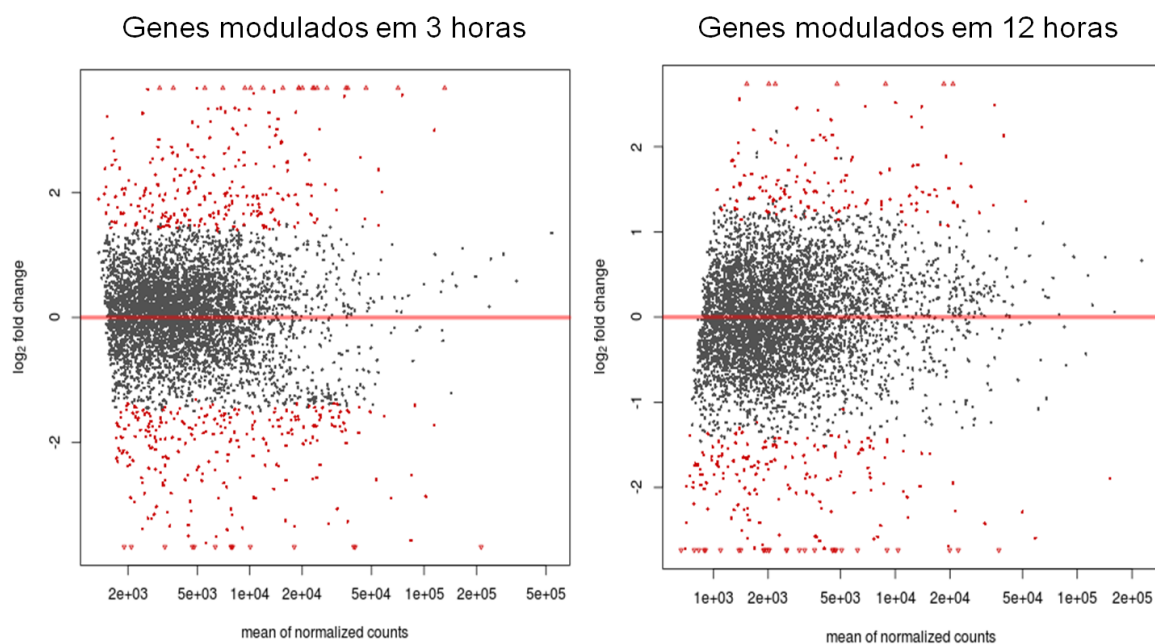


Figura 11: Distribuição dos genes modulados nos tempos de 3 e 12 horas de exposição ao AUN.

Os gráficos foram construídos utilizando-se a média das contagens de *reads* normalizadas por gene, em função de $\log_2 \text{fold change}$. Os pontos vermelhos representam os genes diferencialmente expressos em resposta à droga.

Nestes gráficos, observa-se que há maior modulação positiva no tempo de 3 horas com relação ao tempo de 12 horas. Para verificação deste dado foi feita a contagem de genes induzidos ou reprimidos nos tempos de 3 e 12 horas, como mostrado na tabela 6. Com o intuito de verificação da distribuição dos genes nos diferentes tempos de cultivo foi feito o diagrama de Venn, representado na figura 12.

Tabela 6: Genes modulados em resposta ao AUN.

Condição	Induzidos	Reprimidos
3 horas	195	190
12 horas	60	150

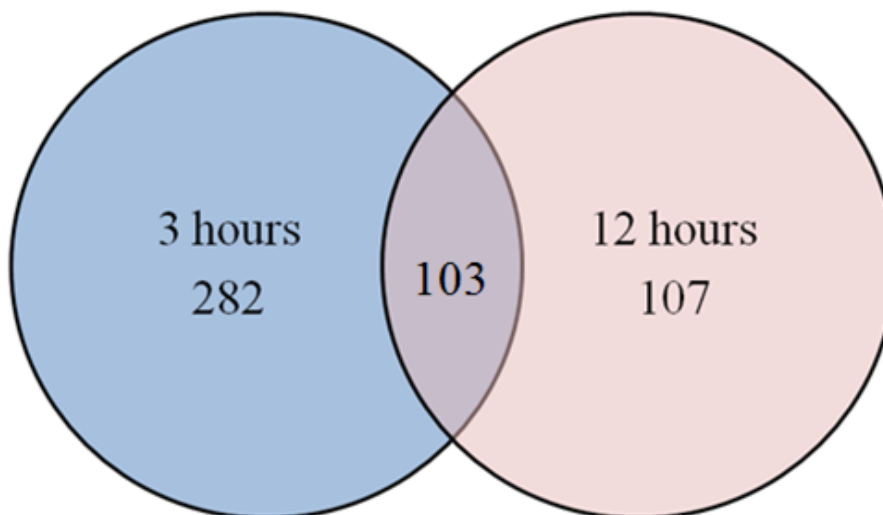


Figura 12: Diagrama de Venn dos tempos de 3 e 12 horas.

Este diagrama mostra a distribuição dos 519 genes entre os dois tempos de exposição à droga, utilizando-se o tempo 0 hora como controle.

A partir dos dados mostrados no diagrama de Venn e na tabela 6, constata-se um maior número de genes induzidos em 3 horas, e ainda verifica-se um maior número de genes reprimidos em 12 horas. Isto foi observado também quando *Trichophyton rubrum* é exposto à acriflavina (Persinoti *et al.*, 2014), sugerindo que a predominância da modulação positiva em tempos curtos, e da modulação negativa em tempos longos seja uma resposta típica de *T. rubrum* à exposição a drogas citotóxicas. Além disso, há um total de 519 genes

diferencialmente expressos, sendo 282 exclusivos em 3 horas, 107 exclusivos em 12 horas e 103 comuns entre as duas condições.

A análise inicial dos dados mostra um panorama geral de identificação e contagem dos genes diferencialmente expressos para cada condição. Porém, para compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos no sensoriamento e resposta ao AUN, é necessário que haja a inserção dos genes em um contexto fisiológico.

5.5 Categorização funcional dos genes diferencialmente expressos

Para melhor compreensão dos aspectos moleculares envolvidos na resposta a esta droga, foi feita a análise de ontologia gênica utilizando-se os *softwares* Blast2GO (Gotz *et al.*, 2008) e BayGO (Vencio *et al.*, 2006). Estes algoritmos facilitam a categorização dos genes diferencialmente expressos de acordo com sua funcionalidade e, portanto, infere funções aos genes identificados (Blake e Harris, 2008). As figuras 12 e 13 elucidam a categorização funcional dos genes diferencialmente expressos nos tempos de 3 e 12 horas em exposição ao AUN, destacando-se que somente as categorias que apresentaram no mínimo 4 genes estão inclusas nos gráficos.

Genes modulados em 3 horas

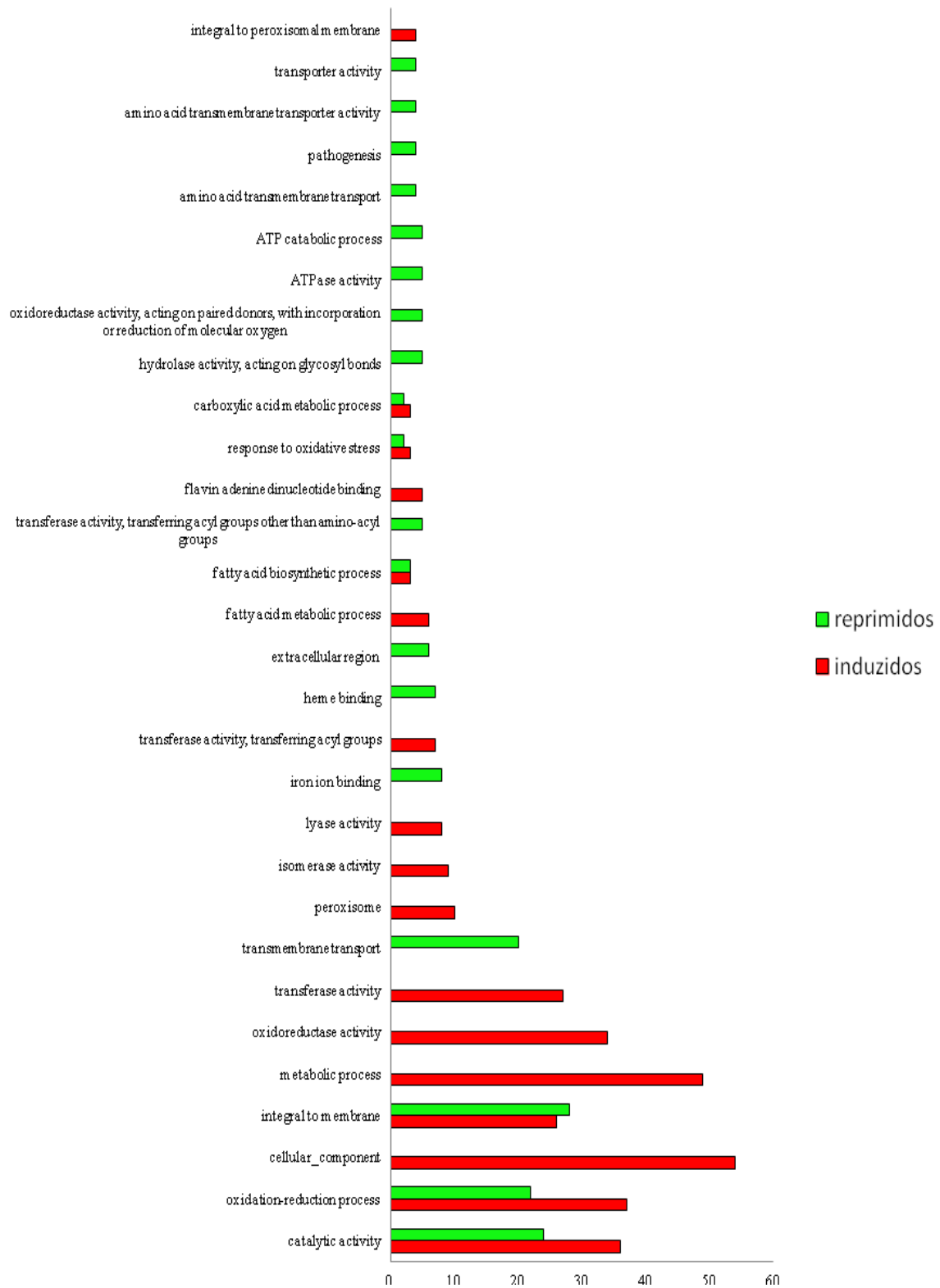


Figura 13: Categorização funcional dos genes modulados em resposta à exposição ao AUN por 3 horas.

Genes modulados em 12 horas

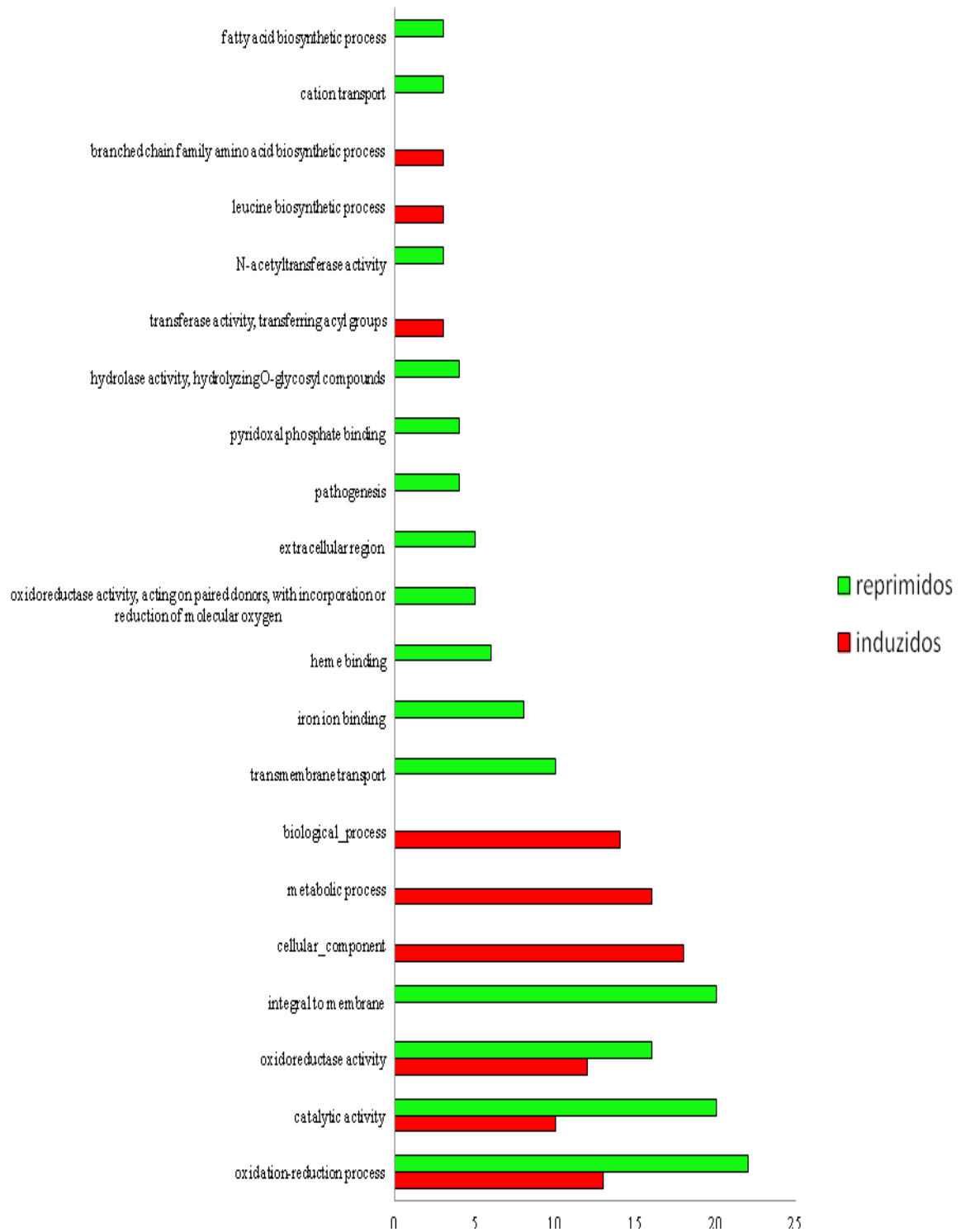


Figura 14: Categorização funcional dos genes modulados em resposta à exposição ao AUN por 12 horas.

Esta análise demonstra que o AUN modula genes envolvidos em diversos processos celulares como reações de oxidação e redução, transporte transmembrana, transporte e ligação de metais e outros íons, biossíntese de ácidos graxos, proteólise e patogenicidade, biossíntese de aminoácidos. Algumas categorias funcionais de genes ativados por esta droga foram consideradas relevantes e serão discutidas a seguir.

5.5.1 Genes relacionados à oxidação-redução

As reações de oxidação-redução envolvem a transferência de elétrons que passam de um doador, o redutor, para um aceptor, o oxidante. Um composto se torna oxidado quando perde elétrons, se ligando a um átomo mais eletronegativo. Já quando ocorre redução, o componente químico ganha elétrons e se liga a um átomo menos eletronegativo (Berg *et al.*, 2002).

Uma das categorias com maior número de representantes em ambos os tempos foi a de oxidação-redução. Dentro deste grupamento de genes, destacam-se os relacionados ao citocromo P450, representados na tabela 7. A superfamília proteica citocromo P450 (CYP) é composta por hemoproteínas altamente conservadas de bactérias a mamíferos, que catalisam reações de uma ampla variedade de compostos lipofílicos para derivados mais hidrofílicos pela introdução de um átomo de oxigênio. Esta família está envolvida em diversos processos biológicos, como metabolismo primário, metabolismo secundário, detoxificação e degradação de compostos xenobióticos (Sono *et al.*, 1996; Hannemann *et al.*, 2007; Cresnar e Petric, 2010).

Tabela 7: Genes relacionados ao citocromo P450.

ID	Descrição do produto gênico	3h	12 h
TERG_3078	hypothetical protein (<i>T. tonsurans</i> CBS 112818 fatty acid hydroxylase)	5,64	----
TERG_02747	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 cytochrome P450 alkane hydroxylase)	3.34	----
TERG_03483	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 carnitine acetyl transferase)	3.54	----
TERG_03231	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 cytochrome P45052A12)	2.35	----
TERG_00701	hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 cytochrome b5)	1.93	----

Os genes ortólogos ao CYP 52A12 em *Trichophyton tonsurans* (TERG_03231) e a alcano hidroxilase em *Arthroderma benhamiae* (TERG_02747), estão induzidos em 3 horas.

Estes genes codificam para enzimas que atuam na etapa inicial da hidroxilação de n-alcenos e ácidos graxos, os quais serão oxidados e metabolizados posteriormente através da β -oxidação. Os genes relacionados a esta família são induzíveis por n-alcenos, alcenos e ácidos graxos exógenos com cadeia variável, porém o grau de indução varia de acordo com o gene e o indutor (Craft *et al.*, 2003; Cresnar e Petric, 2010).

Observa-se também em 3 horas, a indução do ortólogo ao *p450 family fatty acid hydroxylase* de *Trichophyton tonsurans* (TERG_3078), que codifica para uma P450 monooxygenase. Esta proteína tem a função de catalisar a hidroxilação de ácidos graxos em resposta a presença de ácidos graxos tóxicos, usando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como oxidante desta reação (Nakayama *et al.*, 1996; Cresnar e Petric, 2010).

O gene ortólogo ao *cytochrome b5* de *T. verrucosum* (TERG_00701) também está induzido em 3 horas. Este gene codifica uma proteína do mesmo nome que serve como ativadora ou inibidora das enzimas da família das P450s (Cresnar e Petric, 2010). Estes genes estão relacionados ao metabolismo de ácidos graxos, provavelmente ativados com a finalidade de detoxificação celular.

Os genes diferencialmente expressos relativos à família do citocromo P450, induzidos em 3 horas, apresentam funções específicas de detoxificação celular frente a agentes tóxicos, principalmente em resposta a ácidos graxos exógenos e tóxicos ao fungo. Logo, a indução destes genes em tempos curtos indica uma resposta primária específica ao AUN.

5.5.2 Genes relacionados ao transporte

Vários dos genes modulados em resposta ao AUN estão relacionados ao transporte transmembrana e de xenobióticos. Nesta classe destacam-se os transportadores do tipo ABC (*ATP binding cassette*) e MSF (*Major Facilitator Superfamily*), listados na tabela 8.

Os transportadores do tipo ABC e MFS se destacam por serem as principais bombas de efluxo em fungos. Estes transportadores se diferenciam quanto a especificidade ao substrato, pois os transportadores ABC tem afinidade por um maior número de substratos, enquanto que os MSF possuem afinidade por um número limitado (Cannon *et al.*, 2009). Estes transportadores têm um grande significado clínico, devido à sua alta afinidade por agentes tóxicos e são considerados os principais responsáveis pela resistência e resposta a drogas (Del Sorbo *et al.*, 2000; Cannon *et al.*, 2009), atuando principalmente no efluxo de componentes tóxicos para fora da célula (Del Sorbo *et al.*, 2000).

Tabela 8: Genes relacionados aos transportadores do tipo ABC e MFS.

ID	Descrição do produto gênico	3h	12 h
TERG_00162	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 MFS multidrug transporter)	3.88	----
TERG_08336	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 MFS multidrug transporter)	2.51	----
TERG_04224	ABC transporter	2.41	----
TERG_02283	hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 MFS transporter)	2.11	----
TERG_05199	hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 MFS gliotoxin efflux transporter GliA)	2.06	----
TERG_05575	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 MFS multidrug transporter)	2.05	----
TERG_02508	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 ABC multidrug transporter)	1.91	----
TERG_01443	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 ABC multidrug transporter)	-1.92	----
TERG_01623	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 MFS transporter)	-2.02	----
TERG_01820	hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 MFS transporter)	-2.19	----
TERG_04308	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 MFS sugar transporter)	-2.54	----
TERG_04227	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 ABC transporter)	-2.60	----
TERG_12372	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 multidrug resistance protein)	----	-1.82
TERG_08613	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 ABC multidrug transporter)	----	-2.04
TERG_04765	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 MFS transporter)	2.72	3.42
TERG_05055	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 MFS multidrug transporter)	-2.02	-1.63
TERG_08130	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 ABC ATPase)	-2.03	-2.28
TERG_03984	hypothetical protein (<i>Microsporum canis</i> CBS 13480 major facilitator superfamily transporter MFS-1)	-2.14	-1.86
TERG_03719	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 MFS sugar transporter)	-2.84	-2.87
TERG_01480	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 MFS multidrug transporter)	-6.81	-1.93

Neste trabalho, observa-se que o gene ortólogo ao *mdr2* de *Arthroderma benhamiae* (TERG_08613), quando exposto ao AUN por 12 horas apresenta-se fortemente reprimido. Porém, outros trabalhos mostram que, quando a expressão deste gene é avaliada em resposta a exposição ao AUN por 15 minutos, ocorre a indução da expressão (Paião *et al.*, 2007). Este mesmo perfil pode ser observado em *T. rubrum* quando exposto à acriflavina (Paião *et al.*, 2007; Persinoti *et al.*, 2014). Ainda, foi demonstrado que a deleção de *mdr2* não afeta a suscetibilidade de *T. rubrum* a alguns agentes tóxicos que induzem o aumento da expressão deste gene, indicando uma sobreposição de funções entre os diferentes transportadores ABC

na mesma célula (Fachin *et al.*, 2006). Portanto, sugere-se a atuação temporal dos transportadores, pois quando o fungo é exposto a agentes citotóxicos, o gene *mdr2* encontra-se induzido nos tempos iniciais, e reprimido em tempos tardios.

Além disso, outros trabalhos mostram que o MDR2 é importante na resistência a algumas drogas (Martinez-Rossi *et al.*, 2008) e também na secreção de enzimas que estão envolvidas na patogenicidade desse dermatófito, afetando assim seu desenvolvimento (Maranhão *et al.*, 2009).

Nota-se ainda a ocorrência da indução em 3 horas do gene ortólogo ao *mdr1* de *Trichophyton tonsurans* (TERG_02508), sugerindo que o MDR1 esteja envolvido com o efluxo desta droga como resposta primária à exposição ao AUN, com a finalidade de aumentar a viabilidade celular.

Observa-se também a indução ou repressão de outros genes que codificam diversos tipos de transportadores em ambos os tempos, reforçando a hipótese de que haja mais de um transportador atuando de forma sinérgica na mesma célula. A diminuição da expressão de *mdr2* e dos demais transportadores, sugere que AUN atue interferindo em processos que permitem a sua extrusão, desenvolvimento e virulência do organismo. A modulação diferencial de genes envolvidos com o transporte transmembrana também é importante para a manutenção da viabilidade celular em condições fisiológicas e de estresse.

5.5.3 Genes relacionados à patogenicidade e proteólise

Foram identificados genes modulados em resposta ao AUN relacionados à patogenicidade e proteólise, os quais estão apresentados na tabela 9. Dentre eles, foram detectadas algumas exoproteases, como as leucino peptidases e dipeptidil peptidases, que juntamente com as endoproteases como a subtilisina e metaloproteases, constituem o principal fator de virulência dos dermatófitos (Monod *et al.*, 2005).

Tabela 9: Genes relacionados à proteólise.

ID	Descrição do produto gênico	3h	12h
TERG_06625	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 serine protease)	-2.42	-2.06
TERG_05735	dipeptidyl peptidase 4	-2.2	----
TERG_08557	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 carboxypeptidase S1)	-2.37	----
TERG_12606	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 protease DPPV)	----	-1.62

TERG_03681	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 leucine aminopeptidase)	----	-1.90
TERG_02214	carboxypeptidase 2	-2.37	-2.02

É descrito na literatura que o AUN diminui a secreção de queratinases e, consequentemente, a capacidade infectiva de *T. rubrum* (Das e Banerjee, 1982b). Neste trabalho, observa-se que os genes relacionados à proteólise e patogênese, os quais codificam proteases importantes na assimilação de nutrientes, apresentam-se reprimidos em resposta à exposição ao AUN. Pode-se, portanto sugerir que o AUN interfira diretamente na patogenicidade e virulência de *T. rubrum*.

5.6 Inferência das vias metabólicas

Para melhor caracterizar o mecanismo de ação desta droga foi feita a inferência das vias metabólicas envolvidas na resposta de *T. rubrum* à exposição ao AUN. Para tanto, foi empregado o algoritmo KAAS-KEGG, utilizando-se o organismo *Aspergillus fumigatus* como referência. Dentre os 519 genes diferencialmente expressos, somente 123 possuem ortólogos em *Aspergillus fumigatus*. As figuras 15 e 16 representam a proporção dos genes ortólogos com relação às vias metabólicas encontradas em cada um dos tempos.

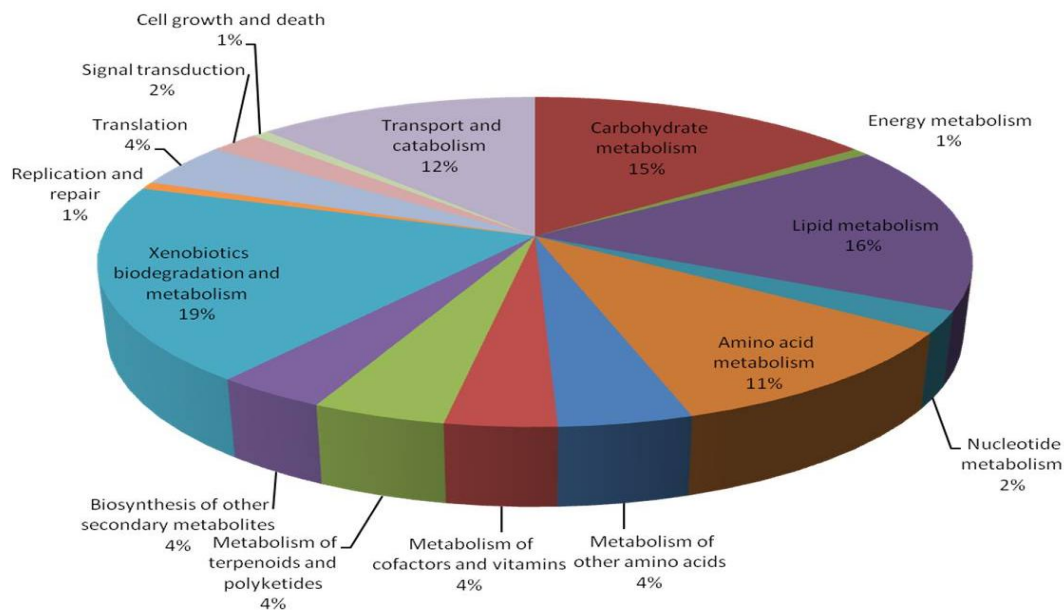


Figura 15: Vias metabólicas envolvidas na resposta à exposição ao AUN por 3 horas.

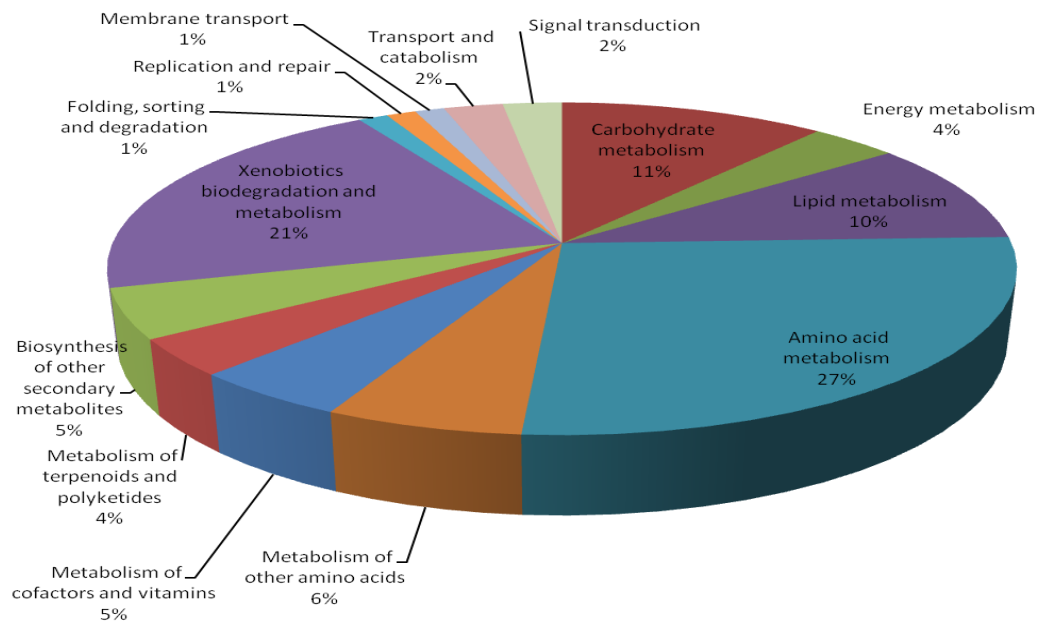


Figura 16: Vias metabólicas envolvidas na resposta exposição ao AUN por 12 horas.

Nas figuras 15 e 16, nota-se que em 3 horas há um maior número de genes relacionados ao metabolismo lipídico e de carboidratos, transporte peroxissomal e degradação de xenobióticos. Porém, em 12 horas, há uma diminuição no número de genes relacionados ao transporte peroxissomal e metabolismo lipídico, e um aumento do número de genes relacionados ao metabolismo de aminoácidos. Por se tratar de uma droga com um mecanismo de ação inespecífico, é esperado que o fungo tentasse eliminar este agente tóxico ativando e/ou reprimindo genes que envolvam diversas vias metabólicas. A seguir, serão exploradas algumas vias com maiores detalhes.

5.6.1 Genes relacionados ao metabolismo lipídico

O modo de ação dos ácidos graxos livres como agentes antimicrobianos e antimicóticos ainda é pouco conhecido, porém a sua propriedade fungicida pode ser resultado também dos produtos tóxicos de sua oxidação, como o propionyl-CoA (Matikainen *et al.*, 2014). Portanto, dentre os processos celulares envolvidos na resposta ao AUN destaca-se a via de metabolismo lipídico devido à sua grande importância na síntese e degradação de ácidos graxos e esteróides. No catabolismo dos lipídios, há de se ressaltar a beta-oxidação, por

apresentar o maior número de genes induzidos em 3 horas e ser uma das principais vias de degradação de ácidos graxos. De um modo geral, observa-se a indução de muitos genes envolvidos no metabolismo lipídico, principalmente em 3 horas, e vários deles envolvidos com a beta-oxidação e formação de esteróides. Os genes envolvidos nesta via metabólica estão listados na tabela 10.

Tabela 10: Genes relacionados ao metabolismo lipídico

ID	Descrição do produto gênico	3h	12h
TERG_05621	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 short chain dehydrogenase/reductase family oxidoreductase)	4.02	----
TERG_02909	hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 acyl-CoA oxidase)	3.81	----
TERG_01233	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 3,2-trans-enoyl-CoA isomerase)	3.34	----
TERG_02918	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 alkaline phytoceramidase)	3.05	----
TERG_07659	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 peroxisomal 3-ketoacyl-coA thiolase (Kat1))	2.97	----
TERG_11539	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 3-oxoacyl-carrier-protein reductase)	2.86	----
TERG_0754	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 lipase)	2.86	----
TERG_07691	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 sterol carrier protein)	2.74	----
TERG_03305	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 C-4 methylsterol oxidase)	2.52	----
TERG_05622	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 uridine/cytidine kinase)	1.98	----
TERG_08519	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 mitochondrial enoyl reductase)	1.98	----
TERG_01733	hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 alcohol dehydrogenase)	1.92	----
TERG_06234	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 2,5-diketo-D-gluconic acid reductase A)	1.82	----
TERG_08100	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 CDP-diacylglycerol-inositol 3-phosphatidyltransferase PIS)	1.77	----
TERG_05624	hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 C6 transcription factor)	1.71	----
TERG_08952	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 long-chain-fatty-acid-CoA ligase)	1.65	----
TERG_00919	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase)	1.61	----
TERG_06240	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 peroxisomal biogenesis factor 2)	1.60	----
TERG_02735	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 fatty acid oxygenase PpoC)	-2.06	----
TERG_06528	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 Delta(24(24(1))))-sterol reductase)	-2.08	----
TERG_01346	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 lipase/serine esterase)	----	-1.93
TERG_02704	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 short-chain dehydrogenase/reductase)	----	-1.89
TERG_02837	hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 3-beta	----	-1.56

	hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase family protein)		
TERG_12530	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 3-ketoacyl-CoA thiolase peroxisomal A)	4.19	1.50
TERG_04038	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 acyl-CoA dehydrogenase)	3.67	2.08
TERG_07721	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 isopenicillin N-CoA epimerase)	3.34	2.20
TERG_01349	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 glutathione peroxidase)	2.41	1.60
TERG_08170	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 fatty acid elongase gig30)	2.28	1.89
TERG_03343	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 fatty acid desaturase)	-3.37	-1.83
TERG_12627	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 C-5 sterol desaturase)	-3.60	-4.00

A beta-oxidação é a principal via de degradação de lipídeos. Em alguns fungos, como o *Sacharomyces cerevisiae*, esta degradação ocorre exclusivamente nos peroxissomos (Trotter, 2001). Em outros, como *Aspergillus nidulans* (Maggio-Hall e Keller, 2004) e *Neurospora crassa* (Kionka e Kunau, 1985), pode ocorrer tanto no interior dos peroxissomos quanto na mitocôndria. Uma diferença importante desta compartimentalização entre a pode ocorrer tanto no interior dos peroxissomos quanto na mitocôndria. Uma diferença importante desta compartimentalização entre a β -oxidação peroxissomal e a mitocondrial está no primeiro passo da reação.

Na mitocôndria o passo inicial da oxidação resulta na introdução de dupla ligação no composto de acil-CoA, formando trans-2-enoil-CoA, que é catalisado pela acil-CoA dehidrogenase de uma forma dependente de FAD, que pode doar elétrons para a cadeia respiratória. Nos peroxissomos, a oxidação é catalisada predominantemente pela H₂O₂, produzida pela acyl-CoA oxidase (Berg *et al.*, 2002). Em *Aspergillus nidulans* os ácidos graxos de cadeia longa e/ou ramificados são inicialmente metabolizados via beta-oxidação peroxissomal, e uma vez metabolizados em ésteres de acyl-CoA são transportados para a mitocôndria para que sejam reduzidos a acetil-CoA. Consequentemente, pode-se dizer que estas vias são complementares (Maggio-Hall e Keller, 2004). Ao ser metabolizado, o AUN gera acetil-CoA e propionil-CoA, o primeiro entra no ciclo do ácido cítrico e/ou glioxilato, e o segundo é oxidado a acetil-CoA (Brock e Buckel, 2004; Otzen *et al.*, 2014).

Os genes modulados pelo AUN relacionados à beta-oxidação estão fortemente induzidos em 3 horas, e alguns também estão induzidos em 12 horas, porém em menor intensidade. Este fato sugere que ocorra uma resposta primária intensa de ativação de genes relacionados a esta via metabólica, provavelmente com a finalidade de degradação do AUN

em moléculas menores, para que possam ser metabolizadas. Na figura 17, observa-se a ativação de genes da via de degradação de ácidos graxos modulados em resposta ao AUN.

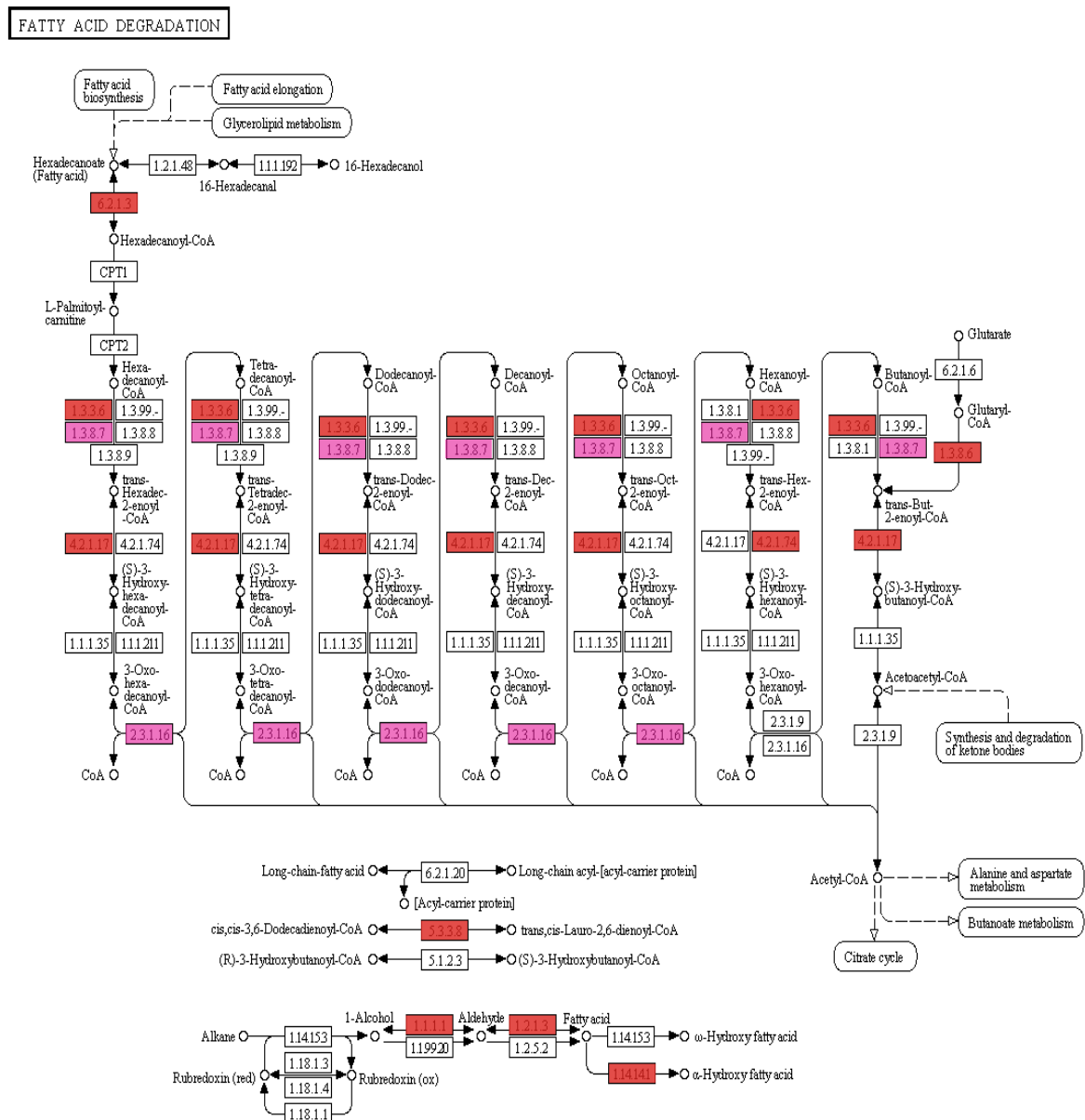


Figura 17: Ativação da via metabólica de degradação de ácidos graxos.

Estão representadas em rosa as enzimas codificadas por genes induzidos em ambos os tempos, em vermelho as enzimas codificadas por genes induzidos somente em 3 horas e em branco os genes que codificam as enzimas que não estão diferencialmente expressas.

Fonte: http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?ko00071.

Desta maneira, pode-se sugerir que em *T. rubrum* ocorra tanto a via peroxissomal quanto a mitocondrial de degradação de lipídeos, pois há ativação de genes tanto peroxissomais quanto mitocondriais, como se observa na tabela 10. Além disso, nota-se maior ativação da via de degradação de lipídios em 3 horas, esta resposta é diminuída no tempo de 12 horas. Portanto, sugere-se que esta alta indução de genes que codificam enzimas da via de

degradação de lipídeos em 3 horas seja uma reposta inicial de degradação deste componente tóxico quando *T. rubrum* é exposto ao AUN.

Ainda relacionado à via de metabolismo lipídico, observa-se a indução de vários genes relacionados à síntese e alongação de cadeia lipídica. Foi descrito que nos fungos, como *Trichoderma Koningii* e *Penicillium janthinellum*, a metabolização do AUN faz com que haja produção e estoque intracelular de lipídeos na fase exponencial de crescimento, os quais serão decompostos na fase estacionária (Chahal, *et al.*, 2014; Monreal, *et al.*, 2014). Isto reforça a hipótese de que haja degradação deste componente tóxico como forma de detoxificação celular.

Além disso, outros processos celulares, como as lipases e transportadores não específicos de lipídeos estão induzidos, principalmente em 3 horas. Este fato sugere que a droga ative várias vias deste metabolismo, com a finalidade de degradação e extrusão deste componente tóxico para a célula, como uma resposta de sobrevivência frente ao inibidor.

Na tabela 10, há alguns genes reprimidos em reposta à exposição ao AUN, e a maioria deles está relacionado com o metabolismo do ergosterol, como o *erg 3*, *erg 4* e o *erg 26*. Foi visto em outros trabalhos que o AUN afeta a composição lipídica da parede celular e a composição de esteróides em *Trichophyton rubrum* (Das e Banerjee, 1982a). Além disso, em *Sacharomyces cerevisiae*, mutantes que tiveram o gene *erg4* nocauteado são mais sensíveis ao crescimento com AUN, mostrando que *erg4* é essencial no crescimento deste fungo em resposta ao AUN (McDonough *et al.*, 2002). Porém, foi visto em *T. rubrum* que os genes *erg4* e *erg6* estão reprimidos em resposta à acriflavina, uma droga que não atua especificamente na via do ergosterol (Persinoti *et al.*, 2014). No presente trabalho, o gene *erg4* está reprimido em 3 horas e *erg3* está reprimido em ambos os tempos, sugerindo que a exposição ao AUN afetou a via de formação do ergosterol, embora esta via não seja considerada um alvo direto desta droga. Portanto, a repressão de genes relacionados à via do ergosterol é uma resposta inespecífica a este agente inibidor.

5.6.2 Genes relacionados ao transporte peroxissomal

Os peroxissomos são organelas que contêm enzimas especializadas envolvidas em diversas atividades metabólicas, dentre elas a beta-oxidação. Estas enzimas comumente incluem oxidases, que geram peróxido de hidrogênio que são removidos por catalases (Platta e Erdmann, 2007). Em alguns fungos, como o *Sacharomyces cerevisiae* a beta-oxidação é

exclusivamente peroxissomal (Trotter, 2001) em outros, como *Aspergillus nidulans*, ocorre a mitocondrial de forma complementar (Maggio-Hall e Keller, 2004).

Para que ocorra a metabolização de ácidos graxos nos peroxissomos, é necessário o transporte das moléculas para o interior da organela. As peroxinas são as proteínas responsáveis pelo transporte através da matriz dos peroxissomos até um receptor específico PST (*Peroxisomal Targeting Sequence*), o qual realiza o transporte até o lúmen peroxissomal (Platta e Erdmann, 2007). Os genes envolvidos nesta via, que tem expressão diferencial quando o fungo é submetido ao AUN, estão representados na tabela 11.

Tabela 11: Genes envolvidos no transporte peroxissomal

ID	Descrição do produto gênico	3h	12h
TERG_02909	hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 acyl-CoA oxidase, putative)	3.81	----
TERG_03483	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 carnitine acetyl transferase)	3.54	----
TERG_01233	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 3,2-trans-enoyl-CoA isomerase)	3.34	----
TERG_04500	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 peroxisomal membrane protein Pmp47)	3.31	----
TERG_03832	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 enoyl-CoA hydratase/isomerase)	3.05	----
TERG_07691	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 sterol carrier protein)	2.74	----
TERG_04010	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 sporulation protein SPS19)	2.60	----
TERG_00284	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 peroxin 14)	2.52	----
TERG_01759	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 peroxisome assembly protein 10)	1.94	----
TERG_05331	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 peroxisome biosynthesis protein)	1.80	----
TERG_02039	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 2-hydroxyphytanoyl-CoA lyase)	1.72	----
TERG_02038	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 peroxisomal targeting signal receptor)	1.67	----
TERG_08952	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 long-chain-fatty-acid-CoA ligase)	1.65	----
TERG_06732	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 peroxisomal membrane protein receptor Pex19)	1.63	----
TERG_06240	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 peroxisomal biogenesis factor 2)	1.60	----
TERG_12530	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 3-ketoacyl-CoA thiolase peroxisomal A)	4.19	1.50
TERG_07721	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 isopenicillin N-CoA epimerase)	3.34	2.20

Na tabela 11, observam-se genes envolvidos na beta-oxidação, transporte e biogênese de peroxissomos. Estes genes, em sua maioria, estão induzidos em 3 horas, e alguns poucos também em 12 horas, porém em menor intensidade. Na figura 18, estão indicadas as enzimas

codificadas pelos genes que estão diferencialmente expressos nesta via.

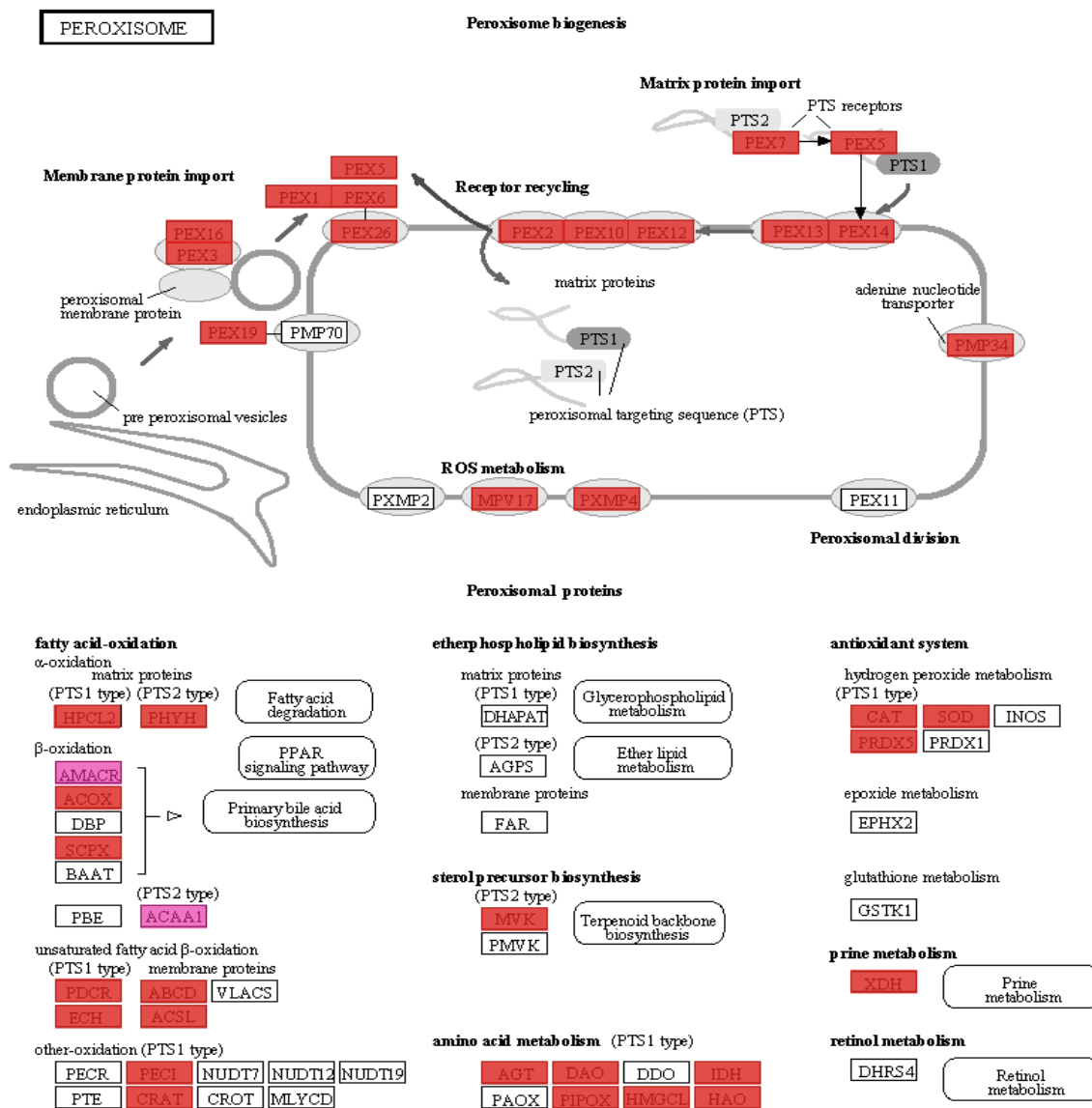


Figura 18: Ativação da via de transporte peroxissomal.

Estão representadas em rosa as enzimas codificadas por genes induzidos em ambos os tempos, em vermelho as enzimas codificadas por genes induzidos somente em 3 horas e em branco os genes que codificam as enzimas que não estão diferencialmente expressas.

Fonte: http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?ko04146.

Na figura 18 estão destacados os genes relacionados ao transporte de ácidos graxos para o interior dos peroxissomos, os quais estão ativados somente em 3 horas. Em 12 horas, estão induzidos alguns genes relacionados somente à beta-oxidação, mas em 3 horas a expressão está muito mais elevada, demonstrando que o transporte peroxissomal está altamente ativado nos tempos iniciais de contato com o AUN. Sendo assim, pode-se sugerir que a indução de genes desta via seja uma resposta primária a exposição ao AUN, uma vez que é necessária sua ativação para que ocorra a degradação de lipídios através da beta-oxidação.

5.6.3 Genes relacionados ao ciclo do glioxilato

O acetil-CoA resultante da glicólise, ou mesmo da quebra de AUN, entra para o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), onde é convertido, através de oito passos enzimáticos, em intermediários que alimentam numerosas vias, incluindo as vias de biossíntese de aminoácidos, ácidos graxos e glicólise (Lorenz e Fink, 2002). O ciclo do glioxilato (CG) é uma via alternativa ao TCA que permite a oxidação de compostos contendo 2 carbonos para formação de compostos com quatro carbonos (succinato, malato e oxaloacetato) (Kornberg, 1966). Neste processo participam enzimas comuns ao TCA e também as específicas do CG, como a Isocitrato Liase (ICL) e a Malato Sintase (MLS).

A enzima ICL catalisa a reação de clivagem do isocitrato a succinato e glioxilato. Em seguida, a enzima MLS condensa o glioxilato com acetil-CoA formando o malato (Kornberg, 1966), o qual é convertido em oxaloacetato, seguindo-se as etapas enzimaticamente idênticas às do TCA resultando na regeneração do isocitrato (Lorenz e Fink, 2002). Nas células eucarióticas, o ciclo do glioxilato é realizado em peroxissomos especializados, denominados de glioxissomos. Na tabela 12, observa-se a indução de genes que codificam enzimas exclusivas do ciclo do glioxilato, e a repressão do gene que codifica uma enzima compartilhada entre os dois ciclos.

Tabela 12: Genes envolvidos no ciclo do glioxilato.

ID	Descrição do produto gênico	3h	12h
TERG_11639	isocitrate lyase	2.64	----
TERG_11638	isocitrate lyase	2.54	----
TERG_11637	isocitrate lyase	2.54	----
TERG_01281	malate synthase, glyoxysomal	2.42	----
TERG_06291	hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 malate dehydrogenase)	-3.33	-4.33

O CG é importante para a virulência de muitos patógenos, como *Candida albicans* (Lorenz e Fink, 2001), *Cryptococcus neoformans* (Rude *et al.*, 2002) e *P. brasiliensis*. Em *T. rubrum*, tanto a malato sintase quanto a isocitrato liase apresentaram-se induzidas em meio rico em proteínas (Zaugg *et al.*, 2009). Porém, no dermatófito *Arthroderma benhamiae*, a deleção do gene que codifica a malato sintase se mostrou não essencial para a sua capacidade infectiva; contudo reduziu a habilidade de crescimento em meio contendo lipídeos como única fonte de carbono (Staib *et al.*, 2009). Isto sugere que o ciclo do glioxilato seja

importante para o metabolismo lipídico, em dermatófitos. Na figura 19, nota-se as enzimas que codificam os genes diferencialmente expressos que estão envolvidos no CG e TCA.

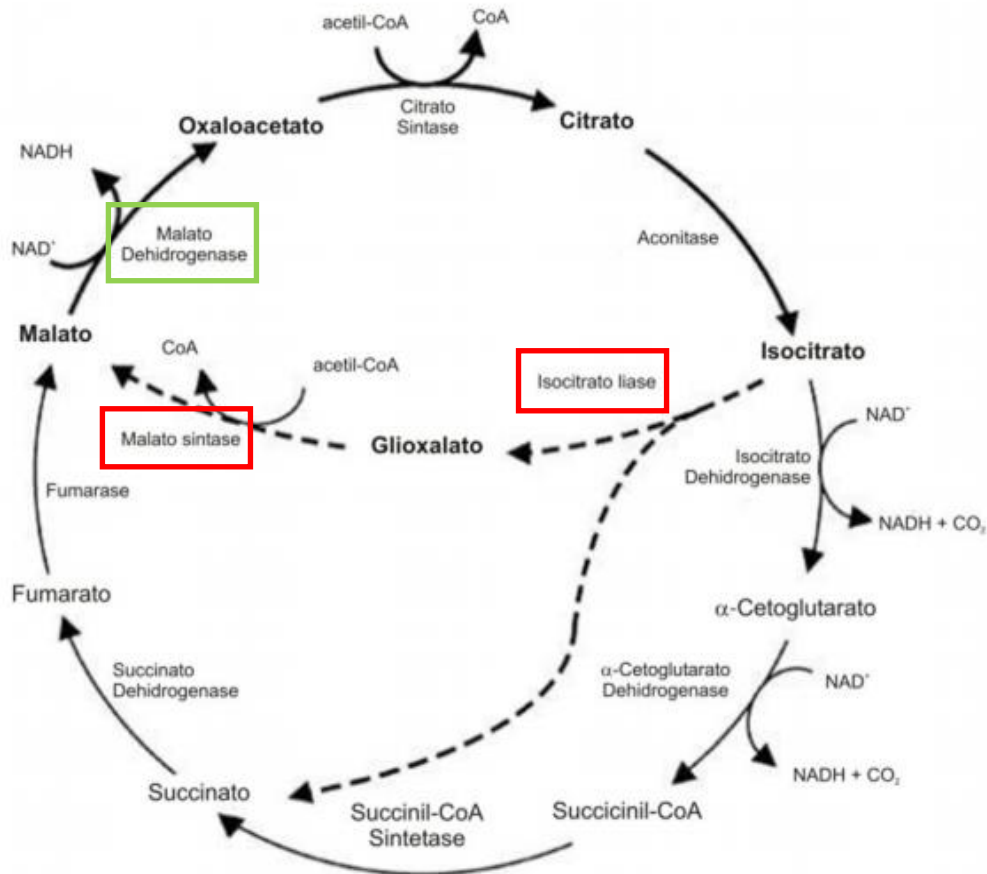


Figura 19: Ciclo do glioxilato e TCA.

Os retângulos vermelhos representam as enzimas que são codificadas por genes induzidos, e em verde os reprimidos em resposta ao AUN.

Fonte: Adaptado de Lorenz e Fink, 2002.

Destaca-se ainda que os genes que codificam as enzimas isocitrato liase e malato sintase estão induzidos, e o gene que codifica a malato dehidrogenase está reprimido, no tempo de 3 horas. As duas primeiras são enzimas específicas do ciclo do glioxilato, e a última é compartilhada por ambos os ciclos. No entanto, após exposição a acriflavina o dermatófito *T. rubrum* apresentou repressão dos genes específicos do ciclo do CG, e indução da malato dehidrogenase (Persinoti *et al.*, 2014). Desta forma, pode-se sugerir que esta indução dos genes específicos do CG seja devido a uma resposta inicial específica ao AUN e provavelmente ocorra para que haja a metabolização do acetil CoA gerado como produto da degradação do AUN.

5.6.4 Genes relacionados ao metabolismo de aminoácidos

Nesta via metabólica nota-se que, os genes modulados pelo AUN estão envolvidos na biossíntese e também na degradação de vários aminoácidos. A via de biossíntese de aminoácidos é a ligação entre o catabolismo de carbono e nitrogênio, pois a cadeia carbônica dos aminoácidos tem como precursores produtos intermediários do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA), das pentoses e via glicolítica, como mostrado na figura 20A. Construída a estrutura carbônica, são acrescentados os átomos de nitrogênio na cadeia lateral dos aminoácidos, o que confere uma forte conexão entre o metabolismo de carbono e nitrogênio (Berg *et al.*, 2002).

Na figura 20B observa-se que, os produtos finais de degradação dos aminoácidos são consumidos no ciclo do TCA sendo, portanto considerado o ponto de intersecção de várias vias metabólicas, seja pela geração de metabólitos que vão servir de precursores para a biossíntese de outras moléculas ou por metabolizar produtos secundários de degradação de vários compostos. As vias do metabolismo de aminoácidos integram a degradação dos aminoácidos e o metabolismo intermediário, podendo ser críticas para a sobrevivência em condições nas quais os aminoácidos são uma fonte significativa de energia metabólica, como no caso de carência de uma fonte de carbono primária (Berg *et al.*, 2002).

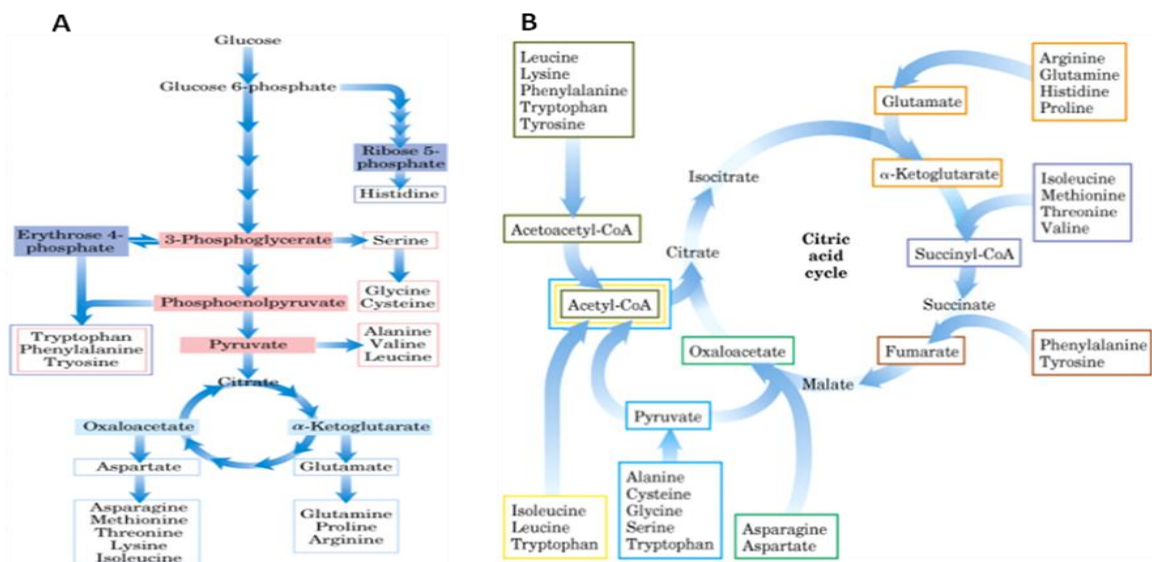


Figura 20: Via de biossíntese e degradação de aminoácidos.

A – Via de biossíntese de aminoácidos. Os precursores dos aminoácidos estão sombreados segundo sua origem sendo os da glicólise em vermelho, os do ciclo do ácido cítrico em azul e os da via das pentoses fosfato em púrpura. Os aminoácidos deles derivados estão em quadros de cores correspondentes. B- Entrada de aminoácidos primários no ciclo do TCA. Sendo que os quadros dos aminoácidos tem a cor correspondente ao produto final formado, o qual entrará no ciclo do TCA.

Fonte: http://www2.dracena.unesp.br/graduacao/arquivos/bioquimica_animal.

Tabela 13: Genes envolvidos no metabolismo de aminoácidos

ID	Descrição do produto gênico	3h	12h
TERG_05622	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 uridine/cytidine kinase)	1.98	----
TERG_05918	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 glutamyl-tRNA(Gln))	1.93	----
TERG_01733	hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 alcohol dehydrogenase)	1.92	----
TERG_07872	homoserine O-acetyltransferase	1.76	----
TERG_04658	imidazole glycerol phosphate synthase hisHF	-1.76	----
TERG_00066	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	----	1.73
TERG_02787	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 polyketide synthase)	----	-1.57
TERG_03384	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 aspartate aminotransferase)	----	-1.60
TERG_12438	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 gamma-glutamyltranspeptidase)	----	-1.82
TERG_07071	2-isopropylmalate synthase	----	-2.01
TERG_06701	gamma-glutamyltransferase	----	-2.14
TERG_00068	homogentisate 1,2-dioxygenase	----	-2.59
TERG_06727	homoserine dehydrogenase	----	-2.69
TERG_08022	hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 bZIP transcription factor CpcA)	----	-3.86
TERG_12530	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 3-ketoacyl-CoA thiolase peroxisomal A)	4.19	1.50
TERG_06509	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 glutamate synthase)	4.04	1.63
TERG_04038	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 acyl-CoA dehydrogenase)	3.67	2.08
TERG_08102	3-isopropylmalate dehydrogenase A	3.28	4.34
TERG_04753	3-isopropylmalate dehydratase, large subunit	2.49	3.60
TERG_01349	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 glutathione peroxidase)	2.41	1.60
TERG_08245	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 branched-chain amino acid aminotransferase)	1.95	1.70
TERG_00069	Fumarylacetoacetase	-1.90	-1.59
TERG_11998	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 potassium uptake transporter)	-2.13	-2.50
TERG_11997	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 potassium uptake transporter)	-2.42	-2.88
TERG_01338	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 hydantoinase)	-3.92	-2.79

A maioria dos genes induzidos em 3 horas codifica enzimas que atuam na biossíntese de diversos aminoácidos, como a glicina, prolina, cisteína e histidina e até mesmo valina, leucina e isoleucina, como observado na tabela 13. Os genes relacionados ao metabolismo de leucina, isoleucina e valina também estão induzidos em 12 horas, porém apresentam maior acúmulo de transcritos. Os genes relacionados à biossíntese de aspartato, glutamato e serina, apresentam-se reprimidos em 12 horas.

Esta resposta geral no metabolismo de aminoácidos pode ser devido à mudança de meio, uma vez que o meio RPMI é altamente rico em aminoácidos e pobre em fontes primárias de carbono, como a glicose. Portanto, sugere-se que devido à carência de glicose o fungo ative esta via para sobrevivência, utilizando os aminoácidos como fonte nutricional, logo pode ser uma resposta metabólica não específica ao AUN.

5.7 Análise da influência da mudança de meio de cultivo na expressão gênica e validação do sequenciamento por *Real time* PCR

Para a análise da influência da mudança do meio de cultura no diferencial de expressão foi feito Real Time PCR dos dois experimentos realizados, I e II. Nas figuras 21-23 estão representados os gráficos dos valores de expressão obtidos em ambos os experimentos para os 17 genes selecionados.

Na figura 21, observa-se a expressão de genes relacionados ao metabolismo lipídico e detoxificação celular. No experimento de sequenciamento, os genes estão induzidos em 3 horas, exceto a catalase que está induzida em 12 horas. Ao se comparar os experimentos I e II, nota-se que a indução observada é uma resposta à exposição ao AUN, pois esta indução ocorre também no experimento II. A exceção acontece para o gene que codifica uma *Sterol Carrier Protein*, o qual parece ter sofrido influência da mudança de meio. Nota-se também que quando exposto ao AUN no experimento II, este gene sofre uma queda no acúmulo de transcritos o que é contrário ao observado no sequenciamento, onde o gene está induzido. Porém, nos demais genes a resposta de indução observada no experimento I se mantém no experimento II, comprovando que é uma resposta à droga.

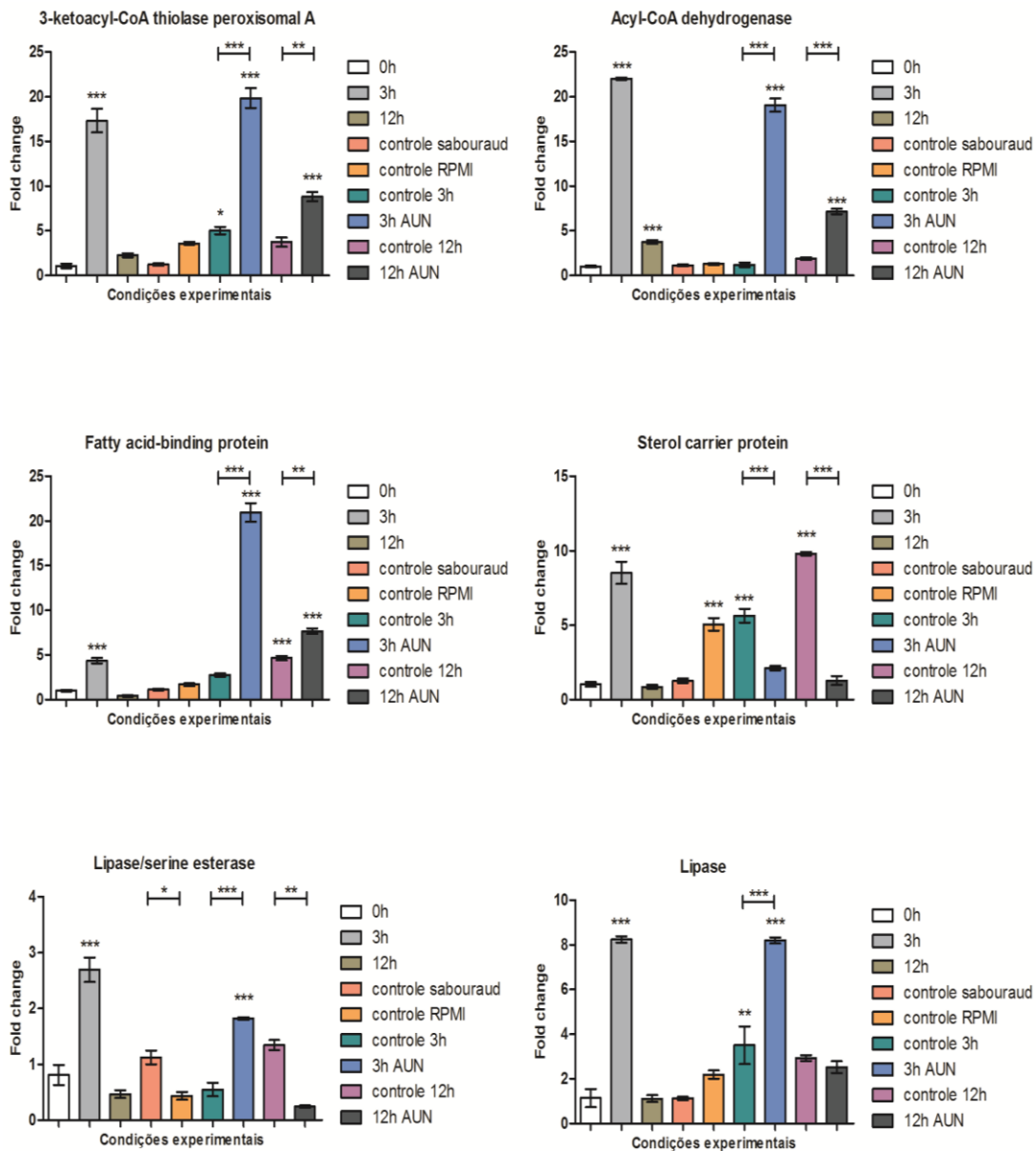


Figura 21: Real Time PCR dos genes envolvidos no metabolismo lipídico e detoxificação celular.

Experimento I são as amostras representadas como 0h, 3h e 12h. Experimento II são as amostras representadas como controle sabouraud, controle RPMI, 3h controle, 3 horas AUN, 12 horas controle e 12 horas AUN. Os valores de expressão gênica estão representados em *fold change* e as análises foram feitas utilizando o tempo de 0h como referência. A significância estatística foi determinada usando o *ad hoc* teste de Bonferroni e estão indicados por asteriscos: * indicando $p < 0.05$; ** indicando $p < 0.01$; *** indicando $p < 0.001$.

Na figura 22, nota-se que os genes relacionados à proteólise e patogênese estão reprimidos em ambos os tempos de exposição ao AUN tanto no experimento I quanto no experimento II, sugerindo que a regulação neste caso é devido à exposição ao AUN e não à mudança de meio.

Nesta mesma figura, observa-se ainda a regulação de alguns genes que codificam transportadores. O gene que codifica o *MSF multidrug transporter*, apresenta-se induzido

somente em 3 horas de exposição ao AUN, tanto no experimento I quanto no experimento II, sugerindo que esta indução ocorre em resposta à droga. Os outros dois transportadores apresentados, um transportador do tipo ABC e um *MSF sugar transporter*, estão reprimidos em ambos os tempos de exposição à droga em ambos os experimentos indicando que esta indução também ocorre em resposta à droga. Portanto, pode-se concluir que o meio de cultura não interfere significativamente na modulação destes transportadores.

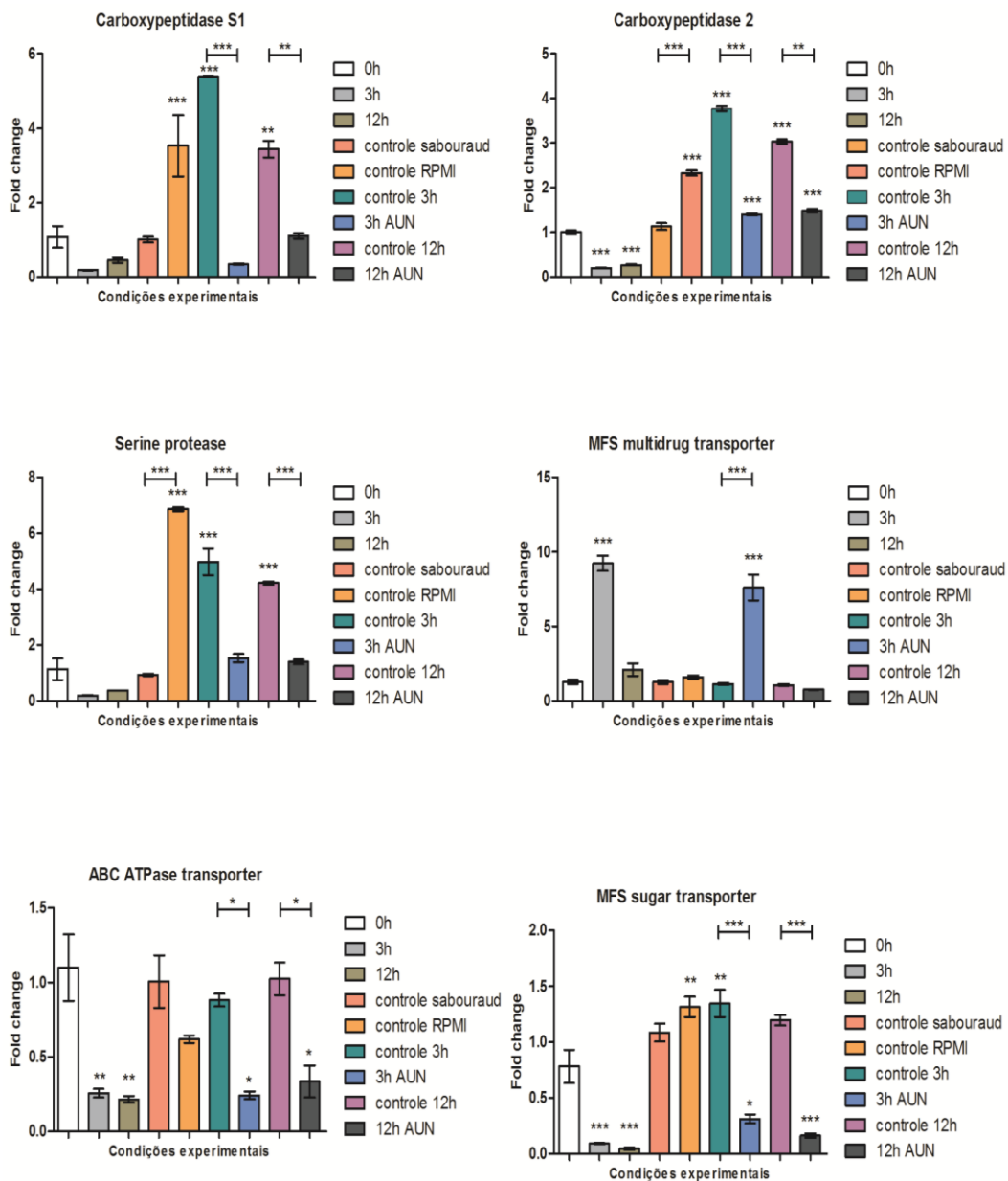


Figura 22: Real Time PCR dos genes envolvidos na proteólise e patogênese e transporte.

Experimento I são as amostras representadas como 0h, 3h e 12h. Experimento II são as amostras representadas como controle sabouraud, controle RPMI, 3h controle, 3 horas AUN, 12 horas controle e 12 horas AUN. Os valores de expressão gênica estão representados em *fold change* e as análises foram feitas utilizando o tempo de 0h como referência. A significância estatística foi determinada usando o *ad hoc* teste de Bonferroni e estão indicados por asteriscos: * indicando $p < 0.05$; ** indicando $p < 0.01$; *** indicando $p < 0.001$.

Observa-se na figura 23 que os genes relacionados ao ciclo do glioxilato, representados pela isocitrato liase e malato sintase, estão induzidos em 3 e 12 horas no experimento I. No experimento II verifica-se o mesmo perfil de expressão em resposta ao AUN. Nesta mesma figura, também se observa o perfil de expressão do gene que codifica uma glutamato sintase, relativo ao metabolismo de aminoácidos, que se apresenta induzido em ambos os tempos no experimento I. Entretanto no experimento II nota-se uma indução da expressão tanto nos tempos controles 3 e 12 horas RPMI quanto nos tempos 3 e 12 horas AUN. Logo, sugere-se que para os genes relacionados ao ciclo do glioxilato o perfil de indução observado seja devido à exposição ao AUN. Portanto, o meio de cultivo não influencia significativamente na modulação destes genes. Porém, a modulação do gene analisado relativo ao metabolismo de aminoácidos parece sofrer influência do meio RPMI em ambos os tempos.

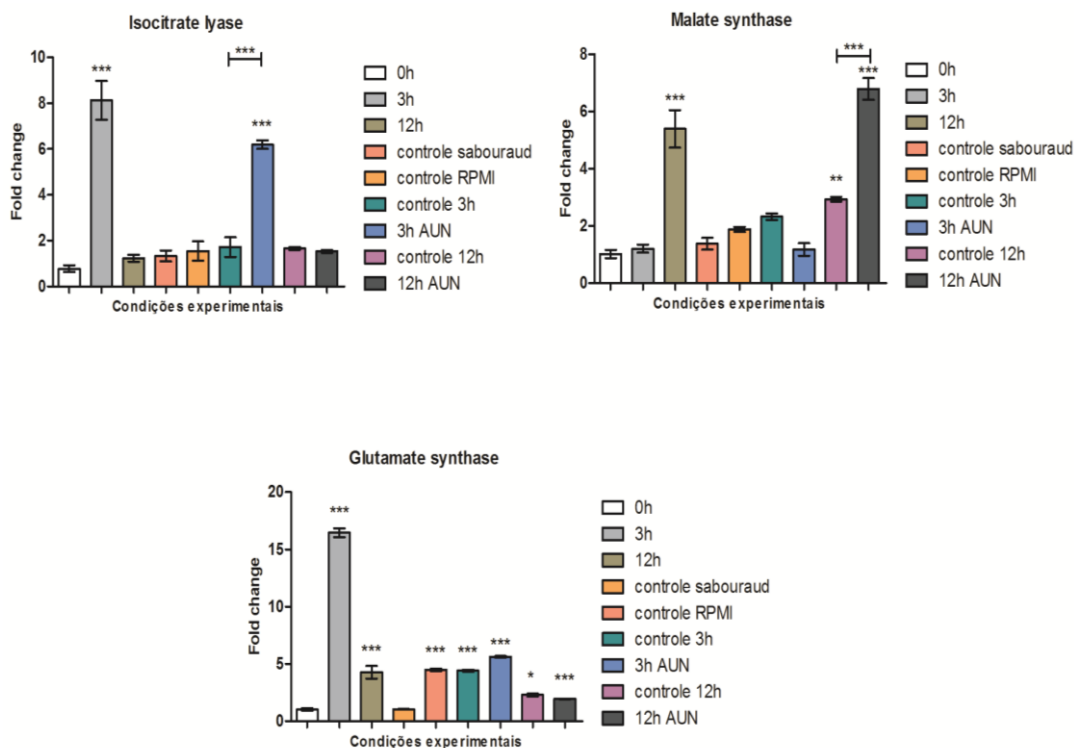


Figura 23: Real Time PCR dos genes envolvidos no ciclo do glioxilato e metabolismo de aminoácidos.

Experimento I são as amostras representadas como 0h, 3h e 12h. Experimento II são as amostras representadas como controle sabouraud, controle RPMI, 3h controle, 3 horas AUN, 12 horas controle e 12 horas AUN. Os valores de expressão gênica estão representados em *fold change* e as análises foram feitas utilizando o tempo de 0h como referência. A significância estatística foi determinada usando o *ad hoc* teste de Bonferroni e estão indicados por asteriscos: * indicando $p < 0.05$; ** indicando $p < 0.01$; *** indicando $p < 0.001$.

Por conseguinte, dos 17 genes analisados, 15 mostraram uma modulação responsiva à droga. Dois genes, um relativo a um transportador não específico de lipídeos e o outro ao metabolismo de aminoácidos, são exceções a esta regra. O gene que codifica o transportador apresentou uma resposta contrária ao observado no experimento I, e o gene que codifica uma glutamato sintase, apresentou indução de expressão em ambos os tempos, que parece ser influenciada pelo meio RPMI. O meio Sabouraud é pobre em aminoácidos, e quando o fungo é transferido para um meio rico em aminoácidos e pobre em glicose como o meio RPMI, é esperado que ele metabolizasse os aminoácidos livres presentes no meio, como fonte de nutrientes. Portanto, conclui-se que a mudança do meio de cultivo não influenciou na modulação da expressão de genes essenciais para a degradação ou extrusão da droga.

Para a validação dos dados obtidos no sequenciamento foi feito Real time PCR de alguns genes diferencialmente expressos (Stewart *et al.*, 2013). Neste trabalho, o Real time PCR foi utilizado também para avaliação da interferência da mudança do meio sabourad para o RPMI, na exposição ao AUN. Em ambos os casos, foram escolhidos 19 genes sendo que 2 deles são endógenos, os que codificam o RPBII e a DNA topoisomerase (Jacob *et al.*, 2012). Os genes avaliados neste experimento estão envolvidos em diversos processos celulares como a detoxificação celular, metabolismo lipídico, transporte, proteólise e patogênese e metabolismo de aminoácidos.

Os valores de expressão gênica obtidos no sequenciamento e na confirmação por Real Time PCR foram utilizados para traçar a correlação de Pearson entre essas duas técnicas. A correlação de Pearson (r) é um método estatístico utilizado para medir o grau de colinearidade entre duas variáveis que, neste caso foram as técnicas de RNA-Seq e Real Time PCR, com a finalidade de verificar o grau de reprodutibilidade e semelhança dos valores de expressão medidos em ambas as técnicas. Este coeficiente r tem valores entre -1 e 1. O sinal indica direção positiva ou negativa do relacionamento e o valor sugere a força da relação entre as variáveis. Uma correlação perfeita indica que o escore de uma variável pode ser determinado exatamente ao se saber o escore da outra. No outro oposto, uma correlação de valor zero indica que não há relação linear entre as variáveis. Assim, é desejável que a relação esteja o mais próximo possível de 1, sendo considerado uma correlação forte a que apresente valores de r entre 0.7 e 1, independente do sinal (Figueredo e Da Silva, 2009). Na tabela 14 estão indicados os valores de expressão resultantes de ambas as técnicas, os quais foram utilizados para calcular a correlação de Pearson. As comparações foram feitas em relação ao \log_2ratio nos tempos de 3 e 12 horas, sempre utilizando a amostra de 0 hora como referência.

Tabela 14: Correlação de Pearson

ID	Produto gênico	3horas		12 horas	
		RNA-seq	qPCR	RNA-seq	qPCR
TERG_12530	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 3-ketoacyl-CoA thiolase peroxisomal A)	4.19	4.12	1.48	1.16
TERG_04038	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 acyl-CoA dehydrogenase)	3.67	4.46	2.08	1.91
TERG_01184	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 12797 fatty acid-binding protein)	1.65	2.13	0.03	1.26
TERG_07691	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 sterol carrier protein)	2.74	3.09	0.92	-0.22
TERG_02214	carboxypeptidase 2	-2.37	-2.33	-2.02	-1.93
TERG_06625	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 serine protease)	-2.41	-2.37	-2.07	-1.44
TERG_08557	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 carboxypeptidase S1)	-2.37	-2.41	-1.5	-1.15
TERG_03719	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 MFS sugar transporter)	-2.84	-3.45	-2.87	-4.5
TERG_05575	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 MFS multidrug transporter)	2.05	3.21	-0.9	1.06
TERG_11637	Isocitrate lyase	2.64	3.02	-0.43	0.3
TERG_08130	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 ABC ATPase)	-2.03	-1.96	-2.28	-2.22
TERG_03078	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 fatty acid hydroxylase)	5.64	5.68	0.76	-0.28
TERG_01346	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 lipase/serine esterase)	1.22	1.43	-1.93	-1.11
TERG_01281	malate synthase, glyoxysomal	2.42	0.28	-0.45	2.43
TERG_07544	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 lipase)	2.86	3.04	0	0.16
TERG_01252	Catalase A	0.15	0.47	0	2.44
TERG_06509	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 glutamate synthase)	1.6	4.04	2.09	1.63

Como resultado desta comparação obteve-se $r = 0.81$, com $p < 0.05$, indicando uma forte correlação de Pearson. Isto sugere que o sequenciamento feito é confiável, ressaltando a acurácia e reprodutibilidade da técnica.

5.8. Análise de *splicing* alternativo

Em fungos filamentosos como *Neurospora crassa* e *Fusarium graminearum* foi demonstrado que os tipos mais comuns de processamento alternativo são a retenção de introns, seguida pelo uso diferencial de exons, também chamado de *exon skipping* (Kempken, 2013; Zhao *et al.*, 2013). Desta forma, foram utilizadas duas estratégias para a pesquisa de *splicing* alternativo em *T. rubrum* em resposta à exposição ao AUN: retenção de introns e a pesquisa de exons que apresente uso alternado.

5.8.1. Exons com potencial uso diferencial e contagem de introns retidos

Para as análises de exons com utilização diferencial foram empregados os algoritmos HT-Seq e DEXSeq, através dos quais foi realizada a contagem do número de *reads* por exon em cada gene e, posteriormente, a normalização dos dados (Anders *et al.*, 2012; Anders *et al.*, 2015).

Nestas análises, observou-se um total de 103 exons com potencial uso alternativo distribuídos em 69 genes, para o tempo de 3 horas. Em 12 horas, foram encontrados 40 exons com potencial uso alternativo, distribuídos em 32 genes, como observado na figura 24. Nesta figura, observa-se também que em ambos os casos foram usados cortes estatísticos de $FDR < 0.05$. Na tabela suplementar 2 estão listados os genes e exons que apresentam uso alternado.

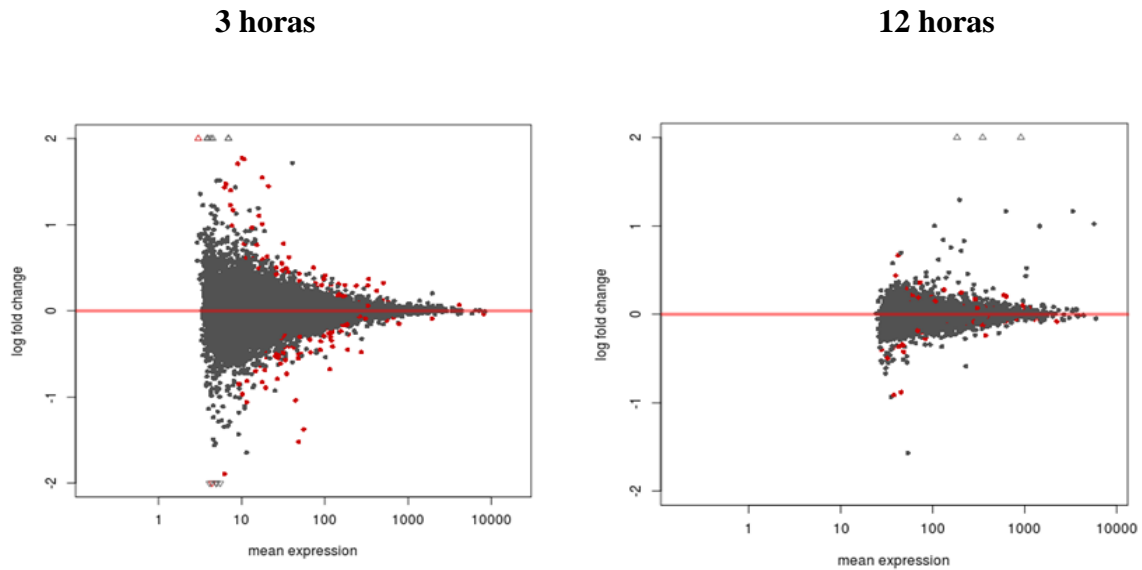


Figura 24: Representação gráfica dos genes que apresentam uso alternado de exons nos tempos de 3 e 12 horas em exposição ao AUN.

Os gráficos foram construídos utilizando-se a expressão de cada exon, em função de $\log_2 fold change$. Os pontos vermelhos representam os exons que apresentaram uso alternado em resposta à droga, com significância estatística $FDR < 0.05$.

Observando-se os gráficos nota-se maior número de exons que apresentam utilização diferencial, e maior intensidade de diferencial de expressão dos exons em 3 horas, quando comparado com o tempo de 12 horas. Isto sugere a ocorrência de uma resposta inicial maior, tanto em proporção quanto em intensidade, de exons utilizados diferencialmente.

Para a análise de retenção de introns foram utilizados *scripts* gerados na linguagem *Perl*, que tinham como objetivo primeiramente a localização dos introns no genoma de referência e posteriormente o alinhamento dos introns do genoma de referência contra as bibliotecas sequenciadas. Procedeu-se a contagem dos introns retidos e normalização dos dados.

Nestas análises, observa-se que as *reads* alinhadas nas regiões intrônicas estão distribuídas em um total de 269 introns em 204 genes para 0 hora; 154 introns em 117 genes para 3 horas e 745 introns em 571 genes para 12 horas, como mostrado na tabela complementar 3. Para uma análise mais detalhada da contagem de *reads* nos introns, foi gerado um histograma de frequência da contagem de *reads*, em escala logarítmica, por condição, como observado na figura 25.

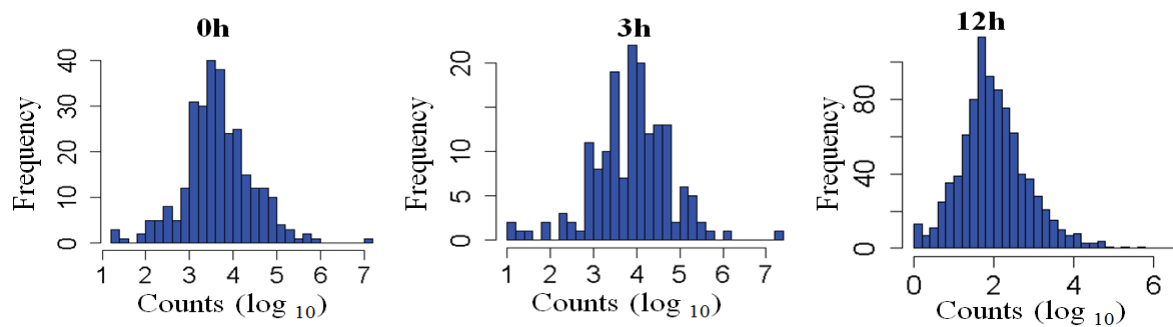


Figura 25: Histograma de retenção de introns em 0, 3 e 12 horas.

Está representada a frequência com que os introns retidos aparecem em uma determinada contagem de *reads*, em escala logarítmica na base 10 (\log_{10}). Estes gráficos apresentam picos máximos que representam a maior abundância de introns retidos em uma determinada contagem de *reads* (*Counts*).

No histograma acima, observa-se a distribuição da frequência com que os íntrons apresentam uma determinada faixa de contagem de *reads* (*Counts*), lembrando-se que neste gráfico *Counts* está em escala logarítmica (\log_{10}). Em 0 e 3 horas, nota-se uma maior quantidade de íntrons que apresentam entre 1.000 e 10.000 *reads count*, ou seja entre 3 e 4 *Counts* (\log_{10}). Porém, em 12 horas o pico do número de introns foi entre 100 e 1.000 *reads count*, ou seja, entre 2 e 3 *Counts* (\log_{10}). Logo, em 12 horas ocorre maior número de introns com menos *reads* (*Counts*), quando comparado com o tempo de 3 horas que apresenta menos íntrons retidos, porém com maior contagem.

Estas análises iniciais de ambos os tipos de processamento, discriminaram quais genes estão envolvidos no *splicing* alternativo em *T. rubrum*, em resposta à exposição ao AUN. Porém, não se sabe a funcionalidade destes genes. Com objetivo de melhor compreensão do contexto biológico no qual estes genes estão inseridos, foi feita a análise de enriquecimento dos genes que apresentam potencial para *splicing* alternativo.

5.8.2. Análise funcional *in silico* dos genes envolvidos no *splicing* alternativo

Para ampliar o conhecimento dos aspectos moleculares envolvidos no *splicing* alternativo em resposta ao AUN, foi feita a análise de ontologia gênica utilizando-se os *softwares* Blast2GO (Gotz *et al.*, 2008) e BayGO (Vencio *et al.*, 2006), com a finalidade de inferir funcionalidade aos genes que sofrem processamento alternativo. A figura 26 ilustra a categorização funcional dos genes envolvidos tanto na retenção de introns quanto no uso alternado de exons, nas diferentes condições analisadas. Destacando-se que somente as categorias que apresentaram no mínimo 3 genes estão incluídas no gráfico.

Genes envolvidos com *splicing* alternativo

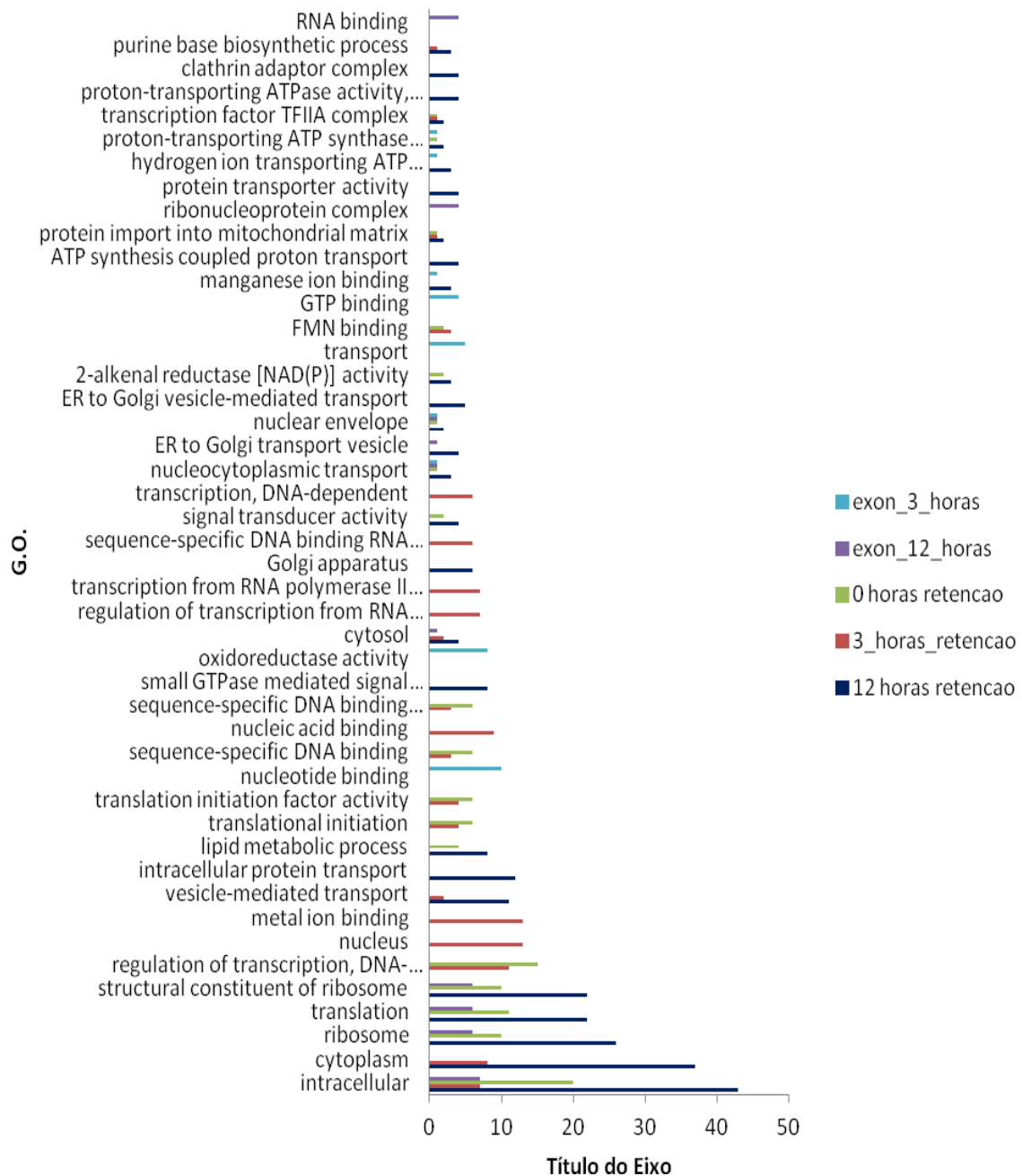


Figura 26: Categorização funcional dos genes que apresentaram potencial de *splicing* alternativo.

Neste gráfico foram analisados o uso alternado de exons e retenção de introns em todas as condições analisadas. Foram representadas somente as categorias super-representadas.

Analisando-se o gráfico de categorização funcional observa-se que o processamento alternativo, de uma forma geral, engloba genes envolvidos em funções metabólicas variadas

como tradução, transporte vesicular, metabolismo lipídico, biogênese ribossomal, sequência de ligação ao DNA, regulação da transcrição e processamento do pré-mRNA.

5.8.3 Teste do uso alternado de exons

Feita a análise de funcionalidade, foram selecionados alguns genes para a realização do teste quanto a utilização diferencial dos exons, entre as condições analisadas (Anders *et al.*, 2012). Foram selecionados dois genes diferencialmente expressos em 3 horas, sendo um deles altamente reprimido e outro mais expresso que o controle, representando genes relacionados ao metabolismo lipídico e ao transporte de mRNA, respectivamente. Já em 12 horas foi escolhido um gene relacionado à formação do corpo de woronin, pois foi descrito em *Neurospora crassa* eventos de *splicing* alternativo em resposta a variação de fosfato envolvendo este gene (Leal *et al.*, 2009). Tanto a caracterização funcional quanto os valores de expressão de cada gene e éxon estão descritos na tabela 15.

Tabela 15: Genes selecionados para o teste da utilização diferencial de éxons e exons diferencialmente expressos

ID	Descrição do produto gênico	Categorização funcional	Exon	3h	12h
TERG_00255	trimethyllysine dioxygenase	oxidoreductase activity, acting on single donors with incorporation of molecular oxygen, incorporation of two atoms of oxygen trimethyllysine dioxygenase activity carnitine biosynthetic process L-ascorbic acid binding	E010	-5.39	
TERG_04621	protein transporter SEC13	Transport, nuclear pore, mRNA transport, ER to Golgi transport vesicle membrane	E001	1.10	
TERG_04281	woronin body major protein	RNA binding, translational elongation, translation elongation factor activity, ribosome binding, positive regulation of translational termination	E004		0.09

*Os valores de expressão gênica são expressos em \log_2 ratio .

O primeiro gene a ser explorado foi o que codifica uma trimethyllysine dioxygenase, identificado pela TERG_00255, representado na figura 27. Este gene apresenta o uso alternado do exon 10. Na figura 27 nota-se o diferencial de expressão deste exon nas diferentes isoformas possíveis.

O primeiro passo da via de biossíntese da carnitina é a hidroxilação de trimethyllysine pela trimethyllysine dioxygenase, a qual está bem caracterizada em humanos, ratos e alguns

fungos como *Candida albicans*. A trimethyllysine dioxygenase é uma enzima dependente de ferro, que requer 2-oxoglutarato, ferro e oxigênio molecular como cofatores, para hidroxilar o substrato (Strijbis *et al.*, 2010). A carnitina está envolvida no transporte de ácidos graxos de cadeia longa do citosol para a mitocôndria, e também na transferência dos produtos peroxissomais da beta-oxidação (acetil CoA) para a mitocôndria, para que estes sejam metabolizados no ciclo do TCA. Quando as leveduras crescem em meios ricos em C2 como etanol ou acetato, as unidades de acetil também usam um transporte carnitina-dependente para serem transportados para a mitocôndria e, posteriormente, metabolizados no ciclo do glioxilato (Strijbis *et al.*, 2010).

Portanto, a trimethyllysine dioxygenase é uma enzima importante para o metabolismo de ácidos graxos, bem como uma conexão importante no metabolismo do carbono. Neste trabalho, observou-se a ocorrência da remoção do exon 10 do gene que codifica a trimethyllysine dioxygenase, quando *T. rubrum* foi exposto ao AUN por 3h, como visto na figura 27. Isto sugere que esteja ocorrendo uma regulação do transporte de acetil CoA para o ciclo do TCA, como um processo de regulação do ciclo, através da produção de isoformas diferentes desta proteína de transporte. Além disso, ressalta a importância do metabolismo lipídico na degradação do AUN para detoxificação celular.

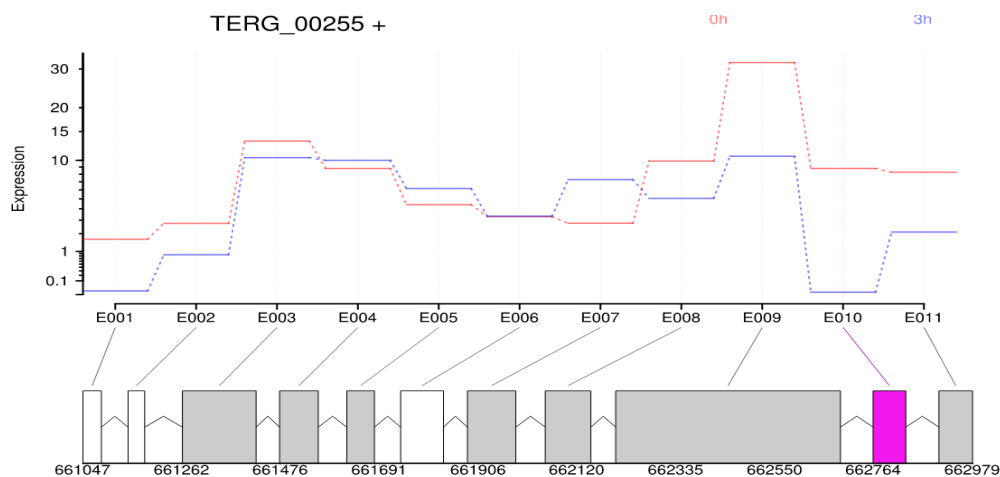


Figura 27: Utilização diferencial do exon 10, do gene que codifica a proteína trimethyllysine dioxygenase. (TERG_00255). Em rosa, destaca-se o uso alternativo do exon 10.

A proteína de transporte representada pela TERG_04621 é homóloga à SEC13 de *S. cerevisiae*, a qual funciona como componente nuclear complexo formador de poros nucleares. Além disso, são responsáveis pelo transporte de proteínas do retículo endoplasmático para o

complexo de Golgi, e também são eficientes no transporte do mRNA do núcleo para o citoplasma (Hicke *et al.*, 1997).

Observando-se a figura 28 nota-se que há expressão de duas isoformas alternativas deste gene, com *splicing* alternativo do exon 1. Pode-se sugerir então uma resposta tardia à exposição ao ácido undecanóico, a qual afeta o transporte de proteínas através do Retículo Endoplasmático por meio de *splicing* alternativo, gerando isoformas com funções diversas ou mesmo regulatórias.

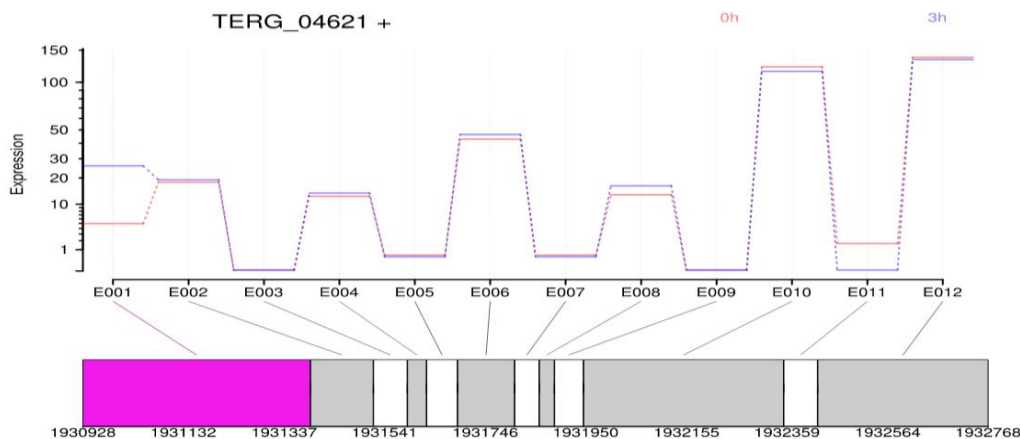


Figura 28: Utilização diferencial do exon 1, do gene que codifica a proteína de transporte SEC13. (TERG_04621). Em rosa, destaca-se o uso alternado do exon 1.

A Hex-1, ou proteína hexagonal 1, é responsável pela formação dos corpos de Woronin, que é uma vesícula derivada de peroxissomos específica de alguns gêneros de fungos filamentosos ascomicetos, responsável por selar os poros septais das hifas em resposta ao dano celular (Tey *et al.*, 2005).

Em *Neurospora crassa*, este gene apresentou retenção de introns em resposta a variações de fosfato (Leal *et al.*, 2009), no presente trabalho o gene *hex1* apresenta um potencial processamento alternativo quando exposto ao AUN em tempos tardios, como observa-se na figura 29. Logo, sugere-se que o evento de processamento alternativo neste caso, seja um mecanismo de proteção contra a ação tóxica do AUN.

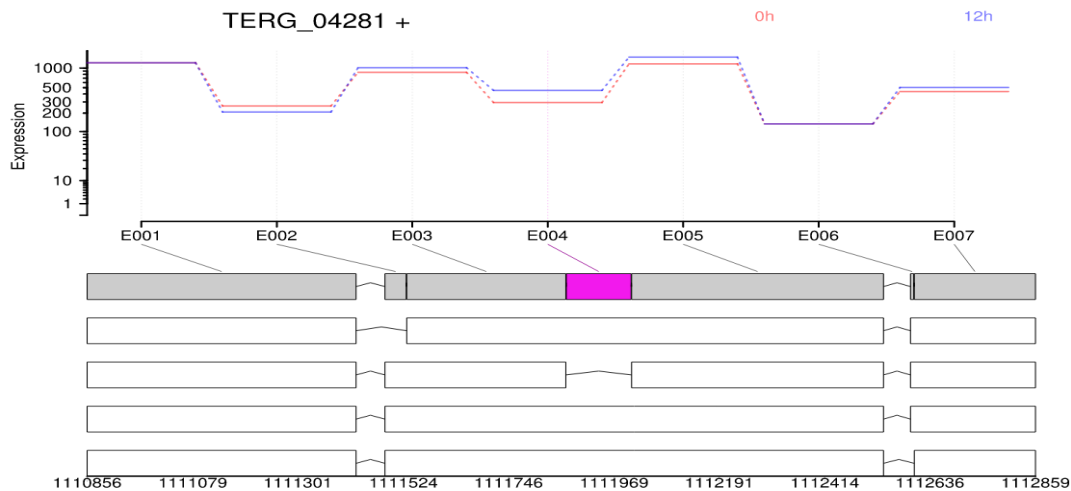


Figura 29: Utilização diferencial do exon 4, do gene que codifica a proteína Hex 1 de *T. rubrum*. (TERG_04281). Em rosa, destaca-se o uso alternado do exon 4.

Portanto, podemos concluir que o mecanismo de uso alternado de exons atinge genes com diferentes funções metabólicas, inclusive os genes envolvidos diretamente no metabolismo lipídico. Este processamento é mais abundante em 3 horas, demonstrando uma resposta inicial de maior intensidade e abrangência.

5.8.4 Confirmação *in vitro* da retenção de introns por RT-PCR

Feita a análise inicial de contagem de introns e categorização dos genes que apresentaram retenção de introns, foi necessária a confirmação das análises de *splicing* alternativo. Para tanto, fez-se a seleção de alguns genes para a realização de RT-PCR, os quais estão mostrados na figura 30.

Os genes analisados por RT-PCR foram selecionados respeitando-se alguns critérios, sendo um deles a família gênica e análise funcional. A maioria deles abrange categorias e/ou produtos gênicos envolvidos com o processamento de RNA, como nota-se na tabela 16. Dos cinco genes selecionados, dois codificam proteínas que tem função no processamento do pré-mRNA (TERG_04458 e TERG_06493), um codifica uma proteína que tem função na biossíntese de guanina, importante para a síntese de ácidos nucleicos (TERG_06846).

Outro critério utilizado para a seleção dos genes foi não apresentarem contagens em 0 horas, e além disso foi feito um filtro arbitrário para contagem de *reads* maior que 1.500, pois aplicando-se um filtro mais estrigente diminui-se as chances de ocorrerem falso positivo. Os valores de contagem de *reads* para cada gene podem ser observados na tabela 17.

Tabela 16: Genes selecionados para confirmação e categorização funcional

ID	Descrição do produto gênico	Categorização funcional
TERG_07943	hypothetical protein	cytoplasm
TERG_06846	inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	cytoplasm, adenylyl nucleotide binding, purine nucleotide biosynthetic process, GMP biosynthetic process, IMP dehydrogenase activity, metal ion binding
TERG_04458	RdgB/HAM1 family non-canonical purine NTP pyrophosphatase	cytoplasm
TERG_06493	hypothetical protein (mRNA cleavage factor complex component pcf11)	intracellular protein transport
TERG_4507	hypothetical protein (dual specificity phosphatase)	phosphatase activity, protein dephosphorylation, peptidyl-tyrosine dephosphorylation, protein tyrosine phosphatase activity, protein tyrosine/serine/threonine phosphatase activity

Tabela 17: Contagem de *reads* e tamanho esperado dos íntrons retidos

ID	Intron	0 h (reads)	3 h (reads)	12 h (reads)	Tamanho dos íntrons (pb)
TERG_07943	1	0	0	0	58
	2	0	0	35846	293
TERG_06846	1	0	0	0	72
	2	0	9285	3792	204
TERG_04458	1	0	0	0	82
	2	0	0	0	75
	3	0	0	1843	268
	4	0	0	0	69
	5	0	0	0	74
TERG_06493	1	0	0	8747	199
	2	0	0	0	61
	3	0	0	0	60
	4	0	0	0	61
	5	0	0	0	74
TERG_04507	1	0	18093	292	112
	2	0	0	0	72

Na figura 30 estão mostrados os géis de confirmação da retenção de íntrons através de RT-PCR. Para a construção dos oligonucleotídeos iniciadores para a realização da reação de RT-PCR, foram escolhidos regiões que flanqueavam toda a estrutura gênica, ou seja, todos os íntrons e exons de cada gene escolhido.

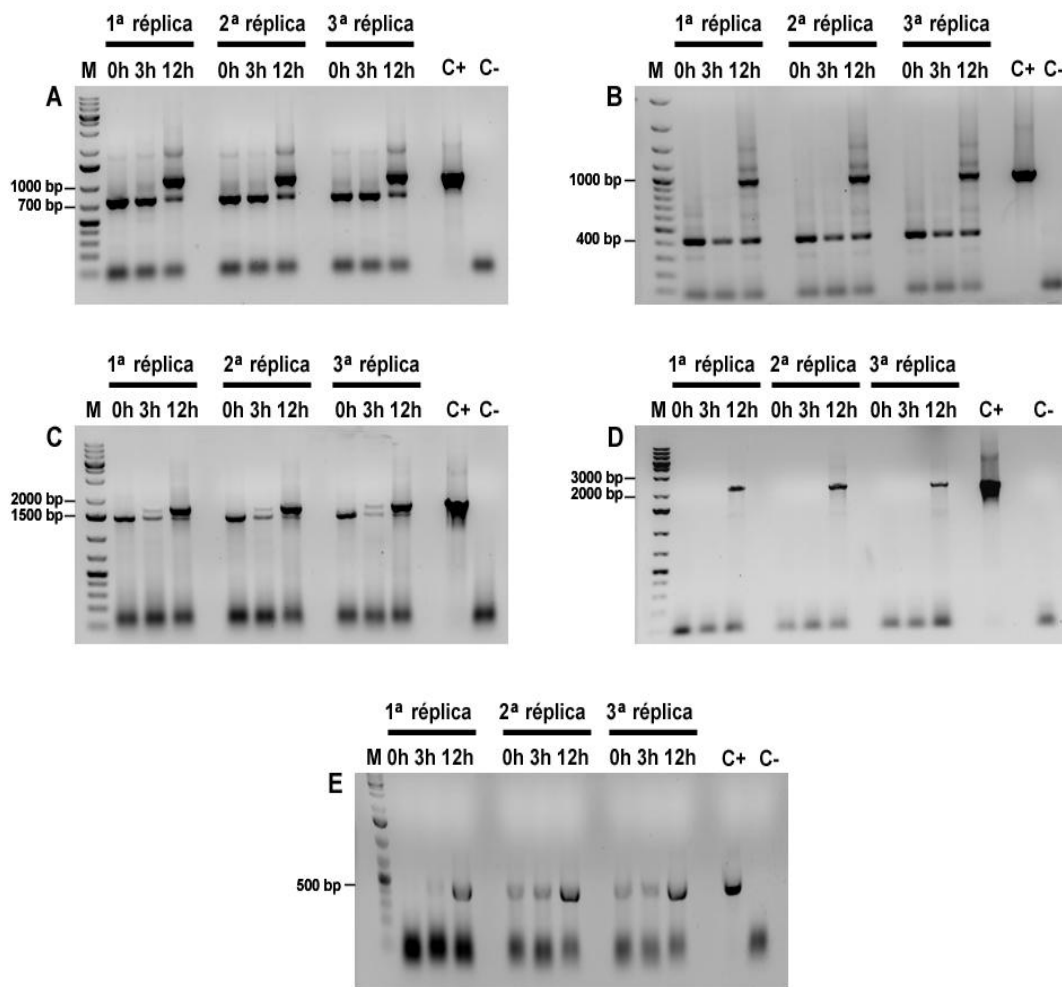


Figura 30: Validação das análises de retenção de íntrons usando RT-PCR.

As figuras A – E representam os géis de agarose dos genes: (A) – TERG_07943, (B) – TERG_04458, (C) – TERG_06846, (D) – TERG_06493, (E) – TERG_04507, respectivamente. As colunas representam: M - Marcador de peso molecular; C+ e C- representam os controles positivos e negativos, respectivamente.

Tabela 18: Tamanhos dos amplicons esperados no gel de agarose com e sem retenção de íntrons

ID	Amplicon com retenção (pb)	Amplicon sem retenção (pb)
TERG_07943	1122	771
TERG_06846	1717	1441
TERG_04458	990	423
TERG_06493	2278	18823
TERG_04507	511	327

Todos os genes analisados possuem mais de um intron em sua estrutura, como pode-se notar na tabela 17. Nesta mesma tabela, observa-se os *reads count*, tamanho de cada intron, e qual o intron está retido. Assim, pode-se notar que, nestes genes selecionados, a retenção ocorre somente para um dos íntrons de cada gene. Em contraste, ao analisar-se as figuras 30

A-E e a tabela 18, que contem os geis de amplificação dos genes e os tamanhos do amplicon com ou sem retenção de todos os íntrons do gene, nota-se que aparentemente todos os genes apresentam retenção de todos os íntrons, e não somente do intron que apresentou contagem de *reads*. Contudo, as condições em que foi previsto a retenção intrônica pela contagem de *reads* foram as mesmas que as visualizadas nos géis de agarose, isto em todos os genes analisados. Desta forma, confirma-se que ocorreu retenção de íntrons nas condições previstas pela análise de contagem de *reads*, porém não se pode afirmar qual intron de cada gene está retido.

A maioria dos genes analisados está relacionada à biossíntese e processamento de RNA, os quais apresentam retenção principalmente em tempos tardios de exposição à droga. A partir disto pode-se sugerir que a regulação da biossíntese e processamento de RNA sofram interferência do ácido undecanóico em tempos longos de exposição à droga, indicando uma autorregulação da maquinaria de splicing em tempos tardios de exposição.

CONCLUSÃO

VI CONCLUSÃO

Pelo trabalho apresentado acima, pode-se concluir que:

- ✓ Na análise global do perfil transcricional em resposta ao AUN, há uma predominância da modulação positiva em tempos curtos e da modulação negativa em tempos longos. Provavelmente esta resposta seja típica de *T. rubrum* quando exposto a drogas citotóxicas.
- ✓ Devido ao amplo espectro de ação de AUN constatou-se a regulação de genes envolvidos em diversos processos celulares, como forma de detoxificação celular.
- ✓ Sugeriu-se que o fungo apresente dois mecanismos principais de sobrevivência perante o AUN: a degradação via beta-oxidação e ciclo do glioxilato; e o efluxo, via transportadores como MDR1, que apresentam acúmulo de transcritos. Em ambos os casos, a resposta em tempos mais curtos é mais evidente.
- ✓ O AUN reprime genes supostamente relacionados à virulência e capacidade infectiva do dermatófito, tanto em tempos iniciais quanto em tempos tardios, indicando uma atenuação da virulência de *T. rubrum* provocada pela exposição ao AUN.
- ✓ Esta droga atua também na via de biossíntese do ergosterol, embora esta via não seja um alvo específico desta droga.
- ✓ A interferência do meio de cultivo nos genes essenciais das vias de degradação e efluxo da droga, bem como nos genes relativos à patogenicidade não é significativa. Portanto estas respostas são devidas à exposição ao agente citotóxico. Porém o metabolismo de aminoácidos sofreu interferência significativa da mudança de meio de cultivo, sendo uma resposta metabólica geral e não específica ao AUN.
- ✓ Em 12 horas ocorre maior número de introns com menos *reads* (Counts), quando comparado com o tempo de 3 horas que apresenta menos íntrons retidos, porém com maior contagem.
- ✓ O processamento alternativo em resposta ao AUN, de uma forma geral, engloba genes envolvidos em funções metabólicas variadas como tradução, transporte vesicular, metabolismo lipídico, biogênese ribossomal, sequência de ligação ao DNA, regulação da transcrição e processamento do pré-mRNA.
- ✓ Genes envolvidos no processamento de pré-mRNA e biossíntese de RNA sofrem processamento alternativo por retenção de introns, indicando uma auto-regulação da maquinaria de *splicing* em tempos tardios de exposição ao AUN.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agarwal, A.;D. Koppstein;J. Rozowsky;A. Sboner;L. Habegger;L. W. Hillier;R. Sasidharan;V. Reinke;R. H. Waterston e M. Gerstein. Comparison and calibration of transcriptome data from RNA-Seq and tiling arrays. BMC Genomics, v.11, p.383. 2010.
- Agarwal, A. K.;P. D. Rogers;S. R. Baerson;M. R. Jacob;K. S. Barker;J. D. Cleary;L. A. Walker;D. G. Nagle e A. M. Clark. Genome-wide expression profiling of the response to polyene, pyrimidine, azole, and echinocandin antifungal agents in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem., v.278, n.37, Sep 12, p.34998-5015. 2003.
- Ammendola, S.;A. Lembo;A. Battistoni;P. Tagliatesta;C. Ghisalberty e A. Desideri. 10-undecanhydroxamic acid, a hydroxamate derivative of the undecanoic acid, has strong antimicrobial activity through a mechanism that limits iron availability. FEMS Microbiol Lett, v.294, n.1, May, p.61-7. 2009.
- Anders, S. e W. Huber. Differential expression analysis for sequence count data. Genome Biol, v.11, n.10, p.R106. 2010.
- Anders, S.;P. T. Pyl e W. Huber. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. Bioinformatics, v.31, n.2, Jan 15, p.166-9. 2015.
- Anders, S.;A. Reyes e W. Huber. Detecting differential usage of exons from RNA-seq data. Genome Res, v.22, n.10, Oct, p.2008-17. 2012.
- Atlas, R. M. Handbook of microbiological media: CRC Press. 1993. 786 p. (Perks, L. C.)
- Avrahami, D. e Y. Shai. Conjugation of a magainin analogue with lipophilic acids controls hydrophobicity, solution assembly, and cell selectivity. Biochemistry, v.41, n.7, Feb 19, p.2254-63. 2002.
- _____. Bestowing antifungal and antibacterial activities by lipophilic acid conjugation to D,L-amino acid-containing antimicrobial peptides: a plausible mode of action. Biochemistry, v.42, n.50, Dec 23, p.14946-56. 2003.
- Berg, J. M.;J. L. Tymoczko e L. Stryer. Bioquímica: Guanabara koogan. 2002
- Blake, J. A. e M. A. Harris. The Gene Ontology (GO) project: structured vocabularies for molecular biology and their application to genome and expression analysis. Curr Protoc Bioinformatics, v.Chapter 7, Sep, p.Unit 7 2. 2008.
- Blyth, C. C. Antifungal azoles: old and new. Pediatr Infect Dis J, v.30, n.6, Jun, p.506-7. 2011.
- Bogatcheva, E.;T. Dubuisson;M. Protopopova;L. Einck;C. A. Nacy e V. M. Reddy. Chemical modification of capuramycins to enhance antibacterial activity. J Antimicrob Chemother, v.66, n.3, Mar, p.578-87. 2011.
- Bourgon, R.;R. Gentleman e W. Huber. Independent filtering increases detection power for high-throughput experiments. Proc Natl Acad Sci U S A, v.107, n.21, May 25, p.9546-51.

2013.

Brito-Madurro, A. G.;S. Cuadros-Orellana;J. M. Madurro;N. M. Martinez-Rossi e A. Rossi. Effect of undecanoic acid on the production of esterases and lipases by *Aspergillus nidulans*. Ann Microbiol, v.55, p.291-294. 2005.

Brito-Madurro, A. G.;R. A. Prade;J. M. Madurro;M. A. Santos;N. T. A. Peres;J. R. Cursino-Santos;N. M. Martinez-Rossi e A. Rossi. A single amino acid substitution in one of the lipases of *Aspergillus nidulans* confers resistance to the antimycotic drug undecanoic acid. Biochemical Genetics, v.46, n.9-10, Oct, p.557-565. 2008.

Brock, M. e W. Buckel. On the mechanism of action of the antifungal agent propionate. Eur J Biochem, v.271, n.15, Aug, p.3227-41. 2004.

Cannon, R. D.;E. Lamping;A. R. Holmes;K. Niimi;P. V. Baret;M. V. Keniya;K. Tanabe;M. Niimi;A. Goffeau e B. C. Monk. Efflux-mediated antifungal drug resistance. Clin Microbiol Rev, v.22, n.2, Apr, p.291-321, Table of Contents. 2009.

Cerqueira, G. C.;M. B. Arnaud;D. O. Inglis;M. S. Skrzypek;G. Binkley;M. Simison;S. R. Miyasato;J. Binkley;J. Orvis;P. Shah;F. Wymore;G. Sherlock e J. R. Wortman. The *Aspergillus* Genome Database: multispecies curation and incorporation of RNA-Seq data to improve structural gene annotations. Nucleic Acids Res, v.42, n.Database issue, Jan, p.D705-10. 2014.

Chen, J.;J. Yi;L. Liu;S. Yin;R. Chen;M. Li;C. Ye;Y. Q. Zhang e W. Lai. Substrate adaptation of *Trichophyton rubrum* secreted endoproteases. Microb Pathog, v.48, n.2, Feb, p.57-61. 2010.

Craft, D. L.;K. M. Madduri;M. Eshoo e C. R. Wilson. Identification and characterization of the CYP52 family of *Candida tropicalis* ATCC 20336, important for the conversion of fatty acids and alkanes to alpha,omega-dicarboxylic acids. Appl Environ Microbiol, v.69, n.10, Oct, p.5983-91. 2003.

Cresnar, B. e S. Petric. Cytochrome P450 enzymes in the fungal kingdom. Biochim Biophys Acta, v.1814, n.1, Jan, p.29-35. 2010.

Das, S. K.;S. Adhya e A. B. Banerjee. Effect of undecanoic acid on germination of microconidia of wild and undecanoic acid resistance mutant of *Trichophyton rubrum*. Mycopathologia, v.61, n.2, Sep 16, p.121-3. 1977.

Das, S. K. e A. B. Banerjee. Effect of undecanoic acid on cell permeability and respiration of *Trichophyton rubrum*. Acta Microbiol Pol, v.30, n.3, p.295-8. 1981a.

_____. Effect of undecanoic acid on fatty acid composition of undecanoic acid sensitive & resistant mutant of *Trichophyton rubrum*. Indian J Biochem Biophys, v.18, n.1, Feb, p.76-7. 1981b.

_____. Effect of undecanoic acid on phospholipid metabolism in *Trichophyton rubrum*. Sabouraudia, v.20, n.4, Dec, p.267-72. 1982a.

_____. Effect of undecanoic acid on the production of exocellular lipolytic and keratinolytic enzymes by undecanoic acid-sensitive and -resistant strains of *Trichophyton rubrum*. Sabouraudia, v.20, n.3, Sep, p.179-84. 1982b.

_____. Effect of undecanoic acid on lipid composition of *Trichophyton rubrum*. Mycopathologia, v.83, n.1, p.35-9. 1983.

De Carvalho, M. C. C. G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. Ciência Rural, v. v.40, n.n.3, p.p.735-744. 2010.

Degreef, H. Clinical forms of dermatophytosis (ringworm infection). Mycopathologia, v.166, n.5-6, Nov-Dec, p.257-65. 2008.

Del Sorbo, G.;H. Schoonbeek e M. A. De Waard. Fungal transporters involved in efflux of natural toxic compounds and fungicides. Fungal Genet Biol, v.30, n.1, Jun, p.1-15. 2000.

Dhamgaye, S.;M. Bernard;G. Lelandais;O. Sismeiro;S. Lemoine;J. Y. Coppee;S. Le Crom;R. Prasad e F. Devaux. RNA sequencing revealed novel actors of the acquisition of drug resistance in *Candida albicans*. BMC Genomics, v.13, p.396. 2014.

Diatchenko, L.;Y. F. Lau;A. P. Campbell;A. Chenchik;F. Moqadam;B. Huang;S. Lukyanov;K. Lukyanov;N. Gurskaya;E. D. Sverdlov e P. D. Siebert. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. Proc Natl Acad Sci USA, v.93, n.12, Jun 11, p.6025-30. 1996.

Elewski, B. E. Onychomycosis: pathogenesis, diagnosis, and management. Clin Microbiol Rev, v.11, n.3, Jul, p.415-29. 1998.

Esquenazi, D.;C. S. Alviano;W. De Souza e S. Rozental. The influence of surface carbohydrates during in vitro infection of mammalian cells by the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. Res Microbiol, v.155, n.3, Apr, p.144-53. 2004.

Fachin, A. L.;M. S. Ferreira-Nozawa;W. Maccheroni, Jr. e N. M. Martinez-Rossi. Role of the ABC transporter TruMDR2 in terbinafine, 4-nitroquinoline N-oxide and ethidium bromide susceptibility in *Trichophyton rubrum*. J Med Microbiol, v.55, n.Pt 8, Aug, p.1093-9. 2006.

Farr, D. F.;A. Y. Rossman;M. E. Palm e E. B. Mccray. Fungal databases, systematic botany & mycology laboratory. ARS, USDA, v.<http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabase>. 2007.

Figueredo, D. B. e J. A. Da Silva. Desvendando os Mistérios do Coeficiente de Correlação de Pearson (r). Revista Política Hoje, v.18, n. n. 1. 2009.

Funatsuki, K.;R. Tanaka;S. Inagaki;H. Konno;K. Katoh e H. Nakamura. *acrB* mutation located at carboxyl-terminal region of gyrase B subunit reduces DNA binding of DNA gyrase. J Biol Chem, v.272, n.20, May 16, p.13302-8. 1997.

Garg, A. P. e J. Muller. Fungitoxicity of fatty acids against dermatophytes. Mycoses, v.36, n.1-2, Jan-Feb, p.51-63. 1993.

Gibbons, J. G.;A. Beauvais;R. Beau;K. L. Mcgary;J. P. Latge e A. Rokas. Global

transcriptome changes underlying colony growth in the opportunistic human pathogen *Aspergillus fumigatus*. Eukaryot Cell, v.11, n.1, Jan, p.68-78. 2012.

Gong, J. Q.;X. Q. Liu;H. B. Xu;X. S. Zeng;W. Chen e X. F. Li. Deep dermatophytosis caused by *Trichophyton rubrum*: report of two cases. Mycoses, v.50, n.2, Mar, p.102-8. 2007.

Gotz, S.;J. M. Garcia-Gomez;J. Terol;T. D. Williams;S. H. Nagaraj;M. J. Nueda;M. Robles;M. Talon;J. Dopazo e A. Conesa. High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. Nucleic Acids Res, v.36, n.10, Jun, p.3420-35. 2008.

Grumbt, M.;M. Monod e P. Staib. Genetic advances in dermatophytes. FEMS Microbiol Lett, v.320, n.2, Jul, p.79-86. 2011.

Gupta, A. K. e E. A. Cooper. Update in antifungal therapy of dermatophytosis. Mycopathologia, v.166, n.5-6, Nov-Dec, p.353-67. 2008.

Hannemann, F.;A. Bichet;K. M. Ewen e R. Bernhardt. Cytochrome P450 systems--biological variations of electron transport chains. Biochim Biophys Acta, v.1770, n.3, Mar, p.330-44. 2007.

Hicke, L.;B. Zanolari;M. Pypaert;J. Rohrer e H. Riezman. Transport through the yeast endocytic pathway occurs through morphologically distinct compartments and requires an active secretory pathway and Sec18p/N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein. Mol Biol Cell, v.8, n.1, Jan, p.13-31. 1997.

Hogg, R.;J. C. Mcgrail e R. T. O'keefe. The function of the NineTeen Complex (NTC) in regulating spliceosome conformations and fidelity during pre-mRNA splicing. Biochem Soc Trans, v.38, n.4, Aug, p.1110-5. 2010.

Ilkit, M.;M. Durdu e M. Karakas. Majocchi's granuloma: a symptom complex caused by fungal pathogens. Med Mycol, v.50, n.5, Jul, p.449-57. 2012.

Jacob, T. R.;N. T. Peres;G. F. Persinoti;L. G. Silva;M. Mazucato;A. Rossi e N. M. Martinez-Rossi. *rpb2* is a reliable reference gene for quantitative gene expression analysis in the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. Med Mycol, v.50, n.4, May, p.368-77. 2012.

Kaminski, D. M. Recent progress in the study of the interactions of amphotericin B with cholesterol and ergosterol in lipid environments. Eur Biophys J, v.43, n.10-11, Nov, p.453-67. 2014.

Kanehisa, M.;S. Goto;M. Furumichi;M. Tanabe e M. Hirakawa. KEGG for representation and analysis of molecular networks involving diseases and drugs. Nucleic Acids Res, v.38, n.Database issue, Jan, p.D355-60. 2009.

Kaufman, G.;B. A. Horwitz;L. Duek;Y. Ullman e I. Berdicevsky. Infection stages of the dermatophyte pathogen *Trichophyton*: microscopic characterization and proteolytic enzymes. Med Mycol, v.45, n.2, Mar, p.149-55. 2007.

Keeney, E. L.;L. Ajello e Et Al. Sodium caprylate; a new and effective treatment for dermatomycosis of the feet. Bull Johns Hopkins Hosp, v.77, Dec, p.422-36. 1945.

- Kelly, B. P. Superficial fungal infections. Pediatr Rev, v.33, n.4, Apr, p.e22-37. 2012.
- Kempken, F. Alternative splicing in ascomycetes. Appl Microbiol Biotechnol, v.97, n.10, May, p.4235-41. 2013.
- Kern, M. E. e K. S. Blevins. Micologia médica: Premier. 2004
- Khatoun, Z.;B. Figler;H. Zhang e F. Cheng. Introduction to RNA-Seq and its applications to drug discovery and development. Drug Dev Res, v.75, n.5, Aug, p.324-30. 2014.
- Kionka, C. e W. H. Kunau. Inducible beta-oxidation pathway in *Neurospora crassa*. J Bacteriol, v.161, n.1, Jan, p.153-7. 1985.
- Kok, R. G.;C. B. Nudel;R. H. Gonzalez;I. M. Nugteren-Roodzant e K. J. Hellingwerf. Physiological factors affecting production of extracellular lipase (LipA) in *Acinetobacter calcoaceticus* BD413: fatty acid repression of *lipA* expression and degradation of LipA. J Bacteriol, v.178, n.20, Oct, p.6025-35. 1996.
- Kornberg, H. L. The role and control of the glyoxylate cycle in *Escherichia coli*. Biochem J, v.99, n.1, Apr, p.1-11. 1966.
- Langmead, B. e S. L. Salzberg. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. Nat Methods, v.9, n.4, Apr, p.357-9. 2012.
- Leal, J.;F. M. Squina;J. S. Freitas;E. M. Silva;C. J. Ono;N. M. Martinez-Rossi e A. Rossi. A splice variant of the *Neurospora crassa hex-1* transcript, which encodes the major protein of the Woronin body, is modulated by extracellular phosphate and pH changes. FEBS Lett, v.583, n.1, Jan 5, p.180-4. 2009.
- Lee, L. F.;Y. J. Huang e C. W. Chen. Two classes of ethidium-bromide-resistant mutants of *Streptomyces lividans* 66. Microbiology, v.142 (Pt 4), Apr, p.1041-7. 1996.
- Leng, W.;T. Liu;J. Wang;R. Li e Q. Jin. Expression dynamics of secreted protease genes in *Trichophyton rubrum* induced by key host's proteinaceous components. Med Mycol, v.47, n.7, Nov, p.759-65. 2009.
- Linde, J.;S. Duggan;M. Weber;F. Horn;P. Sieber;D. Hellwig;K. Riege;M. Marz;R. Martin;R. Guthke e O. Kurzai. Defining the transcriptomic landscape of *Candida glabrata* by RNA-Seq. Nucleic Acids Res, v.43, n.3, Feb 18, p.1392-406. 2015.
- Liu, T.;X. Ren;T. Xiao;J. Yang;X. Xu;J. Dong;L. Sun;R. Chen e Q. Jin. Identification and characterisation of non-coding small RNAs in the pathogenic filamentous fungus *Trichophyton rubrum*. BMC Genomics, v.14, p.931. 2014.
- Lorenz, M. C. e G. R. Fink. The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. Nature, v.412, n.6842, Jul 5, p.83-6. 2001.
- _____. Life and death in a macrophage: role of the glyoxylate cycle in virulence. Eukaryot Cell, v.1, n.5, Oct, p.657-62. 2002.

- Ma, X.;Z. Tang;J. Qin e Y. Meng. The use of high-throughput sequencing methods for plant microRNA research. RNA Biol, May 27, p.0. 2015.
- Maggio-Hall, L. A. e N. P. Keller. Mitochondrial beta-oxidation in *Aspergillus nidulans*. Mol Microbiol, v.54, n.5, Dec, p.1173-85. 2004.
- Makovitzki, A.;D. Avrahami e Y. Shai. Ultrashort antibacterial and antifungal lipopeptides. Proc Natl Acad Sci U S A, v.103, n.43, Oct 24, p.15997-6002. 2006.
- Makovitzki, A.;A. Viterbo;Y. Brotman;I. Chet e Y. Shai. Inhibition of fungal and bacterial plant pathogens in vitro and in planta with ultrashort cationic lipopeptides. Appl Environ Microbiol, v.73, n.20, Oct, p.6629-36. 2007.
- Maranhão, F. C. A.;F. G. Paião;A. L. Fachin e N. M. Martinez-Rossi. Membrane transporter proteins are involved in *Trichophyton rubrum* pathogenesis. J Med Microbiol, v.58, n.Pt 2, Feb, p.163-8. 2009.
- Martinez-Rossi, N. M.;N. T. A. Peres e A. Rossi. Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. Mycopathologia, v.166, p.369-383. 2008.
- Martinez-Rossi, N. M.;G. F. Persinoti;N. T. Peres e A. Rossi. Role of pH in the pathogenesis of dermatophytoses. Mycoses v.55, n.5, Dec 30, p.381-7. 2012.
- Matikainen, J.;M. Lehtinen;E. Pelttari e H. Elo. Toxicity of Fatty Acid autoxidation products: highest anti-microbial toxicity in the initial oxidative phase. Molecules, v.20, n.1, p.35-42. 2014.
- Mcdonough, V.;J. Stuke e T. Cavanagh. Mutations in *erg4* affect the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to medium-chain fatty acids. Biochim Biophys Acta, v.1581, n.3, Apr 15, p.109-18. 2002.
- Monod, M.;S. Capoccia;B. Lechenne;C. Zaugg;M. Holdom e O. Jousson. Secreted proteases from pathogenic fungi. Int J Med Microbiol, v.292, n.5-6, Oct, p.405-19. 2002.
- Monod, M.;B. Lechenne;O. Jousson;D. Grand;C. Zaugg;R. Stocklin e E. Grouzmann. Aminopeptidases and dipeptidyl-peptidases secreted by the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. Microbiology, v.151, n.Pt 1, Jan, p.145-55. 2005.
- Montes, M.;S. Becerra;M. Sanchez-Alvarez e C. Sune. Functional coupling of transcription and splicing. Gene, v.501, n.2, Jun 15, p.104-17. 2012.
- Musiol, R. e W. Kowalczyk. Azole antimycotics--a highway to new drugs or a dead end? Curr Med Chem, v.19, n.9, p.1378-88. 2014.
- Nagalakshmi, U.;Z. Wang;K. Waern;C. Shou;D. Raha;M. Gerstein e M. Snyder. The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. Science, v.320, n.5881, Jun 6, p.1344-9. 2008.
- Nakayama, N.;A. Takemae e H. Shoun. Cytochrome P450foxy, a catalytically self-sufficient

fatty acid hydroxylase of the fungus *Fusarium oxysporum*. J Biochem, v.119, n.3, Mar, p.435-40. 1996.

Nenoff, P.;C. Kruger;G. Ginter-Hanselmayer e H. J. Tietz. Mycology - an update. Part 1: Dermatofomycoses: causative agents, epidemiology and pathogenesis. J Dtsch Dermatol Ges, v.12, n.3, Mar, p.188-209; quiz 210, 188-211; quiz 212. 2013.

Ostrosky-Zeichner, L.;A. Casadevall;J. N. Galgiani;F. C. Odds e J. H. Rex. An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond. Nat Rev Drug Discov, v.9, n.9, Sep, p.719-27. 2010.

Otzen, C.;B. Bardl;I. D. Jacobsen;M. Nett e M. Brock. *Candida albicans* utilizes a modified beta-oxidation pathway for the degradation of toxic propionyl-CoA. J Biol Chem, v.289, n.12, Mar 21, p.8151-69. 2014.

Paião, F. G.;F. Segato;J. R. Cursino-Santos;N. T. Peres e N. M. Martinez-Rossi. Analysis of *Trichophyton rubrum* gene expression in response to cytotoxic drugs. FEMS Microbiol Lett, v.271, n.2, Jun, p.180-6. 2007.

Patel, R. K. e M. Jain. NGS QC Toolkit: a toolkit for quality control of next generation sequencing data. PLoS One, v.7, n.2, p.e30619. 2012.

Peck, E. F. Veterinarian in British Somaliland. Can J Comp Med, v.3, n.1, Jan, p.5-8. 1939.

Pena-Muralla, R., Ayoubi, P., Graminha, M., Martinez-Rossi, N.M., Rossi, A., Prade, R.A. Antifungal target selection in *Aspergillus nidulans*. Using Bioinformatics to make the difference. In: K. J. Shaw (Ed.). Pathogen Genomics. Impact on Human Health. Totowa: The Humana Press Inc., v.14, 2002. Antifungal target selection in *Aspergillus nidulans*. Using Bioinformatics to make the difference, p.215-230

Peres, N. T. A.;J. R. Cursino-Santos;A. Rossi e N. M. Martinez-Rossi. In vitro susceptibility to antimycotic drug undecanoic acid, a medium-chain fatty acid, is nutrient-dependent in the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. World J Microbiol Biotechnol, v.27, p.1719-1723. 2011.

Persinoti, G. F.;N. T. De Aguiar Peres;T. R. Jacob;A. Rossi;R. Z. Vencio e N. M. Martinez-Rossi. RNA-sequencing analysis of *Trichophyton rubrum* transcriptome in response to sublethal doses of acriflavine. BMC Genomics, v.15 Suppl 7, p.S1. 2014.

Platta, H. W. e R. Erdmann. Peroxisomal dynamics. Trends Cell Biol, v.17, n.10, Oct, p.474-84. 2007.

Robinson, J. T.;H. Thorvaldsdottir;W. Winckler;M. Guttman;E. S. Lander;G. Getz e J. P. Mesirov. Integrative genomics viewer. Nat Biotechnol, v.29, n.1, Jan, p.24-6. 2011.

Rude, T. H.;D. L. Toffaletti;G. M. Cox e J. R. Perfect. Relationship of the glyoxylate pathway to the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. Infect Immun, v.70, n.10, Oct, p.5684-94. 2002.

Sambrook, J.;E. F. Fritsch e T. Maniatis. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989

Scheffe, J. H.;K. E. Lehmann;I. R. Buschmann;T. Unger e H. Funke-Kaiser. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula. J Mol Med (Berl), v.84, n.11, Nov, p.901-10. 2006.

Schena, M.;R. A. Heller;T. P. Theriault;K. Konrad;E. Lachenmeier e R. W. Davis. Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics. Trends Biotechnol, v.16, n.7, Jul, p.301-6. 1998.

Schliebner, I.;R. Becher;M. Hempel;H. B. Deising e R. Horbach. New gene models and alternative splicing in the maize pathogen *Colletotrichum graminicola* revealed by RNA-Seq analysis. BMC Genomics, v.15, p.842. 2014.

Seebacher, C.;J. P. Bouchara e B. Mignon. Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. Mycopathologia, v.166, n.5-6, Nov-Dec, p.335-52. 2008.

Segal, R.;A. Shemer;M. Hochberg;Y. Keness;R. Shvarzman;M. Mandelblat;M. Frenkel e E. Segal. Onychomycosis in Israel: epidemiological aspects. Mycoses, v.58, n.3, Mar, p.133-9. 2015.

Segato, F.;S. R. Nozawa;A. Rossi e N. M. Martinez-Rossi. Over-expression of genes coding for proline oxidase, riboflavin kinase, cytochrome c oxidase and an MFS transporter induced by acriflavin in *Trichophyton rubrum*. Med Mycol, v.46, n.2, Mar, p.135-9. 2008.

Seto, H. e A. Tomasz. Inhibitors of genetic recombination in pneumococci. Proc Natl Acad Sci USA, v.74, n.1, Jan, p.296-9. 1977.

Shendure, J. A.;G. J. Porreca e G. M. Church. Overview of DNA sequencing strategies. Curr Protoc Mol Biol, v.Chapter 7, Jan, p.Unit 7 1. 2008.

Sono, M.;M. P. Roach;E. D. Coulter e J. H. Dawson. Heme-Containing Oxygenases. Chem Rev, v.96, n.7, Nov 7, p.2841-2888. 1996.

Sriranganadane, D.;P. Waridel;K. Salamin;M. Feuermann;B. Mignon;P. Staib;J. M. Neuhaus;M. Quadroni e M. Monod. Identification of novel secreted proteases during extracellular proteolysis by dermatophytes at acidic pH. Proteomics, v.11, n.22, Nov, p.4422-33. 2011.

Staib, P.;C. Zaugg;B. Mignon;J. Weber;M. Grumbt;S. Pradervand;K. Harshman e M. Monod. Differential gene expression in the pathogenic dermatophyte *Arthroderma benhamiae* in vitro versus during infection. Microbiology, v.156, n.Pt 3, Mar, p.884-95. 2009.

Staley, J. P. e J. L. Woolford, Jr. Assembly of ribosomes and spliceosomes: complex ribonucleoprotein machines. Curr Opin Cell Biol, v.21, n.1, Feb, p.109-18. 2009.

Stan, C. D.;C. Tuchilus e C. I. Stan. Echinocandins--new antifungal agents. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi, v.118, n.2, Apr-Jun, p.528-36. 2014.

Stewart, R.;C. A. Rascon;S. Tian;J. Nie;C. Barry;L. F. Chu;H. Ardalani;R. J. Wagner;M. D. Probasco;J. M. Bolin;N. Leng;S. Sengupta;M. Volkmer;B. Habermann;E. M. Tanaka;J. A.

Thomson e C. N. Dewey. Comparative RNA-seq analysis in the unsequenced axolotl: the oncogene burst highlights early gene expression in the blastema. PLoS Comput Biol, v.9, n.3, p.e1002936. 2013.

Strijbis, K.;F. M. Vaz e B. Distel. Enzymology of the carnitine biosynthesis pathway. IUBMB Life, v.62, n.5, May, p.357-62. 2010.

Tey, W. K.;A. J. North;J. L. Reyes;Y. F. Lu e G. Jedd. Polarized gene expression determines woronin body formation at the leading edge of the fungal colony. Mol Biol Cell, v.16, n.6, Jun, p.2651-9. 2005.

Thorvaldsdottir, H.;J. T. Robinson e J. P. Mesirov. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. Brief Bioinform, v.14, n.2, Mar, p.178-92. 2012.

Trevisan, G. L.;E. H. Oliveira;N. T. Peres;A. H. Cruz;N. M. Martinez-Rossi e A. Rossi. Transcription of *Aspergillus nidulans* pacC is modulated by alternative RNA splicing of palB. FEBS Lett, v.585, n.21, Nov 4, p.3442-5. 2011.

Trotter, P. J. The genetics of fatty acid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. Annu Rev Nutr, v.21, p.97-119. 2001.

Velculescu, V. E.;L. Zhang;B. Vogelstein e K. W. Kinzler. Serial analysis of gene expression. Science, v.270, n.5235, Oct 20, p.484-7. 1995.

Vencio, R. Z.;T. Koide;S. L. Gomes e C. A. Pereira. BayGO: Bayesian analysis of ontology term enrichment in microarray data. BMC Bioinformatics, v.7, p.86. 2006.

Vermout, S.;J. Tabart;A. Baldo;A. Mathy;B. Losson e B. Mignon. Pathogenesis of dermatophytosis. Mycopathologia, v.166, n.5-6, Nov-Dec, p.267-75. 2008.

Walker, G. T.;M. P. Stone e T. R. Krugh. Ethidium binding to left-handed (Z) DNAs results in regions of right-handed DNA at the intercalation site. Biochemistry, v.24, n.25, Dec 3, p.7462-71. 1985.

Wang, Z.;M. Gerstein e M. Snyder. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. Nat Rev Genet, v.10, n.1, Jan, p.57-63. 2009.

Weitzman, I. e R. C. Summerbell. The Dermatophytes. Clin Microbiol Rev, v.8, n.2, APR, p.240-259. 1995.

Westerberg, D. P. e M. J. Voyack. Onychomycosis: Current trends in diagnosis and treatment. Am Fam Physician, v.88, n.11, Dec 1, p.762-70. 2013.

White, T. C.;B. G. Oliver;Y. Graser e M. R. Henn. Generating and testing molecular hypotheses in the dermatophytes. Eukaryot Cell, v.7, n.8, Aug, p.1238-45. 2008.

Wilhelm, B. T.;S. Marguerat;S. Watt;F. Schubert;V. Wood;I. Goodhead;C. J. Penkett;J. Rogers e J. Bahler. Dynamic repertoire of a eukaryotic transcriptome surveyed at single-nucleotide resolution. Nature, v.453, n.7199, Jun 26, p.1239-43. 2008.

Will, C. L. e R. Luhrmann. Spliceosome structure and function. Cold Spring Harb Perspect Biol, v.3, n.7, Jul. 2011.

Yu, L.;W. Zhang;L. Wang;J. Yang;T. Liu;J. Peng;W. Leng;L. Chen;R. Li e Q. Jin. Transcriptional profiles of the response to ketoconazole and amphotericin B in *Trichophyton rubrum*. Antimicrob Agents Chemother, v.51, n.1, Jan, p.144-53. 2007.

Zaugg, C.;M. Monod;J. Weber;K. Harshman;S. Pradervand;J. Thomas;M. Bueno;K. Giddey e P. Staib. Gene expression profiling in the human pathogenic dermatophyte *Trichophyton rubrum* during growth on proteins. Eukaryot Cell, v.8, n.2, Feb, p.241-50. 2009.

Zhao, C.;C. Waalwijk;P. J. De Wit;D. Tang e T. Van Der Lee. RNA-Seq analysis reveals new gene models and alternative splicing in the fungal pathogen *Fusarium graminearum*. BMC Genomics, v.14, p.21. 2013.

Zhou, Z. e X. D. Fu. Regulation of splicing by SR proteins and SR protein-specific kinases. Chromosoma, v.122, n.3, Jun, p.191-207. 2013.

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO A - Tabela suplementar 1

Genes diferencialmente expressos em resposta ao AUN

3 horas			
id	Descrição do produto gênico	3h	12h
TERG_01405	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 glutathione S-transferase hypothetical protein)	6.17	
TERG_04960	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 glutathione S-transferase Ure2-like)	6.15	
TERG_08077	hypothetical protein	5.13	
TERG_07830	hypothetical protein	4.99	
TERG_00254	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 peroxisomal dehydratase)	4.54	
TERG_01937	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 short chain dehydrogenase)	4.42	
TERG_05347	hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 epoxide hydrolase)	4.05	
TERG_05621	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 short chain dehydrogenase/reductase family oxidoreductase)	4.02	
TERG_00162	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 MFS multidrug transporter)	3.88	
TERG_11928	hypothetical protein	3.83	
TERG_02909	hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 acyl-CoA oxidase)	3.81	
TERG_02814	hypothetical protein	3.68	
TERG_01512	hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 mitochondrial tricarboxylate transporter (Ctp))	3.68	
TERG_08182	hypothetical protein	3.65	
TERG_03008	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 zinc-containing alcohol dehydrogenase)	3.60	
TERG_03483	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 carnitine	3.54	

	acetyl transferase)	
	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371	
TERG_02747	cytochrome P450 alkane hydroxylase)	3.34
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 3,2-trans-	
TERG_01233	enoyl-CoA isomerase)	3.34
TERG_01742	hypothetical protein	3.33
	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818	
TERG_04500	peroxisomal membrane protein Pmp47)	3.31
	hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 heat shock	
TERG_04131	trehalose synthase)	3.25
TERG_02423	hypothetical protein	3.24
	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818	
TERG_04714	mitochondrial phosphate carrier protein)	3.23
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 glutathione	
TERG_02041	S-transferase)	3.21
TERG_12351	hypothetical protein	3.15
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 alkaline	
TERG_02918	phytoceramidase)	3.05
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 enoyl-CoA	
TERG_03832	hydratase/isomerase)	3.05
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 glutation S-	
TERG_03390	transferase)	3.01
	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371	
TERG_07659	peroxisomal 3-ketoacyl-coA thiolase (Kat1))	2.97
TERG_12032	hypothetical protein	2.97
TERG_03329	hypothetical protein	2.92
	hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517	
TERG_01784	oxidoreductase, short-chain dehydrogenase/reductase family)	2.91
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97	
TERG_00216	endochitinase)	2.88
	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 3-oxoacyl-	
TERG_11539	acyl-carrier-protein reductase)	2.86
TERG_07544	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 lipase)	2.86
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 cercosporin	
TERG_02845	toxin biosynthesis)	2.84
	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 carnitiny-	
TERG_04389	CoA dehydratase)	2.78
	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 3-oxoacyl-	
TERG_11538	carrier-protein reductase)	2.77
TERG_02488	hypothetical protein	2.76

	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 sterol carrier protein)	2.74
TERG_07691	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 acetamidase)	2.73
TERG_08050	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 sulfate permease 2)	2.72
TERG_06106	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 metallo-beta-lactamase domain-containing protein)	2.72
TERG_01077	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 peroxisomal biogenesis factor)	2.71
TERG_00009	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 peroxin 20)	2.68
TERG_04620	isocitrate lyase	2.64
TERG_11639	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 alcohol dehydrogenase)	2.63
TERG_04310	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 ThiJ/PfpI family protein)	2.63
TERG_00013	acyl-CoA thioesterase II	2.62
TERG_07060	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 sporulation protein SPS19)	2.60
TERG_04010	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 peroxisomal membrane protein)	2.59
TERG_01833	hypothetical protein	2.56
TERG_00950	isocitrate lyase	2.54
TERG_11638	isocitrate lyase	2.54
TERG_11637	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 thioesterase)	2.53
TERG_04837	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 AMP dependent ligase)	2.53
TERG_01270	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 C-4 methylsterol oxidase)	2.52
TERG_03305	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 peroxin 14)	2.52
TERG_00284	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 MFS multidrug transporter, putative)	2.51
TERG_08336	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 neutral amino acid permease)	2.48
TERG_03907	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 3-oxoacyl-carrier-protein reductase)	2.46
TERG_08051	hypothetical protein	2.46
TERG_11702	hypothetical protein	2.44
TERG_04817	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 alcohol dehydrogenase)	2.43
TERG_12131	malate synthase, glyoxysomal	2.42
TERG_01281		

TERG_04224	ABC transporter hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818	2.41
TERG_03231	cytochrome P450 52A12)	2.35
TERG_01986	Fe-S protein assembly co-chaperone HscB hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 F-box	2.34
TERG_00575	domain protein) hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 HPP family	2.34
TERG_03983	protein)	2.32
TERG_12497	hypothetical protein	2.31
TERG_08321	hypothetical protein hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371	2.29
TERG_03510	peroxisomal membrane anchor protein) hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 aldose 1-	2.27
TERG_02533	epimerase)	2.26
TERG_08781	hypothetical protein hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 F-box	2.24
TERG_03331	protein) hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 quinone	2.20
TERG_06064	oxidoreductase) hypothetical protein (<i>Microsporum gypseum</i> CBS 118893 QDE-2-	2.19
TERG_00836	interacting protein)	2.18
TERG_05551	hypothetical protein	2.16
TERG_06622	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 hydrolase) hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 glycosyl	2.16
TERG_12282	hydrolase)	2.16
TERG_00176	hydroxyisourate hydrolase hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 epoxide	2.14
TERG_05044	hydrolase) hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 2-	2.13
TERG_05562	hydroxychromene-2-carboxylate isomerase) hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517	2.13
TERG_06177	mitochondrial carrier protein) hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371	2.12
TERG_00163	siderochrome-iron transporter) hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 MFS	2.12
TERG_02283	transporter)	2.11
TERG_05411	hypothetical protein	2.09
TERG_07242	di-trans,poly-cis-decaprenylcistransferase hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 MFS	2.06
TERG_05199	gliotoxin efflux transporter GliA)	2.06

TERG_06494	hypothetical protein	2.05
	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 MFS	
TERG_05575	multidrug transporter)	2.05
	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371	
TERG_01754	oxidoreductase, 2-nitropropane dioxygenase family)	2.05
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 6-hydroxy-	
TERG_02842	D-nicotine oxidase)	2.04
TERG_08757	hypothetical protein	2.03
TERG_05556	hypothetical protein	2.02
	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 NRPS-	
TERG_04598	like enzyme)	2.01
TERG_05023	calcium/proton exchanger	2.01
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 DUF1649	
TERG_12098	domain-containing protein)	2.01
TERG_05244	hypothetical protein	2.00
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 AURR1	
TERG_02841	aurofusarin regulatory protein)	2.00
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97	
TERG_05622	uridine/cytidine kinase)	1.98
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97	
TERG_08519	mitochondrial enoyl reductase)	1.98
TERG_02403	glycolate oxidase, subunit GlcD	1.97
TERG_07957	hypothetical protein	1.96
TERG_01625	hypothetical protein (<i>Microsporium gypseum</i> CBS 118893 FMP32)	1.95
	hypothetical protein (<i>Microsporium gypseum</i> CBS 118893 pyruvate	
TERG_03780	dehydrogenase dihydrolipoamide acetyltransferase component)	1.95
	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 glycosyl	
TERG_12281	hydrolase)	1.95
TERG_04766	calcium/proton exchanger	1.94
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 peroxisome	
TERG_01759	assembly protein 10)	1.94
	hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 cytochrome	
TERG_00701	b5)	1.93
	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371	
TERG_12491	carboxylesterase)	1.93
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 glutamyl-	
TERG_05918	tRNAhypothetical protein (Gln) amidotransferase subunit A)	1.93
	hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 alcohol	
TERG_01733	dehydrogenase)	1.92
TERG_04951	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 U-box	1.91

	domain-containing protein)	
	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 ABC	
TERG_02508	multidrug transporter)	1.91
TERG_11757	hypothetical protein	1.91
TERG_08066	STE/STE7 protein kinase	1.91
TERG_07533	hypothetical protein	1.91
	hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 NmrA	
TERG_04422	family transcriptional regulator)	1.90
TERG_00631	urate oxidase	1.89
TERG_08908	hypothetical protein	1.89
TERG_08116	hypothetical protein	1.88
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 HIT domain-	
TERG_07334	containing protein)	1.87
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 COP9	
TERG_01936	signalosome complex subunit 1)	1.86
TERG_08909	hypothetical protein	1.84
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 2,5-diketo-	
TERG_06234	D-gluconic acid reductase A)	1.82
	hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 DnaJ	
TERG_01621	chaperone hypothetical protein (Caj1))	1.81
	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 glycosyl	
TERG_06016	hydrolase)	1.81
	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818	
TERG_05331	peroxisome biosynthesis protein)	1.80
	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 SVP1-like	
TERG_06354	protein)	1.80
	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 RING	
TERG_03177	finger domain protein)	1.78
	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 pre-mRNA	
TERG_11780	splicing factor)	1.77
	hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 short chain	
TERG_08322	dehydrogenase)	1.77
TERG_00439	hypothetical protein	1.77
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 CDP-	
TERG_08100	diacylglycerol-inositol 3-phosphatidyltransferase PIS)	1.77
TERG_07872	homoserine O-acetyltransferase	1.76
TERG_01632	hypothetical protein	1.74
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 GTPase-	
TERG_01225	activating protein GYP7)	1.74
TERG_03274	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371	1.74

	ammonium transporter MepA)	
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 DUF1183	
TERG_06594	domain-containing protein)	1.73
TERG_08104	potassium/sodium efflux P-type ATPase, fungal-type	1.73
	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818	
TERG_12290	mitochondrial cytochrome b2)	1.73
	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 PBSP	
TERG_07804	domain-containing protein hypothetical protein (924 nt))	1.72
	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 2-	
TERG_02039	hydroxyphytanoyl-CoA lyase)	1.72
	hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 C6	
TERG_05624	transcription factor)	1.71
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 AbpA	
TERG_02059	protein)	1.71
	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818	
TERG_04332	phosphatidylinositol transporter)	1.71
TERG_03141	hypothetical protein	1.70
	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 enoyl-CoA	
TERG_08070	hydratase/isomerase)	1.69
	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818	
TERG_02249	phenylacetyl-CoA ligase)	1.68
TERG_01676	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase	1.67
	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 proline-	
TERG_07991	rich protein)	1.67
	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 alcohol	
TERG_05747	dehydrogenase)	1.67
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 peroxisomal	
TERG_02038	targeting signal receptor)	1.67
TERG_02087	hypothetical protein	1.66
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 long-chain-	
TERG_08952	fatty-acid-CoA ligase)	1.65
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 glutamate	
TERG_04721	carboxypeptidase)	1.65
	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 DNA	
TERG_01825	repair protein Ntg1)	1.64
TERG_04392	dephospho-CoA kinase	1.64
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 NAD-	
TERG_02744	dependent methanol dehydrogenase)	1.64
	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371	
TERG_06732	peroxisomal membrane protein receptor Pex19)	1.63

TERG_05359	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 peroxin-26)	1.62
TERG_05373	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 peroxin 11C)	1.62
TERG_05037	hypothetical protein	1.61
TERG_00919	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase)	1.61
TERG_06240	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 peroxisomal biogenesis factor 2)	1.60
TERG_08300	branched-chain amino acid aminotransferase	1.60
TERG_08107	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 phosphoglycerate mutase)	1.60
TERG_04174	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 citrinin biosynthesis oxydoreductase CtnB)	1.59
TERG_06015	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 nuclear import and export protein Msn5)	-1.52
TERG_00783	guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein	-1.55
TERG_04478	40S ribosomal protein S1	-1.58
TERG_07641	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 GPI-anchored cell wall protein Pst1)	-1.60
TERG_04323	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 ATP-dependent bile acid permease)	-1.61
TERG_08869	hypothetical protein	-1.62
TERG_02242	hypothetical protein (<i>Microsporum gypseum</i> CBS 118893 yeast phase specific protein)	-1.63
TERG_04834	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 rab GDP-dissociation inhibitor)	-1.64
TERG_02604	40S ribosomal protein S20	-1.64
TERG_07065	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 UMTA)	-1.65
TERG_01953	60S acidic ribosomal protein P2	-1.67
TERG_11551	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 telomere and ribosome associated protein Stm1)	-1.67
TERG_12231	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 DUF221 domain-containing protein)	-1.68
TERG_00657	hypothetical protein	-1.69
TERG_06646	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 arrestin)	-1.70
TERG_01330	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 GPI anchored protein)	-1.72
TERG_00511	hypothetical protein	-1.73
TERG_06481	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 cell	-1.74

	polarity protein)	
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 DUF221	
TERG_12232	domain-containing protein)	-1.74
TERG_02630	histone H2A	-1.74
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 GABA	
TERG_07283	permease)	-1.74
	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 cell wall	
TERG_05576	glucanase (Scw11))	-1.75
TERG_07269	mannose-1-phosphate guanyltransferase	-1.75
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 40S	
TERG_01165	ribosomal protein S10b)	-1.75
	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371	
TERG_06854	glutamine-serine-proline rich protein)	-1.76
	hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 histidine	
TERG_12294	acid phosphatase)	-1.76
TERG_02263	hypothetical protein	-1.76
TERG_04658	imidazole glycerol phosphate synthase hisHF	-1.76
	hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 importin	
TERG_07770	13)	-1.77
TERG_06584	hypothetical protein	-1.77
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 C2H2 finger	
TERG_01397	domain-containing protein)	-1.77
TERG_05374	hypothetical protein	-1.78
TERG_07907	hypothetical protein	-1.78
TERG_08226	hypothetical protein	-1.79
TERG_02197	hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 nitrilase)	-1.80
TERG_06118	hypothetical protein	-1.80
	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 C6	
TERG_04862	transcription factor RosA)	-1.80
	hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 mucin	
TERG_05644	family signaling protein Msb2)	-1.80
	hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 telomere	
TERG_11550	and ribosome associated protein Stm1)	-1.82
	hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 GPI	
TERG_00707	anchored serine-threonine rich protein)	-1.82
	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 LIM	
TERG_01838	domain protein)	-1.83
	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 histone	
TERG_02496	H1)	-1.84
TERG_02795	thiazole biosynthetic enzyme, mitochondrial	-1.85

	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 3-beta	
TERG_00414	hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase family protein)	-1.86
	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 cell	
TERG_04514	division control protein 12)	-1.86
	hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 TCTP	
TERG_08234	family protein)	-1.87
	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 thiamine	
TERG_04917	pyrophosphate enzyme)	-1.91
	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 ABC	
TERG_01443	multidrug transporter)	-1.92
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 tyrosine	
TERG_03352	decarboxylase)	-1.94
TERG_02081	RNA binding protein	-1.94
TERG_03183	hypothetical protein	-1.95
	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371	
TERG_01444	nonribosomal peptide synthase Pes1)	-1.95
TERG_06933	hypothetical protein	-1.95
TERG_02529	hypothetical protein	-1.96
TERG_03621	hypothetical protein	-1.96
TERG_02588	hypothetical protein	-1.97
	hypothetical protein (<i>Microsporum canis</i> CBS 113480 A-agglutinin	
TERG_00543	anchorage subunit)	-1.97
	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 ThiJ/PfpI	
TERG_03382	family protein)	-1.98
TERG_08225	hypothetical protein	-2.01
TERG_03794	hypothetical protein	-2.02
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 MFS	
TERG_01623	transporter)	-2.02
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 FAD	
TERG_05409	dependent oxidoreductase)	-2.04
TERG_00520	hypothetical protein	-2.04
TERG_03702	hypothetical protein	-2.05
TERG_04558	nucleoside diphosphate kinase	-2.05
	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 fatty acid	
TERG_02735	oxygenase PpoC)	-2.06
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 Delta	
	(24hypothetical protein (24hypothetical protein (1))))-sterol	
TERG_06528	reductase)	-2.08
	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 DENN	
TERG_01786	domain-containing protein)	-2.11

TERG_08987	hypothetical protein	-2.11
TERG_02367	hypothetical protein	-2.12
TERG_05651	hypothetical protein	-2.14
	hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 MFS	
TERG_01820	transporter)	-2.19
TERG_05735	dipeptidyl peptidase 4	-2.20
	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371	
TERG_00830	cytochrome P450 monooxygenase)	-2.22
TERG_01638	hypothetical protein	-2.22
TERG_02100	cytidine deaminase	-2.22
TERG_08633	hypothetical protein	-2.23
	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 acyl-	
TERG_05636	CoA:6-aminopenicillanic-acid- acyltransferase)	-2.24
TERG_03758	hypothetical protein	-2.26
TERG_08622	hypothetical protein (<i>Microsporum canis</i> CBS 113480 transferase)	-2.29
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 siderophore	
TERG_08620	iron transporter)	-2.35
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 general	
TERG_08129	amino-acid permease GAP1)	-2.35
TERG_06047	hypothetical protein	-2.36
	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371	
TERG_08557	carboxypeptidase S1)	-2.37
TERG_06512	hypothetical protein	-2.40
TERG_08466	hypothetical protein	-2.44
	hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517	
TERG_08240	methyltransferase)	-2.48
TERG_06230	hypothetical protein	-2.52
	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 MFS sugar	
TERG_04308	transporter)	-2.54
	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371	
TERG_01685	glutathione S-transferase)	-2.57
	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 ABC	
TERG_04227	transporter)	-2.60
	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 RNA-	
TERG_04964	binding protein)	-2.60
	hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 WD repeat	
TERG_02610	protein)	-2.61
	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 GPI	
TERG_02118	anchored protein)	-2.65
TERG_11951	hypothetical protein (<i>Microsporum canis</i> CBS 113480 prp 6 CRoW	-2.67

	domain-containing protein)	
TERG_03985	hypothetical protein	-2.68
TERG_12722	hypothetical protein (<i>Microsporium canis</i> CBS 113480 transferase)	-2.71
	hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 SUN	
TERG_03624	domain protein (Uth1)	-2.88
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 cell wall	
TERG_07456	protein PhiA)	-2.90
TERG_05816	hypothetical protein	-2.91
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 SUN	
TERG_07469	domain-containing)	-2.94
TERG_12721	hypothetical protein (<i>Microsporium canis</i> CBS 113480 transferase)	-2.99
TERG_06934	hypothetical protein	-3.03
TERG_01869	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 TOS1)	-3.06
TERG_04855	hypothetical protein	-3.15
TERG_00598	hypothetical protein	-3.22
TERG_01731	hypothetical protein	-3.39
TERG_02057	hypothetical protein	-3.51
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 siderophore	
TERG_08619	iron transporter mirB)	-3.56
	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 cell wall	
TERG_06144	serine-threonine-rich galactomannoprotein Mp1)	-3.68
	hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517	
TERG_02023	extracellular matrix protein)	-3.96
TERG_02278	hypothetical protein	-4.24

*Os valores de expressão gênica são expressos em \log_2 ratio .

12 horas

ID	Descrição do produto gênico	3h	12h
TERG_05426	choline-sulfatase		4.58
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 ubiquinone		
TERG_00092	biosynthesis methyltransferase coq5)		4.00
TERG_00508	hypothetical protein		3.35
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 aprataxin-		
TERG_05288	like protein)		3.32
TERG_00504	hypothetical protein		2.59
TERG_11963	hypothetical protein		2.51
TERG_08264	L-xylulose reductase		2.50
TERG_06727	homoserine dehydrogenase		2.48
TERG_08969	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 cytosolic		2.46

	Cu/Zn superoxide dismutase)	
TERG_07071	2-isopropylmalate synthase	2.36
	hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 siderophore	
TERG_07802	biosynthesis acetylase AceI)	2.27
TERG_08436	hypothetical protein	2.23
TERG_03826	hypothetical protein	2.14
TERG_05868	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 opsin)	2.10
TERG_01741	hypothetical protein	2.06
TERG_01347	TIGR01456 family HAD hydrolase	2.05
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 extracellular	
TERG_04504	protein)	1.94
	hypothetical protein (<i>Microsporum gypseum</i> CBS 118893 NAD	
TERG_08139	dependent epimerase/dehydratase)	1.90
TERG_05737	hypothetical protein	1.88
TERG_07631	hypothetical protein	1.88
	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 oxysterol	
TERG_06735	binding protein)	1.86
	hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 conserved	
TERG_04315	glutamic acid rich protein)	1.84
TERG_03212	hypothetical protein	1.83
	hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 MFS	
TERG_05466	transporter)	1.80
	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 pirin	
TERG_01979	domain protein)	1.80
	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818	
TERG_08771	extracellular serine-threonine rich protein)	1.79
TERG_07291	hypothetical protein	1.78
	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 GPI	
TERG_00060	anchored cell wall protein)	1.73
TERG_03193	hypothetical protein	1.70
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 NmrA	
TERG_05003	family)	1.66
TERG_00942	hypothetical protein	1.64
TERG_05841	AmmeMemoRadiSam system protein B	1.63
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 alcohol	
TERG_04894	dehydrogenase IV)	1.62
TERG_07094	hypothetical protein	1.58
TERG_00573	hypothetical protein	1.52
TERG_08174	hypothetical protein	1.52
TERG_08503	hypothetical protein (<i>Microsporum canis</i> CBS 113480 secalin)	-1.50

TERG_03132	hypothetical protein	-1.50
	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 CorA	
TERG_04184	family metal ion transporter)	-1.54
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 extracellular	
TERG_00956	thaumatin domain-containing protein)	-1.60
TERG_03383	hypothetical protein	-1.60
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97	
TERG_00671	methyltransferase)	-1.61
	hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517	
TERG_12580	dihydrodipicolinate synthetase family protein)	-1.62
TERG_03935	hypothetical protein	-1.62
TERG_07139	hypothetical protein	-1.63
TERG_01430	hypothetical protein	-1.64
TERG_12085	hypothetical protein	-1.67
	hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517	
TERG_12093	poly(ADP))-ribose polymerase PARP)	-1.67
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 actin patches	
TERG_02609	distal protein 1)	-1.68
TERG_03777	hypothetical protein	-1.69
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 C6 finger	
TERG_05604	domain-containing protein)	-1.69
TERG_03926	hypothetical protein	-1.73
	hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 3-beta	
TERG_02837	hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase family protein)	-1.73
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 mannosyl	
TERG_03963	phosphorylinositol ceramide synthase SUR1)	-1.73
	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 F-box and	
TERG_00539	WD40 domain-containing protein)	-1.74
TERG_08346	hypothetical protein	-1.75
TERG_02902	hypothetical protein	-1.76
	hypothetical protein (<i>Microsporum gypseum</i> CBS 118893 tRNA	
TERG_07346	ligase)	-1.81
	hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 C2H2	
TERG_02593	finger domain protein)	-1.81
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 Na/K	
TERG_01609	ATPase alpha 1 subunit)	-1.82
	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 multidrug	
TERG_12372	resistance protein)	-1.82
	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818	
TERG_08278	serine/threonine protein kinase)	-1.83

	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 DUF455 domain-containing protein)	-1.84
TERG_08045	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 IBR domain containing protein)	-1.84
TERG_05680	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 methyltransferase)	-1.84
TERG_03095	hypothetical protein	-1.84
TERG_04359	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 GTP-binding protein 1)	-1.86
TERG_05987	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 SCP-like extracellular protein)	-1.87
TERG_07892	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 leucine aminopeptidase)	-1.90
TERG_03681	hypothetical protein	-1.90
TERG_02664	hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 poly(ADP)-ribose polymerase PARP)	-1.91
TERG_12092	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 SOK1)	-1.92
TERG_07597	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 lipase/serine esterase)	-1.93
TERG_01346	hypothetical protein	-1.95
TERG_05616	hypothetical protein	-1.96
TERG_01728	serine/threonine protein kinase	-2.00
TERG_00199	hypothetical protein	-2.01
TERG_07037	hypothetical protein	-2.03
TERG_01511	hypothetical protein	-2.03
TERG_05469	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 ABC multidrug transporter)	-2.04
TERG_08613	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 cellobiose dehydrogenase)	-2.06
TERG_00638	hypothetical protein	-2.07
TERG_05492	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 aspartate aminotransferase)	-2.10
TERG_03384	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 MFS transporter)	-2.14
TERG_06679	hypothetical protein	-2.16
TERG_05456	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 RTA1 domain-containing protein)	-2.18
TERG_08298	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 MOSC domain-containing)	-2.20
TERG_00709	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818)	-2.26
TERG_00734		

	dipeptidase)	
	hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 bZIP	
TERG_08022	transcription factor CpcA)	-2.26
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 DUF1275	
TERG_03790	domain-containing protein)	-2.31
	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 protease	
TERG_12606	DPPV)	-2.33
TERG_00068	homogentisate 1,2-dioxygenase	-2.37
	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 N-	
TERG_02517	acetyltransferase, GNAT family)	-2.41
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 C2H2 finger	
TERG_02183	domain-containing protein)	-2.43
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97	
TERG_07008	diaminopropionate ammonia-lyase)	-2.46
TERG_01783	hypothetical protein	-2.51
TERG_07673	hypothetical protein	-2.56
TERG_00066	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	-2.59
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 integral	
TERG_05451	membrane protein)	-2.59
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 NCS1	
TERG_05141	nucleoside transporter)	-2.59
	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 gamma-	
TERG_12438	glutamyltranspeptidase)	-2.63
TERG_06701	gamma-glutamyltransferase	-2.69
TERG_01782	hypothetical protein	-2.70
TERG_02534	hypothetical protein	-2.71
	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 short-	
TERG_02704	chain dehydrogenase/reductase)	-3.13
	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 alpha/beta	
TERG_00736	hydrolase)	-3.25
TERG_12029	hypothetical protein	-3.29

*Os valores de expressão gênica são expressos em \log_2 ratio .

3 e 12 horas

ID	Descrição do produto gênico	3h	12h
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 rhamnolipids		
TERG_00823	biosynthesis 3-oxoacyl-carrier-protein reductase)	4.22	2.08
TERG_05363	hypothetical protein	4.19	1.67
TERG_12530	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 3-	4.19	1.50

	ketoacyl-CoA thiolase peroxisomal A)		
TERG_06509	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 glutamate synthase)	4.04	1.63
TERG_07143	potassium/sodium efflux P-type ATPase, fungal-type	3.92	3.51
TERG_04038	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 acyl-CoA dehydrogenase)	3.67	2.08
TERG_03154	hypothetical protein (<i>Microsporum gypseum</i> CBS 118893 2-nitropropane dioxygenase)	3.55	1.53
TERG_07721	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 isopenicillin N-CoA epimerase)	3.34	2.20
TERG_03881	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 epoxide hydrolase)	3.29	1.66
TERG_08102	3-isopropylmalate dehydrogenase A	3.28	4.34
TERG_01463	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 cytochrome c peroxidase)	3.17	2.15
TERG_01122	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 heat shock protein Awh11)	3.00	2.14
TERG_06155	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 phosphotransferase)	2.90	1.54
TERG_04765	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 MFS transporter)	2.72	3.42
TERG_04753	3-isopropylmalate dehydratase, large subunit	2.49	3.60
TERG_01349	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 glutathione peroxidase)	2.41	1.60
TERG_03464	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 stress response protein)	2.35	1.81
TERG_08170	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 fatty acid elongase gig30)	2.28	1.89
TERG_08825	hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 bZIP transcription factor JlbA/IDI-4)	2.00	-1.62
TERG_05769	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 NADhypothetical protein (P))H-dependent D-xylose reductase)	1.98	2.02
TERG_08245	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 branched-chain amino acid aminotransferase)	1.95	1.70
TERG_01190	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 RNA binding protein)	1.95	1.61
TERG_03278	hypothetical protein	1.93	2.58
TERG_02767	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 pyroglutamyl peptidase type I)	1.91	1.51
TERG_00523	hypothetical protein	1.63	-2.58

TERG_08961	hypothetical protein	-1.57	-1.87
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 hsp70-like		
TERG_05615	protein)	-1.67	-2.24
TERG_11968	hypothetical protein	-1.71	-1.99
	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 FAD		
TERG_11814	dependent oxidoreductase)	-1.75	-2.43
TERG_12682	hypothetical protein	-1.77	-1.87
	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 polyketide		
TERG_02787	synthase)	-1.79	-1.57
TERG_07410	hypothetical protein	-1.83	-1.63
	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371		
TERG_07796	oxidoreductase, short-chain dehydrogenase/reductase family)	-1.88	-2.91
TERG_00069	Fumarylacetoacetase	-1.90	-1.59
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97		
TERG_02350	endochitinase)	-1.90	-2.00
TERG_05274	hypothetical protein	-1.95	-1.92
TERG_00281	AGC/RSK protein kinase	-1.95	-2.05
	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371		
TERG_07408	acetyltransferase, GNAT)	-1.98	-1.63
TERG_06022	hypothetical protein	-2.01	-1.92
	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 alpha-box		
TERG_02406	mating type protein)	-2.02	-2.55
	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 MFS		
TERG_05055	multidrug transporter)	-2.02	-1.63
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 ABC		
TERG_08130	ATPase)	-2.03	-2.28
	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 NDT80 /		
TERG_03157	PhoG like DNA-binding family protein)	-2.03	-1.67
TERG_01904	hypothetical protein	-2.07	-1.53
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 cupin 2		
TERG_04240	domain-containing protein)	-2.08	1.85
	hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 HMG box		
TERG_08029	protein)	-2.10	-1.74
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97		
TERG_04543	aminotransferase GliI)	-2.11	-1.84
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 potassium		
TERG_11998	uptake transporter)	-2.13	-2.50
	hypothetical protein (<i>Microsporum canis</i> CBS 113480 major		
TERG_03984	facilitator superfamily transporter MFS-1)	-2.14	-1.86
TERG_03929	hypothetical protein	-2.17	-1.98

	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 amino acid		
TERG_07409	permease)	-2.17	-2.04
TERG_04615	hypothetical protein	-2.21	-2.40
TERG_05746	hypothetical protein	-2.25	-1.75
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 amino acid		
TERG_00553	permease)	-2.25	-1.69
TERG_12298	hypothetical protein	-2.31	-1.57
	hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 class V		
TERG_05625	chitinase)	-2.35	-2.57
TERG_06358	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 dicer)	-2.36	-1.68
	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 NmrA-		
TERG_06055	like family protein)	-2.36	-1.67
TERG_02214	carboxypeptidase 2	-2.37	-2.02
TERG_07280	hypothetical protein	-2.38	-3.89
	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 serine		
TERG_06625	protease)	-2.42	-2.06
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 potassium		
TERG_11997	uptake transporter)	-2.42	-2.88
TERG_03851	serine/threonine protein kinase	-2.43	-2.07
TERG_01116	hypothetical protein	-2.43	-2.24
TERG_02746	hypothetical protein	-2.51	-4.25
TERG_07665	hypothetical protein	-2.52	-2.26
TERG_08614	hypothetical protein	-2.58	-2.02
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 sulfite		
TERG_02958	reductase flavoprotein component)	-2.59	-2.06
	hypothetical protein (<i>Microsporum gypseum</i> CBS 118893 beta-		
TERG_08046	lactamase)	-2.60	-2.42
	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 blasticidin-		
TERG_05650	resistance protein)	-2.62	-2.71
	hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517		
TERG_00791	developmental regulatory protein WetA)	-2.65	-2.22
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 PEP		
TERG_12578	phosphonomutase)	-2.72	-2.84
TERG_00967	hypothetical protein	-2.74	-1.86
TERG_05799	chlorophyll synthesis pathway protein BchC	-2.81	-2.88
	hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 cytochrome		
TERG_07282	P450 monooxygenase)	-2.81	-1.77
	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 GNAT		
TERG_05545	family acetyltransferase)	-2.82	-1.75
TERG_03719	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 MFS sugar	-2.84	-2.87

	transporter)		
	hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 RNA 3'-		
TERG_03955	terminal phosphate cyclase)	-2.85	-2.42
TERG_08980	hypothetical protein	-2.87	-3.47
TERG_08363	hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 tyrosinase)	-3.01	-1.61
	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 conserved		
TERG_00257	predicted protein)	-3.07	-1.84
	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 beta-		
TERG_05854	lactamase)	-3.12	-3.47
	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 HMG box		
TERG_07184	transcriptional regulator)	-3.13	-3.26
	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371		
TERG_03707	geranylgeranyl diphosphate synthase)	-3.16	-2.07
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 trichodiene		
TERG_03706	oxygenase)	-3.21	-1.69
	hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 NAD		
TERG_06883	dependent epimerase/dehydratase family)	-3.25	-3.69
TERG_01981	hypothetical protein	-3.26	-4.36
TERG_11747	hypothetical protein	-3.30	-3.10
	hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 malate		
TERG_06291	dehydrogenase)	-3.33	-4.33
	hypothetical protein (<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 O-		
TERG_07734	methyltransferase)	-3.35	-3.38
TERG_00911	hypothetical protein	-3.37	-3.96
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 fatty acid		
TERG_03343	desaturase)	-3.37	-1.83
TERG_00806	hypothetical protein	-3.43	-3.78
TERG_03981	hypothetical protein	-3.54	-3.24
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 C-5 sterol		
TERG_12627	desaturase)	-3.60	-4.00
TERG_00487	hypothetical protein	-3.82	-2.18
TERG_07769	hypothetical protein	-3.83	-5.25
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97 C-5 sterol		
TERG_12626	desaturase)	-3.84	-4.03
	hypothetical protein (<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97		
TERG_01338	hydantoinase)	-3.92	-2.79
TERG_08004	hypothetical protein	-4.18	-3.86
	hypothetical protein (<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818 aquaporin		
TERG_04547)	-4.42	-3.43
TERG_07516	hypothetical protein	-5.89	-5.80

	hypothetical protein (<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 MFS		
TERG_01480	multidrug transporter)	-6.81	-1.93

*Os valores de expressão gênica são expressos em \log_2 ratio .

ANEXO B - Tabela suplementar 2

Genes e exons que apresentam uso alternado

3 horas

ID	exon	3h	Descrição do produto gênico
TERG_00098	E005	-0.43	hypothetical protein
TERG_00163	E001	-0.23	hypothetical protein
TERG_00255	E010	-5.39	trimethyllysine dioxygenase
TERG_00332	E001	-0.11	nuclear transport factor 2
TERG_00332	E002	0.10	nuclear transport factor 2
TERG_00332	E003	0.23	nuclear transport factor 2
TERG_00332	E005	-1.52	nuclear transport factor 2
TERG_00332	E006	-1.04	nuclear transport factor 2
TERG_00384	E001	-0.28	hypothetical protein
TERG_00438	E003	-0.55	hypothetical protein
TERG_00553	E003	0.77	hypothetical protein
TERG_00602	E001	-0.70	hypothetical protein
TERG_00631	E001	-0.53	urate oxidase
TERG_01163	E002	1.45	hypothetical protein
TERG_01163	E004	-0.17	hypothetical protein
TERG_01163	E005	-0.30	hypothetical protein
TERG_01286	E003	1.76	hypothetical protein
TERG_01363	E004	1.47	hypothetical protein
TERG_01599	E006	1.55	hypothetical protein
TERG_01819	E001	0.32	protein CFT1
TERG_01936	E001	-0.68	hypothetical protein
TERG_01936	E002	0.29	hypothetical protein
TERG_02189	E010	0.12	tubulin alpha-2 chain
TERG_02409	E004	0.78	hypothetical protein
TERG_02423	E001	-0.50	hypothetical protein
TERG_02493	E001	0.08	hypothetical protein
TERG_02493	E002	-0.83	hypothetical protein
TERG_02531	E004	-0.48	hypothetical protein
TERG_02531	E005	0.15	hypothetical protein
TERG_02545	E003	-0.06	hypothetical protein
TERG_03194	E001	-0.21	hypothetical protein
TERG_03194	E002	0.45	hypothetical protein
TERG_03300	E004	0.04	60S ribosomal protein L10-A
TERG_03495	E001	0.27	hypothetical protein
TERG_03539	E004	0.62	hypothetical protein

TERG_03699	E001	0.61	hypothetical protein
TERG_03704	E006	-1.90	hypothetical protein
TERG_03736	E001	0.33	hypothetical protein
TERG_03736	E007	-0.48	hypothetical protein
TERG_03875	E003	1.43	hypothetical protein
TERG_03875	E006	-0.35	hypothetical protein
TERG_04145	E007	-0.07	ATP synthase subunit beta, mitochondrial
TERG_04234	E001	0.07	hypothetical protein
TERG_04234	E004	-0.04	hypothetical protein
TERG_04269	E003	0.12	hypothetical protein
TERG_04269	E004	-0.11	hypothetical protein
TERG_04312	E001	0.35	hypothetical protein
TERG_04606	E005	1.40	hypothetical protein
TERG_04621	E001	1.10	protein transporter SEC13
TERG_04743	E006	0.17	hypothetical protein
TERG_04928	E004	-0.15	elongation factor 2
TERG_04928	E005	0.03	elongation factor 2
TERG_05090	E006	1.17	hypothetical protein
TERG_05484	E008	-0.45	hypothetical protein
TERG_05627	E002	0.43	hypothetical protein
TERG_05673	E003	1.71	hypothetical protein
TERG_05673	E004	1.01	hypothetical protein
TERG_05723	E001	0.09	hypothetical protein
TERG_05723	E002	-0.79	hypothetical protein
TERG_06075	E007	0.97	isocitrate dehydrogenase [NADP]
TERG_06075	E008	0.55	isocitrate dehydrogenase [NADP]
TERG_06075	E009	-0.27	isocitrate dehydrogenase [NADP]
TERG_06098	E003	0.11	hypothetical protein
TERG_06121	E001	-0.17	hypothetical protein
TERG_06309	E001	-0.50	hypothetical protein
TERG_06309	E006	0.30	hypothetical protein
TERG_06344	E011	-0.97	V-type proton ATPase subunit D
TERG_07131	E003	-0.23	hypothetical protein
TERG_07143	E001	-1.38	potassium/sodium efflux P-type ATPase, fungal-type
TERG_07143	E004	0.37	potassium/sodium efflux P-type ATPase, fungal-type
TERG_07241	E001	0.50	saccharopine dehydrogenase [NADP+, L-glutamate-forming]
TERG_07241	E004	-0.42	saccharopine dehydrogenase [NADP+, L-glutamate-forming]
TERG_07468	E001	0.41	hypothetical protein
TERG_07468	E003	-0.45	hypothetical protein
TERG_07834	E004	0.10	hypothetical protein
TERG_07919	E001	-0.89	hypothetical protein
TERG_08255	E001	-0.09	hypothetical protein
TERG_08255	E002	0.29	hypothetical protein
TERG_08329	E003	0.62	hypothetical protein
TERG_08968	E001	-0.33	hypothetical protein
TERG_08968	E002	0.19	hypothetical protein

TERG_11660	E006	-0.49	hypothetical protein
TERG_11660	E007	-0.52	hypothetical protein
TERG_11802	E001	-0.26	hypothetical protein
TERG_12004	E001	0.17	hypothetical protein
TERG_12012	E003	0.47	hypothetical protein
TERG_12154	E005	-0.57	hypothetical protein
TERG_12154	E006	-0.73	hypothetical protein
TERG_12154	E007	-1.06	hypothetical protein
TERG_12164	E001	0.30	hypothetical protein
TERG_12164	E003	-0.25	hypothetical protein
TERG_12335	E004	0.49	proliferating cell nuclear antigen (pcna)
TERG_12335	E005	0.43	proliferating cell nuclear antigen (pcna)
TERG_12335	E008	-0.29	proliferating cell nuclear antigen (pcna)
TERG_12361	E004	-0.61	hypothetical protein
TERG_12367	E001	0.37	60S acidic ribosomal protein P0
TERG_12367	E002	0.43	60S acidic ribosomal protein P0
TERG_12367	E005	-0.48	60S acidic ribosomal protein P0
TERG_12539	E003	0.06	hypothetical protein

*Os valores de expressão dos exons são expressos em \log_2 ratio .

12 horas

ID	exon	12h	Descrição do produto gênico
TERG_06347	E001	0.67	hypothetical protein
TERG_07324	E001	0.36	hypothetical protein
TERG_02416	E003	0.29	phosphoribosylaminoimidazolesuccinocarboxamide synthase
TERG_07143	E004	0.28	potassium/sodium efflux P-type ATPase, fungal-type
TERG_03518	E002	0.25	hypothetical protein
TERG_01959	E001	0.21	hypothetical protein
TERG_00332	E003	0.20	nuclear transport factor 2
TERG_12234	E002	0.19	pantoate-beta-alanine ligase
TERG_04700	E005	0.17	hypothetical protein
TERG_03738	E006	0.11	60S ribosomal protein L3
TERG_06198	E004	0.09	V-type ATPase, G subunit
TERG_04281	E004	0.09	woronin body major protein
TERG_12367	E005	0.07	60S acidic ribosomal protein P0
TERG_02795	E001	0.07	thiazole biosynthetic enzyme, mitochondrial
TERG_04928	E005	0.05	elongation factor 2
TERG_06236	E004	0.04	40S ribosomal protein S19
TERG_06858	E001	-0.03	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, mitochondrial
TERG_01952	E006	-0.04	40S ribosomal protein S15
TERG_02377	E005	-0.05	40S ribosomal protein S9
TERG_02795	E002	-0.05	thiazole biosynthetic enzyme
TERG_03124	E001	-0.06	histone
TERG_01633	E001	-0.06	hypothetical protein
TERG_04700	E002	-0.08	hypothetical protein

TERG_07713	E006	-0.08	homoserine kinase
TERG_03875	E001	-0.08	hypothetical protein
TERG_03070	E004	-0.08	hypothetical protein
TERG_08286	E001	-0.10	hypothetical protein
TERG_04090	E006	-0.10	protein yop1
TERG_05283	E004	-0.11	60S ribosomal protein L32
TERG_01959	E002	-0.13	hypothetical protein
TERG_00332	E001	-0.14	nuclear transport factor 2
TERG_05236	E005	-0.15	60S ribosomal protein L35
TERG_02007	E002	-0.21	hypothetical protein
TERG_03518	E006	-0.24	hypothetical protein
TERG_04125	E007	-0.35	citrate synthase, mitochondrial
TERG_02531	E004	-0.36	hypothetical protein
TERG_05475	E010	-0.37	hypothetical protein
TERG_12234	E003	-0.42	pantoate-beta-alanine ligase
TERG_12367	E004	-0.49	60S acidic ribosomal protein P0
TERG_00332	E005	-0.88	nuclear transport factor 2
TERG_07143	E001	-0.91	potassium/sodium efflux P-type ATPase, fungal-type

*Os valores de expressão dos exons são expressos em \log_2 ratio .

ANEXO C – Tabela suplementar 3

Genes e introns que apresentam retenção

ID and intron	Descrição do produto gênico	0 h	3 h	12 h
TERG_00014T0-Intron1	hypothetical protein	27	0	0
TERG_00017T0-Intron2	hypothetical protein	112	178	11
TERG_00024T0-Intron3	ADP-ribosylation factor 6	0	0	1
TERG_00029T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	2
TERG_00057T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	3
TERG_00089T0-Intron1	methylthioadenosine phosphorylase	1	0	17
TERG_00089T0-Intron2	methylthioadenosine phosphorylase	0	0	3
TERG_00090T0-Intron2	hypothetical protein	0	0	1
TERG_00105T0-Intron1	40S ribosomal protein S30	0	0	2
TERG_00106T0-Intron2	60S ribosomal protein L24	0	0	6
TERG_00124T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	30
TERG_00130T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	3
TERG_00139T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	5
TERG_00163T0-Intron6	hypothetical protein	0	0	11
TERG_00170T1-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_00184T0-Intron2	hypothetical protein	0	0	69
TERG_00206T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	5
TERG_00221T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_00222T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	3
TERG_00222T0-Intron2	hypothetical protein	0	0	14
TERG_00231T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	6
TERG_00241T1-Intron2	hypothetical protein	0	20	2
TERG_00250T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	6
TERG_00266T0-Intron1	hypothetical protein	138	0	4
TERG_00273T0-Intron1	hypothetical protein	1537	3212	3723
TERG_00276T0-Intron1	TATA-box-binding protein	0	0	12
TERG_00276T0-Intron2	TATA-box-binding protein	0	18	1
TERG_00276T0-Intron3	TATA-box-binding protein	32	0	1
TERG_00276T1-Intron1	TATA-box-binding protein	0	0	14
TERG_00276T1-Intron2	TATA-box-binding protein	183	135	6
TERG_00276T1-Intron3	TATA-box-binding protein	0	44	1
TERG_00276T1-Intron4	TATA-box-binding protein	13	0	1
TERG_00276T2-Intron1	TATA-box-binding protein	0	0	16
TERG_00276T2-Intron2	TATA-box-binding protein	0	30	1
TERG_00276T2-Intron3	TATA-box-binding protein	29	0	0
TERG_00276T3-Intron1	TATA-box-binding protein	0	0	12

TERG_00276T3-Intron2	TATA-box-binding protein	161	153	7
TERG_00276T3-Intron3	TATA-box-binding protein	0	60	1
TERG_00276T3-Intron4	TATA-box-binding protein	10	0	0
TERG_00276T4-Intron1	TATA-box-binding protein	221	0	35
TERG_00276T4-Intron2	TATA-box-binding protein	232	80	5
TERG_00276T4-Intron3	TATA-box-binding protein	0	52	0
TERG_00276T4-Intron4	TATA-box-binding protein	32	0	0
TERG_00288T0-Intron1	5'/3'-nucleotidase SurE	114	0	0
TERG_00288T0-Intron3	5'/3'-nucleotidase SurE	0	0	297
TERG_00302T0-Intron1	GTP-binding protein rho2	0	0	4
TERG_00302T1-Intron1	GTP-binding protein rho2	0	0	2
TERG_00302T1-Intron2	GTP-binding protein rho2	0	0	2
TERG_00302T2-Intron1	GTP-binding protein rho2	0	0	1
TERG_00302T2-Intron2	GTP-binding protein rho2	0	0	1
TERG_00328T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	4
TERG_00332T0-Intron1	nuclear transport factor 2	0	0	3
TERG_00332T0-Intron2	nuclear transport factor 2	198	0	0
TERG_00332T0-Intron4	nuclear transport factor 2	0	0	14
TERG_00332T0-Intron5	nuclear transport factor 2	0	0	1
TERG_00342T0-Intron1	phosphoglucomutase	0	95	0
TERG_00369T0-Intron3	branchpoint-bridging protein	0	0	6
TERG_00373T0-Intron1	hypothetical protein	23	0	1
TERG_00383T0-Intron2	60S ribosomal protein L16	69	321	1
TERG_00393T0-Intron1	hypothetical protein	249	0	1
TERG_00410T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_00441T0-Intron1	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase pin4	0	0	1
TERG_00444T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	3
TERG_00453T0-Intron1	hypothetical protein	172	0	76
TERG_00462T0-Intron1	40S ribosomal protein	96	0	1
TERG_00466T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_00479T0-Intron1	hypothetical protein	91	0	2
TERG_00520T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_00520T0-Intron3	hypothetical protein	0	0	9
TERG_00523T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_00529T0-Intron5	acetate kinase	133	164	0
TERG_00534T0-Intron1	hypothetical protein	253	141	7
TERG_00536T0-Intron3	hypothetical protein	31	0	1
TERG_00536T0-Intron4	hypothetical protein	41	0	17
TERG_00536T1-Intron3	hypothetical protein	26	0	1
TERG_00548T0-Intron3	elongation factor 1-alpha	127	117	2
TERG_00566T0-Intron1	hypothetical protein	482	607	2
TERG_00570T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	5
TERG_00574T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	9
TERG_00590T0-Intron1	hypothetical protein	0	30	0
TERG_00601T0-Intron2	CMGC/DYRK/DYRK2 protein kinase	0	0	2
TERG_00607T0-Intron3	hypothetical protein	0	0	6

TERG_00622T0-Intron1	hypothetical protein	91	0	0
TERG_00626T0-Intron1	ADP-ribosylation factor-like protein 1	0	0	1
TERG_00626T0-Intron2	ADP-ribosylation factor-like protein 1	32	1978	2
TERG_00641T0-Intron1	hypothetical protein	2235	8488	9235
TERG_00655T0-Intron1	mitochondrial import inner membrane translocase subunit tim16	1422	2557	4
TERG_00677T0-Intron1	hypothetical protein	0	4	100
TERG_00714T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_00738T0-Intron1	60S ribosomal protein L44	25	0	17
TERG_00738T1-Intron1	60S ribosomal protein L44	47	0	32
TERG_00744T0-Intron1	CMGC/CDK protein kinase	0	0	5
TERG_00744T0-Intron3	CMGC/CDK protein kinase	135	0	1
TERG_00757T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	3
TERG_00765T0-Intron2	hypothetical protein	0	0	1
TERG_00783T0-Intron3	guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein	0	0	183
TERG_00785T0-Intron1	endoplasmic reticulum vesicle protein 25	0	0	1
TERG_00787T0-Intron1	endoplasmic reticulum vesicle protein 25	0	0	1
TERG_00799T0-Intron3	hypothetical protein	0	0	1
TERG_00818T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	9
TERG_00820T1-Intron2	hypothetical protein	0	0	2
TERG_00820T2-Intron1	hypothetical protein	1874	4357	105
TERG_00820T3-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_00838T0-Intron1	pH-response transcription factor pacC/RIM101	0	0	1
TERG_00851T0-Intron2	hypothetical protein	0	0	1
TERG_00861T0-Intron1	hypothetical protein	0	44	2
TERG_00883T0-Intron5	acyl carrier protein	0	0	2
TERG_00895T0-Intron2	hypothetical protein	0	0	2
TERG_00906T0-Intron1	cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit	39	53	296
TERG_00928T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	2
TERG_00974T0-Intron1	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	0	0	6
TERG_00984T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	5
TERG_01031T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	3
TERG_01050T0-Intron1	hypothetical protein	199	48	0
TERG_01091T0-Intron2	magnesium-dependent phosphatase-1	0	0	130
TERG_01109T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_01111T0-Intron2	hypothetical protein	0	0	1
TERG_01148T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	2
TERG_01148T0-Intron5	hypothetical protein	0	0	3
TERG_01183T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	5
TERG_01198T0-Intron1	pre-mRNA-splicing factor rse1	21	0	2
TERG_01198T0-Intron2	pre-mRNA-splicing factor rse1	0	0	43

TERG_01267T0-Intron1	hypothetical protein	0	55	13
TERG_01267T1-Intron1	hypothetical protein	0	54	17
TERG_01282T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	3
TERG_01305T0-Intron1	hypothetical protein	54	0	19
TERG_01305T1-Intron1	hypothetical protein	94	3	32
TERG_01305T3-Intron1	hypothetical protein	161	0	36
TERG_01308T0-Intron1	ATP-dependent RNA helicase SUB2	0	0	7
TERG_01321T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_01356T0-Intron2	hypothetical protein	0	0	2
TERG_01356T0-Intron3	hypothetical protein	0	0	13
TERG_01359T0-Intron1	transketolase	125	0	0
TERG_01359T1-Intron1	transketolase	245	0	0
TERG_01359T3-Intron3	transketolase	0	0	1
TERG_01363T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	4
TERG_01369T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_01369T0-Intron2	hypothetical protein	0	0	4
TERG_01384T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_01443T0-Intron5	hypothetical protein	0	0	1
TERG_01443T2-Intron4	hypothetical protein	0	0	1
TERG_01466T1-Intron1	hypothetical protein	0	105	0
TERG_01467T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	2
TERG_01477T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	7
TERG_01550T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	2
TERG_01560T0-Intron1	hypothetical protein	108	0	0
TERG_01564T0-Intron1	pyruvate carboxylase	173	0	2
TERG_01564T1-Intron1	pyruvate carboxylase	124	0	3
TERG_01599T1-Intron1	hypothetical protein	48	0	8
TERG_01604T0-Intron2	60S ribosomal protein L36	0	0	20
TERG_01633T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_01633T0-Intron2	hypothetical protein	24	0	3
TERG_01660T0-Intron2	hypothetical protein	70	0	273
TERG_01670T0-Intron3	isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit 1, mitochondrial	0	0	2
TERG_01670T2-Intron1	isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit 1, mitochondrial	0	0	1
TERG_01683T0-Intron2	hypothetical protein	0	0	1
TERG_01694T0-Intron2	hypothetical protein	0	0	3
TERG_01707T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	6
TERG_01800T2-Intron1	isopentenyl-diphosphate delta-isomerase	0	0	1
TERG_01877T1-Intron3	hypothetical protein	278	356	36
TERG_01883T0-Intron1	hsp75-like protein	85	0	0
TERG_01884T0-Intron1	hypothetical protein	415	0	1
TERG_01889T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	29
TERG_01908T0-Intron2	hypothetical protein	0	0	1
TERG_01950T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	11
TERG_01959T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	37
TERG_01964T0-Intron3	hypothetical protein	0	0	1

TERG_01975T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	2
TERG_02012T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_02031T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	2
TERG_02032T0-Intron1	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	44	0	0
TERG_02032T1-Intron1	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	37	0	3
TERG_02032T2-Intron1	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	47	0	0
TERG_02071T0-Intron1	hypothetical protein	254	0	4
TERG_02071T0-Intron2	hypothetical protein	0	0	83
TERG_02071T0-Intron3	hypothetical protein	77	0	18
TERG_02078T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	5
TERG_02118T1-Intron3	hypothetical protein	173	0	4
TERG_02127T0-Intron1	hypothetical protein	14195	3405	39
TERG_02127T0-Intron2	hypothetical protein	266	0	0
TERG_02140T0-Intron1	hypothetical protein	806	356	56
TERG_02140T0-Intron3	hypothetical protein	0	0	1
TERG_02179T0-Intron1	hypothetical protein	133	0	0
TERG_02180T0-Intron1	hypothetical protein	984	213	1
TERG_02237T0-Intron1	40S ribosomal protein S28	0	0	1
TERG_02250T0-Intron1	hypothetical protein	110	0	0
TERG_02250T1-Intron1	hypothetical protein	64	0	0
TERG_02253T0-Intron1	hypothetical protein	36	0	0
TERG_02262T0-Intron2	hypothetical protein	0	0	5
TERG_02262T0-Intron4	hypothetical protein	0	0	5
TERG_02264T0-Intron1	hypothetical protein	36	0	0
TERG_02269T0-Intron1	hypothetical protein	113	0	2
TERG_02312T0-Intron1	hypothetical protein	159	0	0
TERG_02376T1-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_02399T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_02405T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	36
TERG_02413T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	4
TERG_02428T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	20
TERG_02438T0-Intron1	hypothetical protein	80	65	0
TERG_02438T1-Intron1	hypothetical protein	184	59	0
TERG_02460T0-Intron1	hypothetical protein	454	182	31
TERG_02488T0-Intron1	hypothetical protein	0	52	11
TERG_02494T0-Intron1	hypothetical protein	90	26	0
TERG_02494T1-Intron1	hypothetical protein	94	17	0
TERG_02519T0-Intron1	hypothetical protein	786	305	1
TERG_02524T0-Intron1	hypothetical protein	323	35	0
TERG_02550T0-Intron1	hypothetical protein	10527	23703	64
TERG_02551T0-Intron1	hypothetical protein	134	440	8
TERG_02551T1-Intron1	hypothetical protein	184	333	3
TERG_02591T0-Intron1	D-tyrosyl-tRNA(Tyr) deacylase	0	0	3
TERG_02634T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	3

TERG_02637T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	2
TERG_02637T1-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_02637T2-Intron1	hypothetical protein	108	0	24
TERG_02669T0-Intron2	hypothetical protein	0	0	1
TERG_02670T0-Intron2	hypothetical protein	0	0	2
TERG_02694T0-Intron1	sulfite efflux pump SSU1	0	0	6
TERG_02694T1-Intron1	sulfite efflux pump SSU1	0	0	3
TERG_02694T2-Intron1	sulfite efflux pump SSU1	0	0	4
TERG_02694T3-Intron1	sulfite efflux pump SSU1	0	0	5
TERG_02697T0-Intron4	hypothetical protein	123	0	0
TERG_02760T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_02761T0-Intron1	BUB protein kinase	0	0	4
TERG_02785T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	4
TERG_02786T0-Intron2	hypothetical protein	7	0	0
TERG_02786T0-Intron3	hypothetical protein	146	0	2
TERG_02897T0-Intron3	hypothetical protein	0	0	1
TERG_02906T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_02937T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	101
TERG_02960T0-Intron6	hypothetical protein	0	0	1
TERG_02977T0-Intron1	hypothetical protein	168	0	0
TERG_02977T0-Intron2	hypothetical protein	0	86	0
TERG_03014T0-Intron2	hypothetical protein	0	0	17
TERG_03039T0-Intron1	hypothetical protein	122	0	0
TERG_03042T0-Intron1	STE/STE20/PAKA protein kinase	0	0	1
TERG_03050T0-Intron1	tyrosine-tRNA ligase	0	0	1
TERG_03058T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	6
TERG_03078T0-Intron1	hypothetical protein	0	459	4
TERG_03085T0-Intron4	ATP-dependent RNA helicase DBP2	0	0	19
TERG_03087T0-Intron3	hypothetical protein	32	78	5
TERG_03097T0-Intron2	hypothetical protein	0	0	9
TERG_03163T5-Intron2	hypothetical protein	112	106	3
TERG_03163T6-Intron1	hypothetical protein	89	51	5
TERG_03177T0-Intron1	hypothetical protein	26	0	1
TERG_03187T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_03190T0-Intron1	hypothetical protein	7	0	0
TERG_03196T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	35
TERG_03206T0-Intron1	hsp7-like protein	69	0	1
TERG_03240T0-Intron1	hypothetical protein	102	0	0
TERG_03302T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	9
TERG_03319T1-Intron2	hypothetical protein	0	0	1
TERG_03343T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	2
TERG_03459T0-Intron1	hypothetical protein	1004	0	22
TERG_03463T0-Intron3	hypothetical protein	0	0	7
TERG_03473T0-Intron1	hypothetical protein	55	0	0
TERG_03497T0-Intron2	hypothetical protein	28	0	1
TERG_03500T0-Intron1	urease accessory protein UreG	4	0	1

TERG_03517T1-Intron1	hypothetical protein	338	1	0
TERG_03519T0-Intron1	hypothetical protein	139	111	11
TERG_03528T2-Intron1	cytochrome c	0	0	3
TERG_03528T3-Intron1	cytochrome c	0	0	2
TERG_03528T4-Intron1	cytochrome c	0	0	3
TERG_03528T5-Intron1	cytochrome c	0	0	3
TERG_03556T0-Intron1	hypothetical protein	375	771	616
TERG_03559T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	16
TERG_03569T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	3
TERG_03579T0-Intron1	hypothetical protein	8	0	0
TERG_03579T1-Intron1	hypothetical protein	35	0	0
TERG_03579T3-Intron1	hypothetical protein	34	0	0
TERG_03631T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_03653T0-Intron1	hypothetical protein	84	2	15
TERG_03670T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	2
TERG_03706T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	2
TERG_03706T0-Intron5	hypothetical protein	0	0	1
TERG_03706T0-Intron8	hypothetical protein	59	0	1
TERG_03735T0-Intron1	hypothetical protein	137	0	1
TERG_03736T0-Intron6	hypothetical protein	0	0	12
TERG_03783T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	7
TERG_03827T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	2
TERG_03835T0-Intron2	hypothetical protein	0	0	3
TERG_03843T0-Intron1	chitin synthase B	57	0	0
TERG_03843T1-Intron1	chitin synthase B	26	0	5
TERG_03843T2-Intron1	chitin synthase B	75	0	3
TERG_03843T3-Intron1	chitin synthase B	51	0	2
TERG_03843T4-Intron1	chitin synthase B	51	0	2
TERG_03843T5-Intron1	chitin synthase B	59	0	4
TERG_03845T0-Intron2	hypothetical protein	480	325	7
TERG_03872T2-Intron4	CMGC/MAPK/P38 protein kinase	0	0	3
TERG_03880T0-Intron1	60S ribosomal protein L5	286	0	0
TERG_03933T0-Intron5	hypothetical protein	21	0	0
TERG_03974T0-Intron1	hypothetical protein	0	61	1
TERG_03995T0-Intron2	hypothetical protein	67	0	0
TERG_04033T0-Intron1	60S ribosomal protein L2	265	0	10
TERG_04095T0-Intron1	hypothetical protein	1880	619	8
TERG_04095T1-Intron1	hypothetical protein	2102	724	4
TERG_04112T0-Intron1	hypothetical protein	0	13	9
TERG_04112T0-Intron2	hypothetical protein	0	115	188
TERG_04112T0-Intron3	hypothetical protein	0	0	8
TERG_04122T0-Intron1	mitochondrial DNA replication protein YHM2	63	0	0
TERG_04154T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_04157T0-Intron1	hypothetical protein	807	754	1
TERG_04208T0-Intron1	HAL protein kinase	0	0	5

TERG_04230T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_04231T0-Intron1	succinate dehydrogenase, cytochrome b556 subunit	0	0	12
TERG_04231T1-Intron2	succinate dehydrogenase, cytochrome b556 subunit	0	0	21
TERG_04234T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_04234T1-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_04237T0-Intron1	hypothetical protein	0	8	5
TERG_04269T0-Intron1	hypothetical protein	98	676	377
TERG_04269T1-Intron1	hypothetical protein	52	687	359
TERG_04271T0-Intron1	hypothetical protein	1318	54	262
TERG_04277T0-Intron1	hypothetical protein	27	0	21
TERG_04285T0-Intron1	hypothetical protein	770	628	2
TERG_04297T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_04309T0-Intron3	hypothetical protein	0	0	24
TERG_04309T0-Intron4	hypothetical protein	0	15	6
TERG_04309T0-Intron6	hypothetical protein	0	0	1
TERG_04333T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	5
TERG_04336T0-Intron3	transaldolase	0	0	2
TERG_04336T0-Intron6	transaldolase	0	0	1
TERG_04340T0-Intron2	hypothetical protein	221	0	31
TERG_04344T0-Intron1	serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit	17	0	0
TERG_04344T1-Intron1	serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit	57	0	0
TERG_04346T0-Intron2	hypothetical protein	0	0	1
TERG_04356T0-Intron3	hypothetical protein	0	0	3
TERG_04390T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_04395T0-Intron3	hypothetical protein	0	0	1
TERG_04442T0-Intron3	hypothetical protein	0	0	1030
TERG_04458T0-Intron3	RdgB/HAM1 family non-canonical purine NTP pyrophosphatase	0	0	41
TERG_04460T3-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_04469T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	2
TERG_04472T0-Intron1	hypothetical protein	159	0	0
TERG_04507T0-Intron1	hypothetical protein	0	302	6
TERG_04535T0-Intron3	hypothetical protein	144	0	0
TERG_04542T0-Intron1	hypothetical protein	28	0	0
TERG_04542T1-Intron1	hypothetical protein	67	0	1
TERG_04542T2-Intron1	hypothetical protein	40	0	1
TERG_04587T1-Intron2	hypothetical protein	0	0	1
TERG_04594T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	4
TERG_04595T4-Intron1	asparagine synthase (glutamine-hydrolyzing)	0	0	1
TERG_04601T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_04612T1-Intron2	branched-chain amino acid aminotransferase	0	0	12
TERG_04612T2-Intron1	branched-chain amino acid aminotransferase	0	0	17
TERG_04612T3-Intron1	branched-chain amino acid	0	0	10

	aminotransferase			
TERG_04644T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_04663T0-Intron1	hypothetical protein	87	0	0
TERG_04677T0-Intron1	guanylate kinase	6	0	0
TERG_04691T0-Intron2	hypothetical protein	312	205	131
TERG_04697T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	20
TERG_04707T0-Intron3	hypothetical protein	0	0	1
TERG_04707T0-Intron5	hypothetical protein	3	0	0
TERG_04709T2-Intron1	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	20	0	1
TERG_04709T4-Intron1	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	15	0	0
TERG_04713T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_04726T0-Intron2	hypothetical protein	61	0	0
TERG_04728T0-Intron1	hypothetical protein	85	0	0
TERG_04782T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	2
TERG_04782T1-Intron2	hypothetical protein	0	0	1
TERG_04804T1-Intron1	ER-derived vesicles protein ERV14	0	0	1
TERG_04835T0-Intron2	hypothetical protein	9	0	174
TERG_04842T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	2
TERG_04851T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	3
TERG_04852T0-Intron2	hypothetical protein	261	0	12
TERG_04881T0-Intron1	hypothetical protein	31	0	0
TERG_04906T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	4
TERG_04906T0-Intron2	hypothetical protein	0	0	1
TERG_04946T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	4
TERG_04946T1-Intron1	hypothetical protein	0	0	5
TERG_04985T0-Intron2	hypothetical protein	0	0	1
TERG_04985T0-Intron3	hypothetical protein	0	0	1
				4400
TERG_04992T0-Intron2	hypothetical protein	637	630	13
TERG_04992T0-Intron3	hypothetical protein	0	55	56
				44051
TERG_04992T1-Intron1	hypothetical protein	559	588	3
TERG_04992T1-Intron2	hypothetical protein	0	44	57
TERG_04992T2-Intron1	hypothetical protein	0	51	59
TERG_05046T0-Intron4	hypothetical protein	0	0	1
TERG_05068T0-Intron1	hypothetical protein	103	167	14
TERG_05069T0-Intron1	hypothetical protein	4848	2164	12
TERG_05076T0-Intron3	hypothetical protein	0	0	2
TERG_05090T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	3
TERG_05090T1-Intron1	hypothetical protein	0	0	3
TERG_05090T3-Intron1	hypothetical protein	0	0	2
TERG_05090T5-Intron1	hypothetical protein	0	0	8
TERG_05146T0-Intron3	hypothetical protein	0	0	1
TERG_05164T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_05174T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	14
TERG_05174T1-Intron1	hypothetical protein	0	0	13
TERG_05231T0-Intron3	hypothetical protein	0	0	3

TERG_05231T1-Intron1	hypothetical protein	0	0	2
TERG_05244T0-Intron1	hypothetical protein	145	76	1
TERG_05248T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_05261T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	6
TERG_05263T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_05283T0-Intron1	60S ribosomal protein L32	128	0	3
TERG_05283T0-Intron2	60S ribosomal protein L32	0	0	7
TERG_05297T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	7
TERG_05299T0-Intron1	hypothetical protein	994	143	43
TERG_05345T0-Intron2	60S ribosomal protein L43	0	0	3
TERG_05345T0-Intron3	60S ribosomal protein L43	0	0	6
TERG_05361T0-Intron1	hypothetical protein	523	3075	52
TERG_05361T0-Intron2	hypothetical protein	0	0	2
TERG_05393T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	3
TERG_05420T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	2
TERG_05428T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_05430T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_05443T0-Intron1	hypothetical protein	334	0	0
TERG_05455T0-Intron1	hypothetical protein	390	210	6
TERG_05475T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	3
TERG_05479T0-Intron1	hypothetical protein	71	332	34
TERG_05483T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	2
TERG_05495T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	2
TERG_05509T0-Intron2	hypothetical protein	0	0	4
TERG_05509T1-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_05511T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_05512T0-Intron2	hypothetical protein	0	0	1
TERG_05528T0-Intron1	hypothetical protein	57	0	1
TERG_05559T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	32
TERG_05562T0-Intron4	hypothetical protein	0	0	1
TERG_05564T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	2
TERG_05576T0-Intron1	hypothetical protein	92	0	0
TERG_05614T0-Intron1	hypothetical protein	66	0	0
TERG_05634T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_05634T1-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_05659T1-Intron2	hypothetical protein	470	0	0
TERG_05659T1-Intron4	hypothetical protein	0	0	2
TERG_05673T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	2
TERG_05673T0-Intron4	hypothetical protein	0	0	1
TERG_05690T2-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_05690T4-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_05695T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	26
TERG_05710T0-Intron3	hypothetical protein	0	0	2
TERG_05713T0-Intron1	hypothetical protein	0	129	40
TERG_05713T0-Intron2	hypothetical protein	299	0	0
TERG_05722T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	27

TERG_05724T0-Intron1	hypothetical protein	958	246	8
TERG_05728T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_05729T0-Intron2	hypothetical protein	0	0	8
TERG_05729T1-Intron1	hypothetical protein	0	0	11
TERG_05740T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_05756T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_05799T0-Intron5	chlorophyll synthesis pathway protein BchC	0	0	1
TERG_05801T0-Intron1	60S ribosomal protein L15	54	0	3
TERG_05821T2-Intron4	pyruvate kinase	0	0	1
TERG_05825T0-Intron1	40S ribosomal protein S11	21	0	5
TERG_05825T1-Intron1	40S ribosomal protein S11	38	0	8
TERG_05827T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	5
TERG_05865T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_05865T1-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_05876T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	2
TERG_05881T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_05882T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_05882T0-Intron3	hypothetical protein	0	1	0
TERG_05892T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_05894T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_05925T1-Intron1	hypothetical protein	0	15	15
TERG_05925T4-Intron1	hypothetical protein	0	20	8
TERG_05925T5-Intron1	hypothetical protein	0	14	14
TERG_05926T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	2
TERG_05930T0-Intron1	5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase	0	0	2
TERG_05944T0-Intron1	hypothetical protein	82	0	0
TERG_05944T0-Intron2	hypothetical protein	255	51	0
TERG_05944T1-Intron1	hypothetical protein	41	0	1
TERG_05944T1-Intron2	hypothetical protein	268	22	1
TERG_05944T2-Intron1	hypothetical protein	31	0	2
TERG_05944T2-Intron2	hypothetical protein	339	45	1
TERG_05944T2-Intron3	hypothetical protein	0	0	2
TERG_05955T0-Intron2	hypothetical protein	0	0	1
TERG_05965T0-Intron3	hypothetical protein	0	0	12
TERG_05970T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	14
TERG_05989T0-Intron1	adenylosuccinate lyase	0	0	1
TERG_05996T0-Intron2	hypothetical protein	0	0	1
TERG_05998T0-Intron2	chlorophyll synthesis pathway protein BchC	0	0	3
TERG_06004T0-Intron1	hypothetical protein	338	131	0
TERG_06006T0-Intron2	hypothetical protein	37	0	1
TERG_06012T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_06023T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	2
TERG_06025T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_06025T0-Intron2	hypothetical protein	0	0	36
TERG_06067T0-Intron1	hypothetical protein	131	0	1

TERG_06067T0-Intron4	hypothetical protein	0	0	1
TERG_06072T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_06087T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	2
TERG_06094T1-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_06148T0-Intron1	protein vts1	0	0	10
TERG_06151T0-Intron1	hypothetical protein	653	168	3
TERG_06151T0-Intron2	hypothetical protein	113	0	5
TERG_06153T0-Intron1	hypothetical protein	1006	137	5
TERG_06155T0-Intron1	hypothetical protein	15	0	0
TERG_06157T0-Intron4	hypothetical protein	0	0	2
TERG_06196T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	2
TERG_06204T0-Intron4	hypothetical protein	0	0	1
TERG_06211T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_06236T0-Intron1	40S ribosomal protein S19	0	0	7
TERG_06239T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	44
TERG_06242T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_06255T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	2
TERG_06269T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	4
TERG_06273T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_06283T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	9
TERG_06295T0-Intron1	hypothetical protein	2469	848	0
TERG_06296T1-Intron2	hypothetical protein	0	0	2
TERG_06308T1-Intron1	hypothetical protein	0	0	3
TERG_06331T0-Intron1	hypothetical protein	2551	707	7
TERG_06352T0-Intron1	HAL protein kinase	0	0	2
TERG_06381T0-Intron1	hypothetical protein	349	201	3
TERG_06387T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	12
TERG_06390T0-Intron1	hypothetical protein	36	0	0
TERG_06390T2-Intron1	hypothetical protein	22	0	1
TERG_06392T0-Intron3	calmodulin	0	0	1
TERG_06406T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_06406T0-Intron2	hypothetical protein	0	0	1
TERG_06436T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_06472T0-Intron2	hypothetical protein	0	0	11
TERG_06475T0-Intron1	hypothetical protein	34	0	0
TERG_06475T0-Intron3	hypothetical protein	34	0	21
TERG_06475T1-Intron1	hypothetical protein	17	0	0
TERG_06475T1-Intron3	hypothetical protein	25	0	21
TERG_06475T1-Intron5	hypothetical protein	0	0	8
TERG_06475T2-Intron1	hypothetical protein	9	0	0
TERG_06475T2-Intron3	hypothetical protein	0	0	18
TERG_06475T2-Intron5	hypothetical protein	0	0	6
TERG_06493T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	194
TERG_06521T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	2
TERG_06528T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	2
TERG_06540T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	15

TERG_06568T0-Intron1	phosphoserine transaminase	0	0	5
TERG_06587T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	4
TERG_06601T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	2
TERG_06614T0-Intron1	formate dehydrogenase	0	30	1
TERG_06614T1-Intron1	formate dehydrogenase	0	0	1
TERG_06614T1-Intron2	formate dehydrogenase	0	41	3
TERG_06614T2-Intron1	formate dehydrogenase	0	19	4
TERG_06622T0-Intron5	hypothetical protein	0	0	27
TERG_06640T1-Intron1	phosphoribosylamine-glycine ligase	0	0	2
TERG_06650T0-Intron2	hypothetical protein	0	0	1
TERG_06655T0-Intron2	hypothetical protein	0	0	1
TERG_06667T0-Intron1	hypothetical protein	0	11	0
TERG_06681T0-Intron1	glycogen debranching enzyme	0	0	1
TERG_06686T1-Intron1	hypothetical protein	0	14	5
TERG_06686T2-Intron1	hypothetical protein	0	12	4
TERG_06686T3-Intron1	hypothetical protein	0	4	2
TERG_06701T0-Intron1	gamma-glutamyltransferase	0	0	2
TERG_06725T1-Intron1	non-histone chromosomal protein 6	1150	172	35
TERG_06725T1-Intron5	non-histone chromosomal protein 6	1722	825	2046
TERG_06725T2-Intron1	non-histone chromosomal protein 6	1052	114	41
TERG_06725T3-Intron1	non-histone chromosomal protein 6	2063	577	68
TERG_06752T0-Intron2	hypothetical protein	0	0	62
TERG_06753T0-Intron2	hypothetical protein	0	0	7
TERG_06768T0-Intron1	pre-mRNA-splicing ATP-dependent RNA helicase PRP28	0	32	0
TERG_06773T0-Intron3	hypothetical protein	0	0	3
TERG_06779T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_06804T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	5
TERG_06810T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_06837T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	5
TERG_06844T1-Intron2	40S ribosomal protein S21	0	0	2
TERG_06846T0-Intron2	inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	0	155	84
TERG_06865T0-Intron1	hypothetical protein	859	799	39
TERG_06875T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_06880T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	4
TERG_06883T0-Intron4	hypothetical protein	0	0	3
TERG_06884T0-Intron3	hypothetical protein	89	0	1
TERG_06908T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_06926T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	2
TERG_06965T0-Intron1	hypothetical protein	9028	3021	28
TERG_06965T0-Intron2	hypothetical protein	0	0	3
TERG_06965T1-Intron1	hypothetical protein	0	0	2
TERG_07064T1-Intron1	hypothetical protein	0	0	9
TERG_07069T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_07085T1-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_07099T0-Intron1	hypothetical protein	2382	204	0

TERG_07103T1-Intron3	hypothetical protein	0	0	1
TERG_07105T0-Intron1	hypothetical protein	2	0	4
TERG_07105T0-Intron2	hypothetical protein	4888	3728	6
TERG_07135T0-Intron1	hypothetical protein	408	0	114
TERG_07136T0-Intron5	hypothetical protein	0	0	6
TERG_07156T0-Intron1	hypothetical protein	0	28	2
TERG_07156T1-Intron1	hypothetical protein	70	491	4
TERG_07156T3-Intron1	hypothetical protein	101	459	5
TERG_07159T2-Intron3	hypothetical protein	0	0	24
TERG_07178T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	2
TERG_07178T0-Intron2	hypothetical protein	0	0	6
TERG_07205T0-Intron2	NADH-ubiquinone oxidoreductase 51 kDa subunit, mitochondrial	0	0	1
TERG_07233T0-Intron2	hypothetical protein	0	0	1
TERG_07250T0-Intron1	hypothetical protein	277	0	0
TERG_07279T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_07283T0-Intron6	hypothetical protein	0	0	2
TERG_07288T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	4
TERG_07295T0-Intron1	hypothetical protein	1149	369	8
TERG_07334T0-Intron2	hypothetical protein	0	0	9
TERG_07339T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_07347T0-Intron1	hypothetical protein	102	119	1
TERG_07351T0-Intron1	hypothetical protein	43	0	90
TERG_07351T0-Intron2	hypothetical protein	6	0	504
TERG_07357T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_07367T0-Intron1	CMGC/CDK/CDK8 protein kinase	26	190	6
TERG_07371T0-Intron2	hypothetical protein	0	0	1
TERG_07371T0-Intron7	hypothetical protein	0	0	1
TERG_07380T0-Intron1	40S ribosomal protein S26E	0	0	1
TERG_07384T0-Intron1	hypothetical protein	92	0	1
TERG_07395T2-Intron3	hypothetical protein	0	0	1
TERG_07402T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_07418T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_07447T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_07456T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_07458T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_07467T0-Intron1	hypothetical protein	165	0	2
TERG_07493T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	14
TERG_07493T0-Intron1 1	hypothetical protein	0	0	14
TERG_07508T0-Intron5	hypothetical protein	0	0	1
TERG_07511T0-Intron1	hypothetical protein	3	0	1
TERG_07542T0-Intron2	hypothetical protein	0	0	9
TERG_07555T0-Intron1	CAMKK protein kinase	46	0	0
TERG_07575T0-Intron1	CK1/CK1/CK1-G protein kinase	0	0	1
TERG_07575T2-Intron1	CK1/CK1/CK1-G protein kinase	0	0	1
TERG_07576T0-Intron1	hypothetical protein	80	0	3

TERG_07599T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_07636T0-Intron1	hypothetical protein	190	121	25
TERG_07636T0-Intron2	hypothetical protein	0	0	2
TERG_07638T0-Intron1	hypothetical protein	52	0	0
TERG_07643T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	5
TERG_07664T1-Intron2	hypothetical protein	0	0	8
TERG_07678T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_07678T0-Intron2	hypothetical protein	58	37	4
TERG_07678T1-Intron1	hypothetical protein	0	0	2
TERG_07678T1-Intron2	hypothetical protein	82	143	26
TERG_07684T0-Intron1	hypothetical protein	37	0	7
TERG_07692T0-Intron1	hypothetical protein	1231	911	2
TERG_07797T0-Intron1	hypothetical protein	86	0	0
TERG_07797T0-Intron2	hypothetical protein	226	0	3
TERG_07810T0-Intron1	hypothetical protein	2	0	6
TERG_07824T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	12
TERG_07837T0-Intron2	ribosomal protein S16	0	0	2
TERG_07849T0-Intron2	hypothetical protein	274	748	46
TERG_07849T4-Intron1	hypothetical protein	315	900	56
TERG_07862T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_07875T0-Intron1	hypothetical protein	0	7	2
TERG_07889T0-Intron3	hypothetical protein	0	0	2
TERG_07931T0-Intron2	hypothetical protein	0	0	3
TERG_07932T0-Intron6	hypothetical protein	0	0	2
TERG_07943T0-Intron2	hypothetical protein	0	0	797
TERG_07960T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	5
TERG_08013T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	6
TERG_08015T0-Intron5	threonine synthase	0	0	1
TERG_08019T0-Intron1	hypothetical protein	8	111	29
TERG_08031T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	6
TERG_08038T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	2
TERG_08040T0-Intron1	hypothetical protein	135	0	0
TERG_08064T0-Intron1	hypothetical protein	1647	0	69
TERG_08101T0-Intron1	hypothetical protein	52	0	8
TERG_08101T0-Intron7	hypothetical protein	56	0	0
TERG_08108T0-Intron1	40S ribosomal protein S22	0	0	130
TERG_08115T0-Intron1	hypothetical protein	106	0	0
TERG_08127T0-Intron1	molybdenum cofactor biosynthesis protein A	0	0	68
TERG_08128T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	5
TERG_08128T0-Intron2	hypothetical protein	0	0	1
TERG_08128T0-Intron3	hypothetical protein	0	0	14
TERG_08139T0-Intron1	hypothetical protein	39	0	4
TERG_08140T0-Intron1	hypothetical protein	118	0	18
TERG_08154T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	8
TERG_08200T0-Intron3	hypothetical protein	0	0	19

TERG_08238T0-Intron1	hypothetical protein	45	0	2
TERG_08250T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_08271T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	4
TERG_08290T0-Intron2	hypothetical protein	0	0	3
TERG_08314T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_08323T0-Intron1	serine/threonine-protein phosphatase PP2A catalytic subunit	0	0	4
TERG_08329T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	203
TERG_08341T0-Intron1	hypothetical protein	1077	148	229
TERG_08343T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_08343T0-Intron2	hypothetical protein	0	0	37
TERG_08381T0-Intron1	hypothetical protein	6	0	2
TERG_08383T1-Intron1	hypothetical protein	23858	4854	7
TERG_08423T0-Intron1	hypothetical protein	270	0	2
TERG_08435T0-Intron2	hypothetical protein	0	0	7
TERG_08462T2-Intron1	hypothetical protein	76	0	0
TERG_08462T3-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_08462T4-Intron1	hypothetical protein	0	0	2
TERG_08484T0-Intron6	hypothetical protein	0	0	35
TERG_08516T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	7
TERG_08542T0-Intron1	GTP-binding protein ypt2	0	0	3
TERG_08581T0-Intron1	hypothetical protein	44	0	1
TERG_08655T0-Intron1	ADP,ATP carrier protein	0	0	11
TERG_08655T0-Intron2	ADP,ATP carrier protein	62	0	3
TERG_08656T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	3
TERG_08672T0-Intron8	hypothetical protein	0	0	1
TERG_08678T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_08678T0-Intron2	hypothetical protein	72	0	2
TERG_08678T1-Intron1	hypothetical protein	0	0	2
TERG_08678T1-Intron2	hypothetical protein	140	0	0
TERG_08678T2-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_08678T2-Intron2	hypothetical protein	68	0	3
TERG_08697T0-Intron1	serine/threonine protein kinase	0	0	16
TERG_08756T0-Intron4	hypothetical protein	0	33	9
TERG_08761T1-Intron1	protein bfr2	0	0	3
TERG_08825T0-Intron1	hypothetical protein	135	0	0
TERG_08825T0-Intron2	hypothetical protein	672	192	7
TERG_08848T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	4
TERG_08855T0-Intron1	hypothetical protein	420	853	16
TERG_08867T0-Intron2	hypothetical protein	0	0	1
TERG_08884T0-Intron1	hypothetical protein	0	117	0
TERG_08898T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	2
TERG_08906T0-Intron1	hypothetical protein	1427	2543	10
TERG_08959T0-Intron1	hypothetical protein	32	139	20
TERG_08959T0-Intron2	hypothetical protein	0	5	6
TERG_08975T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	2

TERG_08982T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	3
TERG_08986T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	4
TERG_08991T0-Intron1	hypothetical protein	0	235	1
TERG_11512T0-Intron5	hypothetical protein	98	0	212
TERG_11518T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	64
TERG_11520T0-Intron2	hypothetical protein	0	0	6
TERG_11522T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_11546T0-Intron1	hypothetical protein	204	0	25
TERG_11592T0-Intron1	hypothetical protein	57	0	13
TERG_11600T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_11628T0-Intron1	glutamine synthetase	297262	269936	1135
TERG_11628T0-Intron3	glutamine synthetase	402	105	46
TERG_11642T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	2
TERG_11648T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_11699T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	7
TERG_11727T0-Intron3	hypothetical protein	0	0	281
TERG_11733T0-Intron1	hypothetical protein	15	0	0
TERG_11756T0-Intron2	hypothetical protein	0	0	8
TERG_11841T0-Intron5	hypothetical protein	0	0	3
TERG_11879T0-Intron1	hypothetical protein	138	0	1184
TERG_11937T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	5
TERG_11980T0-Intron1	hypothetical protein	93	0	0
TERG_11982T0-Intron5	hypothetical protein	4927	1488	67
TERG_11991T0-Intron1	hypothetical protein	367	559	40
TERG_12028T0-Intron2	hypothetical protein	0	0	6
TERG_12036T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_12054T0-Intron2	hypothetical protein	0	0	1
TERG_12078T0-Intron1	hypothetical protein	2822	576	5
TERG_12112T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	3
TERG_12164T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1
TERG_12164T0-Intron2	hypothetical protein	3153	525	307
TERG_12186T0-Intron1	hypothetical protein	11	0	0
TERG_12201T0-Intron1	hypothetical protein	649	284	5
TERG_12222T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	6
TERG_12269T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	10
TERG_12291T0-Intron1	hypothetical protein	116	259	4
TERG_12291T1-Intron1	hypothetical protein	230	254	4
TERG_12349T0-Intron1	hypothetical protein	0	11	30
TERG_12351T0-Intron1	hypothetical protein	596	313	111
TERG_12427T0-Intron2	hypothetical protein	0	0	11
TERG_12458T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	3
TERG_12477T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	2
TERG_12551T0-Intron1	hypothetical protein	433	0	10
TERG_12568T0-Intron3	hypothetical protein	0	0	27
TERG_12591T0-Intron1	hypothetical protein	504	347	23
TERG_12616T0-Intron2	hypothetical protein	153	181	1

TERG_12633T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	3
TERG_12641T0-Intron2	hypothetical protein	0	0	2
TERG_12645T0-Intron1	hypothetical protein	221	258	27
TERG_12681T0-Intron1	hypothetical protein	0	0	1

*Os valores de contagem de *reads* são expressos em *reads/MB*.

ANEXOS DE PUBLICAÇÃO

ANEXO DE PUBLICAÇÃO

ANEXO A

Transcription of N- and O-linked mannosyltransferase genes is modulated by the *pacC* gene in the human dermatophyte *Trichophyton rubrum*Niego S. Mendes^a, Glauce L. Trevisan^b, Aline H. Silva Cruz^a, Rodrigo S. Santos^a, Nalu T.A. Peres^a, Nilce M. Martinez-Rossi^a, Antonio Rossi^{b,*}^aDepartamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil^bDepartamento de Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 July 2012

Received in revised form 21 September 2012

Accepted 24 September 2012

Keywords:

Glycosylation

Enzyme secretion

pH regulation

Transcription profiling

ABSTRACT

In fungi, ambient pH sensing involves the activation of the Pal/PacC signalling pathway. In the dermatophyte *Trichophyton rubrum*, pH-dependent secretion of keratinases, which are major virulence determinants, is affected by disruption of the *pacC* gene. Here, the transcription profiling of the genes coding for N- and O-linked mannosyltransferases, enzymes involved in protein glycosylation, was evaluated in *T. rubrum* in response to disruption of the *pacC* gene and growth in keratin, glucose, and glucose plus glycine. We show that transcription of these mannosyltransferase genes is affected by nutrients at acidic pH and by PacC.

© 2012 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Dermatophytes are the most common organisms infecting keratinized structures such as skin, hair, and nails, and their ability to degrade keratin is believed to be a major virulence factor [1,2]. A correlation between keratinolytic activity and pathogenesis has been proposed because dermatophytes secrete a battery of endo- and exo-proteases during infection that degrade keratinized structures into oligopeptides and free amino acids for use as nutrients [3,4]. It is likely that proteases with optimal activity at both acidic and alkaline pHs are important virulence factors in dermatophytes, and that their regulation during infection is crucial [5]. In the early stages, and in response to the acidic pH of human skin, the pathogen de-represses the synthesis of non-specific keratinases and proteases that have optimal activity at acidic pH. They act on skin proteins, producing peptides that are hydrolyzed into amino acids, which are then used by the fungus as sources of carbon, nitrogen, and sulfur. The metabolism of some amino acids promotes the alkalization of the host microenvironment, making it suitable for the action of keratinases with optimal activity at alkaline pH. The dermatophyte *Trichophyton rubrum* rapidly responds to pH changes by modulating the expression of genes, allowing the use of skin proteins over a wide pH range, thereby enabling the development of infection and persistence of the dermatophyte in

host tissues [6,7]. Moreover, inactivation of the *pacC* gene, a component of the pH signalling pathway in *T. rubrum*, reduces the activity of secreted keratinases [3], indicating that the *pacC* gene is somehow involved in the regulation of keratinolytic activity, and consequently in the virulence and pathogenicity of this organism.

Protein secretion from a eukaryotic cell requires movement through the endoplasmic reticulum (ER) and the Golgi apparatus. In the course of trafficking, the secreted proteins undergo glycosylation, which is the major post-translational molecular event [8–14]. In secreted proteins, the glycosyl groups are usually attached to either an amide group (N-glycosylation) or a hydroxyl residue (O-glycosylation), which are mainly found on serine and threonine residues. During glycosylation, the oligosaccharide GlcNAc2Man9Glc3 is transferred to an Asn residue within the sequence Asn-XSer/Thr by an oligosaccharyltransferase, where X represents any amino acid except proline [15,16]. O-glycosylation occurs via several pathways. In higher eukaryotes, the main pathway utilizes sugar nucleotides and is located in the Golgi apparatus [17]. In yeasts, O-mannosylation begins in the ER lumen and, like N-glycosylation, it requires dolichol phosphate-activated sugar residues. The initial reaction is catalyzed by proteins from the evolutionarily conserved mannosyltransferase (Pmt) family [18,19]. Proteins secreted from yeast cells are usually heavily N- and/or O-glycosylated. In proteins that are glycosylated at both sites, it is not known whether N-glycosylation precedes O-mannosylation, or vice versa [20]. It is also unknown whether the O-mannosylation that takes place in the ER prevents N-glycosylation; however, there is some evidence for the opposite situation [21]. Altered glycosylation may affect the stability and half-life of proteins, thus changing their activities or affinities towards

* Corresponding author. Address: Departamento de Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av Bandeirantes 3900, 14049-900-Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. Fax: +55 16 3633 6840.

E-mail address: anrossi@usp.br (A. Rossi).

substrates [22,23].

Delineating the mechanisms underlying fungal adaptability to ambient variation is fundamental to an understanding of the mechanisms of pathogenicity and resistance to inhibitors in pathogenic organisms. This work was aimed at investigating the expression of genes encoding dolichyl-P-Man:Man(5)GlcNAc(2)-PP-dolichyl mannosyltransferase and an O-mannosyltransferase (referred to as the *N-man* and *O-man* genes, respectively) in the dermatophyte *T. rubrum* in response to nutrients, ambient pH, and disruption of the *pacC* gene. Our findings revealed a relationship between the expression of these two mannosyltransferase genes and the *pacC* gene in response to ambient pH and carbon source.

2. Materials and methods

2.1. Strains and growth conditions

T. rubrum clinical isolate H6 (ATCC MYA-3108) and a *pacC-1* mutant that carries a disrupted *pacC* gene, which were used throughout this study, were selected as previously described [3,24]. The H6 and *pacC-1* strains were cultivated on Sabouraud glucose agar for 15 days at 28 °C, and *pacC-1* cultures were supplemented with 450 µg/ml hygromycin. Mycelia were collected with a sterile spatula, vortexed in saline solution [0.9% (w/v) NaCl] with 0.01% (v/v) Tween, filtered through fiberglass to remove mycelial debris, and then centrifuged to recover the conidia. Then, 10⁶ conidia were transferred to 50 ml of Sabouraud broth, and germination was carried out at 28 °C for 72 h on an orbital shaker at 180 rpm (control). After incubation, the final pH of the culture medium was measured with a pH meter, and the resulting mycelia were harvested by filtration through sterilized Whatman paper (Whatman International, Maidstone, UK), washed with sterilized water, and transferred to minimal medium (MM) [25] at pH 5.0 or pH 8.0, which was, in some cases (as indicated), buffered with 50 mM sodium citrate or 50 mM Tris-HCl, respectively. MM was supplemented with glucose (50 mM) or glucose plus glycine (50 mM each) and sodium nitrate (70 mM). MM was also supplemented with keratin from bovine hooves (2.5 g/l) as a nutrient source. All cultures were incubated at 28 °C for 3, 6, and 24 h with agitation.

2.2. RNA extraction and cDNA synthesis

Mycelia obtained from each culture were harvested by filtration, and total RNA was extracted from approximately 100 mg of frozen mycelium using TRIzolTM reagent, and treated with RNase-free DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA), following the manufacturer's instructions. One microgram of DNase-treated RNA was reverse transcribed into cDNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) according to the manufacturer's instructions. The cDNA from 3 independent biological experiments was quantified spectrophotometrically, and stored at –80 °C until PCR amplification.

2.3. Real-time PCR

For quantitative real-time PCR analyses, the genes encoding dolichyl-P-Man:Man(5)GlcNAc(2)-PP-dolichyl mannosyltransferase (*N-man*, TERG_06338; GenBank: XM_003233297) and O-mannosyltransferase (*O-man*, TERG_06465; GenBank: XM_003233430) were amplified from cDNA using the following primers (5'–3'): TAAACGACAGTGGTATGCGG (*N-man*FWD) and TGTAGCCTGTTGGTCTCT (*N-man*REV); CCATGGACGTGATACTC (*O-man*FWD) and CGTCATCATAGCAACATTGAG (*O-man*REV). Reactions were performed in three independent experiments using SYBR green PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), in the StepOne Plus Real-Time PCR system. A 12.5-µl reaction was set up using 50 ng of cDNA and 300 nM of each primer, and the PCR cycle

was as follows: 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. Melting curve analyses were performed after each cycling to exclude primer dimers and nonspecific PCR products. Relative transcript quantities were calculated using the $\Delta\Delta C_t$ method using the experimental condition that yielded the lowest C_t value (*N-man*, non-buffered H6 cultures in keratin, 6 h incubation) [26,27]. The *T. rubrum* α -actin (TERG_06637) and β -tubulin (TERG_07904) genes, which were used as endogenous reference genes, were amplified using the following oligonucleotides (sequence 5'–3'): AACGCCATCATGAAGTGT (*actin*FWD) and TCCTCTCCATACGGTCAGA (*actin*REV); CCGTATGATGGCCACTTT (*tubulin*FWD) and CTGACCTGGGAAACGAAGAC (*tubulin*REV). Data normalization and analyses were performed using the GenEx 5 Multid Analyses AB (www.multid.se). To confirm the identity of the genes analyzed in this work, as well as the endogenous reference genes, the PCR products were sequenced and analyzed by alignment with sequences retrieved from the Broad Institute Dermatophyte Comparative Database (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/dermatophyte_comparative/MultiHome.html).

3. Results

In vitro growth of the dermatophyte *T. rubrum* is dependent on the initial culture pH, with apparent optimal growth at pH 4.0–5.0, irrespective of carbon source (glucose, glycine, or protein). The initial pH of the *T. rubrum* cultures increased from 5.0 to a pH that ranged from 8.3 to 8.9 after 72–96 h of incubation in glycine or keratin. This effect was not observed when the fungus was cultivated with glucose as the carbon source, and the pH was maintained at approximately 5.0 [28,29]. Hydrolysis of keratin and other proteins releases amino acids, such as glycine, whose metabolism leads to the secretion of ammonia, thereby shifting the pH of the culture from acidic to alkaline [28]. Therefore, the metabolism of both glycine and keratin at pH 5.0 were alkalizing events [28,29], even though the culture pH was still acidic after 24 h of incubation in glycine or keratin (Fig. 1). Moreover, disruption of the *pacC* gene in *T. rubrum* neither affects this pH shift (Fig. 1) [30] nor its growth on Sabouraud solid and in liquid media [3]. However, a marked decrease in the conidiation on Sabouraud solid medium and in the secretion of keratinolytic activity by the *pacC-1* mutant, which correlated with its reduced capacity to infect human nails *in vitro*, were observed as compared to the control strain [3]. No ambient pH changes were observed when the fungus was cultured in buffered media (data not shown). *T. rubrum* grows poorly in culture medium with a starting pH of 8.0, even though the culture becomes acidified after incubation with glucose as a carbon source (Fig. 1). Growth in glycine or keratin dropped the pH of the culture to approximately 7 after the first 3–6 h of incubation, which increased to approximately pH 7.5 after 24 h of incubation (Fig. 1). An attractive hypothesis is that *T. rubrum* senses the alkaline environment and then acidifies the culture medium to an ambient pH at which its growth is stimulated. Metabolism of glycine or keratin leads to the secretion of ammonia, which shifts the culture pH to alkaline pH values. Therefore, to better understand the transcription of both the *O-man* and *N-man* genes during the first 24 h of incubation, when the pH of the medium was still acidic in non-buffered cultures (Fig. 1), we estimated the expression of both genes by qRT-PCR in different culture conditions.

Transcription of the *O-man* and *N-man* genes in both the H6 and *pacC-1* mutant strains was affected differently by the carbon source, the culture pH, and the time of incubation (Fig. 2). At pH 5.0, *O-man* was preferentially transcribed in both buffered and non-buffered keratin cultures, whereas *N-man* was apparently preferentially transcribed in non-buffered glucose cultures. The expression of *N-man* decreased as incubation time increased at pH 5.0, but the expression decreased more consistently in buffered glucose cultures (Fig. 2). Disruption of the *pacC* gene decreased transcription of *O-man* in both glucose and keratin at pH 5.0; however, *O-man* expression was

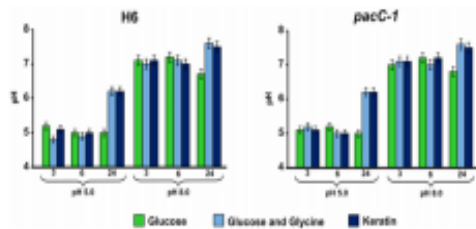


Fig. 1. Evaluation of pH changes during the cultivation of *Trichophyton rubrum* with glucose, glucose plus glycine, or keratin, as the carbon source, for 3, 6 and 24 h. The initial pH of the culture medium was 5.0 or 8.0. The bars in the columns represent the standard deviation of data obtained from three independent experiments.

enhanced in glucose plus glycine. Interestingly, the transcription of *N-man* in keratin cultures was enhanced in the *pacC-1* mutant at pH 5.0. Therefore, at acidic pH, transcription of the *O-man* and *N-man* genes was positively and negatively affected, respectively, by the *pacC* gene in keratin cultures (Fig. 2). Moreover, transcription of the *O-man* and *N-man* genes in buffered cultures indicated that the *O-man* gene was preferentially transcribed at acidic pH in the presence of keratin compared to glucose or glucose plus glycine as the carbon sources, whereas transcription of the *N-man* gene was almost the same in both acidic and alkaline pH in the presence of keratin, and these properties were affected by disruption of the *pacC* gene (Fig. 2). It is also worth noting that while the disruption of the *pacC* gene resulted in changed transcription of the *O-man* gene in the different conditions at pH 5.0, it also resulted in the opposite changes for growth in glucose and glucose plus glycine at pH 8.0. Thus, our results suggest that the product of the *pacC* gene negatively affect both the transcription of the *N-man* gene in keratin at pH 5.0 and the *O-man* gene at pH 8.0 in the presence of different nutrients (Fig. 2) i.e., the *pacC* gene is functional irrespective of the culture conditions assayed.

4. Discussion

It has been well documented that the dermatophyte *T. rubrum*, as well as other filamentous fungi, acidifies the culture medium and represses the secretion of proteases during growth in glucose as the sole carbon source [31,32]. Moreover, during growth in glycine or keratin, the culture medium is alkalized; however, this change is dependent on the initial pH of the culture, with an apparent optimum at pH 4.0–5.0. Interestingly, glycine utilization is apparently not repressed by glucose, because alkalization of the culture medium occurs with glucose and glycine as carbon sources [29,33]. However, it is worth noting that during the first 24 h of cultivation, the pH of the medium is still acidic (Fig. 1), implying that the metabolism of glycine or keratin, an alkalizing event, occurs during the first 24 h of cultivation, exclusively in an acidic environment.

In the model fungi *Neurospora crassa* and *Aspergillus nidulans*, one of the metabolic responses to the pH of the culture medium is the pH-dependent glycosylation of secreted enzymes [34–37]. For example, the level of glycosylation of the Pho-2 alkaline phosphatase synthesized by *N. crassa* at alkaline pH differs from that synthesized at acidic pH, which is approximately 13% and 21% for the Pho-2 enzyme purified from mycelium grown at pH 5.4 and 7.8, respectively [37,38]. The loss of enzymatic activity observed for the Pi-repressible alkaline phosphatase secreted at acidic pH is probably because the glycosylation of this enzyme is lower than that secreted at alkaline pH. We have also provided evidence that glycosylation of secreted enzymes, as documented for the Pi-repressible phosphatases in *N. crassa* and *A. nidulans*, is PacC-dependent [35].

In *T. rubrum*, disruption of the *pacC* gene, as in the *pacC-1* mutant strain, resulted in decreased growth on human nails and decreased

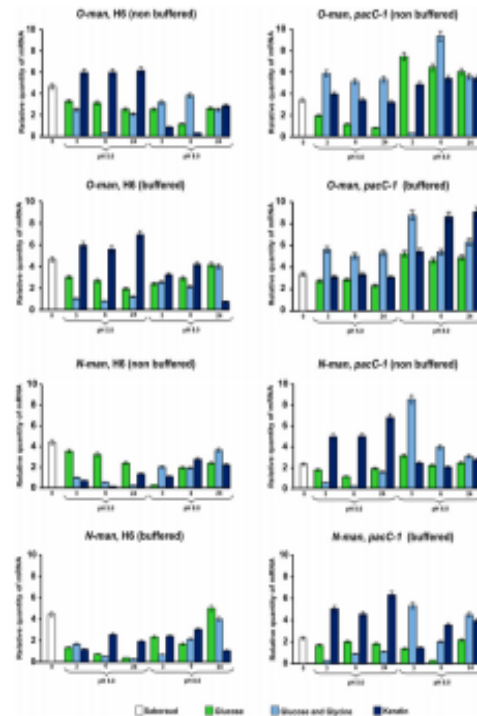


Fig. 2. Expression of mannosyltransferase genes (*O-man* and *N-man*) in *T. rubrum* by quantitative real-time RT-PCR. Strains H6 and *pacC-1* were cultured with glucose, glucose plus glycine, or keratin as the carbon source, for 3, 6, and 24 h. The initial pH of the culture medium was 5.0 or 8.0. The expression of the mannosyltransferase genes at 0 h is indicated (control). The bars in the columns represent the standard deviation of data obtained from three independent experiments.

secretion of keratinolytic proteases in liquid medium when supplemented with keratin, which suggests that the keratinases secreted by *T. rubrum* are somehow regulated by the PacC protein [3]. PacC might be involved in the glycosylation of these keratinases through transcriptional modulation of O- and N-linked mannosyltransferases, a hypothesis supported by the results described here. Transcriptional profiling of both the *O-man* and *N-man* genes revealed a high level of complexity, because transcription of these genes was affected by nutrients, culture pH, and the functioning of the *pacC* gene. Disruption of the *pacC* gene increased the expression of *N-man* at pH 5.0 in keratin cultures. Moreover, if O-mannosylation precedes N-glycosylation in *T. rubrum*, as demonstrated in yeast [20], this physiological effect is dependent on the function of the *pacC* gene at acidic pH.

In conclusion, the genes encoding the O- and N-mannosyltransferases had different expression profiles, and the *O-man* gene was preferentially expressed at acidic pH when *T. rubrum* was grown on medium containing keratin. The balance between *N-man* and *O-man* expression levels in cultures at acidic pH may be under the control of the PacC transcription factor (in response to different carbon sources). Therefore, the product of the *pacC* gene of *T. rubrum* is functional at acidic pH. Moreover, transcription of the *N-man* and *O-man* genes might be required at different culture pHs for the glycosylation of transported proteins, according to the stage of infection, which suggests a possible role in cell adhesion and activation of signalling pathways regulating the production of enzymes that enable nutrient uptake for fungal development and maintenance in the host [39–41].

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Brazilian funding agencies FAPESP, CNPq, CAPES and FAEP. We thank M. Mazucato and S.H. Castrechini for skilled technical assistance.

References

- Achterman R.R., White T.C. (2012) Dermatophyte virulence factors: identifying and analyzing genes that may contribute to chronic or acute skin infections. *Int J Microbiol.* 2012, 358305.
- Peres N.T.A. (2010) Transcriptional profiling reveals the expression of novel genes in response to various stimuli in the human dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *BMC Microbiol.* 10, 39.
- Ferreira-Nozawa M.S., Silveira H.C.S., Ono C.J., Fachin A.L., Rossi A., Martinez-Rossi N.M. (2006) The pH signaling transcription factor PacC mediates the growth of *Trichophyton rubrum* on human nail *in vitro*. *Med Mycol.* 44, 641–645.
- Monod M. (2008) Secreted proteases from dermatophytes. *Mycopathologia.* 166, 285–294.
- Tsuboi R., Ko I.J., Takamori K., Ogawa H. (1989) Isolation of a keratinolytic proteinase from *Trichophyton mentagrophytes* with enzymatic activity at acidic pH. *Infect Immun.* 57, 3479–3483.
- Martinez-Rossi N.M., Ferreira-Nozawa M.S., Graminha, M.A.S., Nozawa, S.R., Fachin, A.L., Cerveletti, E.P., Prade, R.A., Rossi, A. (2004) *in: Fungi in Human and Animal Health*, vol. 9 (Kushwaha, R.K.S., Ed.), pp. 143–165, Scientific Publishers, Jodhpur, India.
- Martinez-Rossi N.M., Persinoti G.F., Peres N.T., Rossi A. (2012) Role of pH in the pathogenesis of dermatophytoses. *Mycoses.* 55, 381–387.
- Gentsch M., Tanner W. (1996) The PMT gene family: protein O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae* is vital. *EMBO J.* 15, 5752–5759.
- Gemmill T.R., Trimble R.B. (1999) Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species. *Biochim Biophys Acta.* 1426, 227–237.
- Motteram J., Lovegrove A., Pirie E., Marsh J., Devonshire J., van de Meene A. et al. (2011) Aberrant protein N-glycosylation impacts upon infection-related growth transitions of the haploid plant-pathogenic fungus *Mycosphaerella graminicola*. *Mol Microbiol.* 81, 415–433.
- Lommel M., Schott A., Jank T., Hofmann V., Strahl S. (2011) A conserved acidic motif is crucial for enzymatic activity of protein O-mannosyltransferases. *J Biol Chem.* 286, 39768–39775.
- Mouyna I. (2010) Members of protein O-mannosyltransferase family in *Aspergillus fumigatus* differentially affect growth, morphogenesis and viability. *Mol Microbiol.* 76, 1205–1221.
- Shibata N., Kobayashi H., Suzuki S. (2012) Immunochromatography of pathogenic yeast, *Candida* species, focusing on mannan. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 88, 250–265.
- Lussier M., Sdicu A.M., Bussey H. (1999) The KTR and MNN1 mannosyltransferase families of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta.* 1426, 323–334.
- Knauer R., Lehle L. (1999) The oligosaccharyltransferase complex from *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation of the OST6 gene, its synthetic interaction with OST3, and analysis of the native complex. *J Biol Chem.* 274, 17249–17256.
- Helenius A., Aebi M. (2001) Intracellular functions of N-linked glycans. *Science.* 291, 2364–2369.
- Brockhausen I. (1995) Substrate specificity and inhibition of UDP-GlcNAc:GlcNAc beta 1-2Man alpha 1-6R beta 1,6-N-acetylglucosaminyltransferase V using synthetic substrate analogues. *Glycoconj J.* 12, 371–379.
- Strahl-Bolsinger S., Gentsch M., Tanner W. (1999) Protein O-mannosylation. *Biochim Biophys Acta.* 1426, 297–307.
- Lengeler K.B., Tielker D., Ernst J.F. (2008) Protein-O-mannosyltransferases in virulence and development. *Cell Mol Life Sci.* 65, 528–544.
- Ecker M., Mira V., Hagen I., Deutzmann R., Strahl S., Tanner W. (2003) O-mannosylation precedes and potentially controls the N-glycosylation of a yeast cell wall glycoprotein. *EMBO Rep.* 4, 628–632.
- Haty C., Strahl S., Romisch K. (2001) O-mannosylation protects mutant alpha-factor precursor from endoplasmic reticulum-associated degradation. *Mol Biol Cell.* 12, 1093–1101.
- Gorka-Niec W., Kania A., Perlinska-Lenart U., Smolenska-Sym G., Palamarczyk G., Kruszewska J.S. (2011) Integration of additional copies of *Trichoderma reesei* gene encoding protein O-mannosyltransferase 1 results in a decrease of the enzyme activity and alteration of cell wall composition. *Fungal Biol.* 115, 124–132.
- Maddi A., Free S.J. (2010) alpha-1,6-Mannosylation of N-linked oligosaccharide present on cell wall proteins is required for their incorporation into the cell wall in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell.* 9, 1766–1775.
- Fachin A.L., Maffei C.M.L., Martinez-Rossi N.M. (1996) *In vitro* susceptibility of *Trichophyton rubrum* isolates to griseofulvin and itraconazole: Induction and isolation of a resistant mutant to both antimycotic drugs. *Mycopathologia.* 135, 141–143.
- Cove D.J. (1966) The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochim Biophys Acta.* 113, 51–56.
- Winer J., Jung C.K., Shackel I., Williams P.M. (1999) Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes *in vitro*. *Anal Biochem.* 270, 41–49.
- Jacob T.R., Peres N.T., Persinoti G.F., Silva L.G., Mazucato M., Rossi A. et al. (2012) *rbp2* is a reliable reference gene for quantitative gene expression analysis in the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *Med Mycol.* 50, 368–377.
- Ferreira-Nozawa M.S., Nozawa S.R., Martinez-Rossi N.M., Rossi A. (2003) The dermatophyte *Trichophyton rubrum* secretes an EDTA-sensitive alkaline phosphatase on high-phosphate medium. *Braz J Microbiol.* 34, 161–164.
- Maranhão F.C.A., Paão F.G., Martinez-Rossi N.M. (2007) Isolation of transcripts over-expressed in human pathogen *Trichophyton rubrum* during growth in keratin. *Microb Pathog.* 43, 166–172.
- Silveira H.C.S., Gras D.E., Cazzaniga R.A., Sanches P.R., Rossi A., Martinez-Rossi N.M. (2010) Transcriptional profiling reveals genes in the human pathogen *Trichophyton rubrum* that are expressed in response to pH signaling. *Microb Pathog.* 48, 91–96.
- Meevoortism V., Niederpruem D.J. (1979) Control of exocellular proteases in dermatophytes and especially *Trichophyton rubrum*. *Sabouraudia.* 17, 91–106.
- Apodaca G., McKerrow J.H. (1989) Regulation of *Trichophyton rubrum* proteolytic activity. *Infect Immun.* 57, 3081–3090.
- Thedei Jr. G., Doubowetz T.H., Rossi A. (1994) Effect of carbon source and extracellular pH on the acidification of the culture medium and phosphatase excretion in *Neurospora crassa*. *Braz J Med Biol Res.* 27, 1129–1134.
- Nozawa S.R., May G.S., Martinez-Rossi N.M., Ferreira-Nozawa M.S., Coutinho-Netto J., Maccheroni Jr. W. et al. (2003) Mutation in a calpain-like protease affects the posttranslational mannosylation of phosphatases in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol.* 38, 220–227.
- Nozawa S.R., Ferreira-Nozawa M.S., Martinez-Rossi N.M., Rossi A. (2003) The pH-induced glycosylation of secreted phosphatases is mediated in *Aspergillus nidulans* by the regulatory gene *pacC*-dependent pathway. *Fungal Genet Biol.* 39, 286–295.
- Nahas E., Rossi A. (1984) Properties of a repressible alkaline-phosphatase secreted by the wild-type strain 74A of *Neurospora crassa*. *Phytochemistry.* 23, 507–510.
- Palma M.S., Han S.W., Rossi A. (1989) Dissociation and catalytic activity of phosphate-repressible alkaline-phosphatase from *Neurospora crassa*. *Phytochemistry.* 28, 3281–3284.
- Nozawa S.R., Thedei G., Crott L.S.P., Barbosa J.E., Rossi A. (2002) The synthesis of phosphate-repressible alkaline phosphatase does not appear to be regulated by ambient pH in the filamentous mould *Neurospora crassa*. *Brazilian Journal of Microbiology.* 33, 92–95.
- Kotz A., Wagener J., Engel J., Routier F.H., Echtenacher B., Jacobsen I. et al. (2010) Approaching the secrets of N-glycosylation in *Aspergillus fumigatus*: characterization of the AFOc1 protein. *PLoS One.* 5, e15729.
- Sheth C.C., Hall R., Lewis L., Brown A.J., Odds F.C., Erwig L.P. et al. (2010) Glycosylation status of the *C. albicans* cell wall affects the efficiency of neutrophil phagocytosis and killing but not cytokine signaling. *Med Mycol.* 48, 513–524.
- Diaz-Jimenez D.F., Mora-Montes H.M., Hernandez-Cervantes A., Luna-Arias J.P., Gow N.A., Flores-Carreón A. (2012) Biochemical characterization of recombinant *Candida albicans* mannosyltransferases Mnt1, Mnt2 and Mnt5 reveals new functions in O- and N-mannan biosynthesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 419, 77–82.

ANEXO B

Hypothesis

Ambient pH Sensing in Filamentous Fungi: Pitfalls in Elucidating Regulatory Hierarchical Signaling Networks

Antonio Rossi^{1*}
 Aline H. S. Cruz²
 Rodrigo S. Santos²
 Patricia M. Silva¹
 Emiliana M. Silva¹
 Níege S. Mendes²
 Nilce M. Martinez-Rossi²

¹Department of Biochemistry and Immunology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

²Department of Genetics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Abstract

In this article, the experiments used to construct the ambient pH-signaling network involved in the secretion of enzymes by filamentous fungi have been reviewed, focusing on the phosphate-repressible phosphatases in *Aspergillus nidulans*. Classic and molecular genetics have been used to demonstrate that proteolysis of the transcription factor PacC at alkaline ambient pH is imperative for its action, implying that the full-length version is not an active molecular form of PacC. It

has been hypothesized that the transcriptional regulator PacC may be functional at both acidic and alkaline ambient pH, in either the full-length or the proteolyzed form, if it carries a *pal*-dependent molecular tag. The products of the *pal* genes are involved in a metabolic pathway that led to the synthesis of effector molecules that tag the *pacC* product, perhaps facilitating its proteolysis. © 2013 IUBMB Life, 65(11):930–935, 2013

Keywords: *PacC* activation; pH regulation; *pacC* gene; *pal* genes; phosphate sensing; Pi-repressible phosphatases; acid phosphatase; alkaline phosphatase

Introduction

The diverse molecular mechanisms used by filamentous fungi to sense and transduce environmental signals are mediated by a broad range of biochemical networks, in which interwoven metabolic pathways support cellular sensing and the transduction of a myriad of ambient signals (1). One such signal that is sensed and transduced by fungal cells is ambient pH (2–4). All microbial organisms must adapt physiologically to ambient pH changes by, for example, appropriately adjusting the secretion of nutritional enzymes with optimal activity accordingly, that is, phosphate (Pi)-repressible acid and alkaline phosphatases

have their secretion increased at pH 5.0 and 8.0, respectively (2,3). Coordination of environmental and nutrient sensing with the control of genetic responses to molecular signals is crucial for the growth and proliferation of most living organisms, including fungi, because the failure to regulate cellular responses to changing environmental pH would have a negative impact on the competitiveness of an organism. Thus, fungi have evolved elaborate signal transduction networks to allow adaptation to ambient pH changes (2,3,5–7). These metabolic pathways regulate the secretion of hydrolytic enzymes, membrane remodeling, cell adhesion, cellular transport, growth, development, iron uptake, stress, molecular defense, and virulence responses at both acidic and alkaline pH (8–12). Gene regulation by pH involves the highly conserved PacC/Pal signal transduction pathway that mediates a myriad of metabolic events in filamentous fungi and is widely accepted that it governs the response to neutral to alkaline pH. The *pacC* gene codes for a Zn-finger transcription factor, and the six *pal* genes (*pal A, B, C, F, H, and I*) are members of a signaling cascade that senses alkalinity and promotes the proteolytic activation of PacC (4,13–18). The alkaline ambient pH signal is sensed by the transmembrane proteins PalI and PalH (19) and transmitted from the plasma membrane complex to the

© 2013 International Union of Biochemistry and Molecular Biology
 Volume 65, Number 11, November 2013, Pages 930–935

*Address correspondence to: Antonio Rossi, Department of Biochemistry and Immunology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, 14049-900 Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. Tel.: +55 16 3602 3112. Fax: +55 16 3602 0222. E-mail: anrossi@usp.br

Received 9 June 2013; Accepted 25 September 2013

DOI 10.1002/iub.1217

Published online 30 October 2013 in Wiley Online Library
 (wileyonlinelibrary.com)

endosomal membrane complex on the surface of the endosome, possibly with the involvement of proteins PalC and PalF (20). The PacC protein undergoes a two-step proteolytic processing in response to neutral to alkaline pH (4). The PalA protein interacts with the YPXI/I motifs in PacC⁷² (full-length version of PacC) mediating a protein-protein interaction, which is required for the proteolytic conversion of PacC⁷² to PacC⁵³. This proteolytic step is possibly mediated by PalB, a calpain-like cysteine protease. In the second, pH-independent step, PacC⁵³ is converted to PacC²⁷. The PacC²⁷ form prevents transcription in neutral to alkaline conditions of those genes expressed preferentially at acidic pH. Thus, whatever the ambient pH, loss-of-function mutations in the *pal* genes shall lead to a wild-type acidic growth phenotype, that is, the full-length version of PacC would be inactive in the absence of *pal* signaling or under acidic growth pH (4). However, it is uncertain whether the highly conserved PacC pathway governs only the expression of alkaline-responsive genes, and even if it is the sole mechanism that governs pH-responsive gene expression in fungi.

The *pacC/pal* Genes and Mutations

Several conserved genes in which mutations alter the response of fungi to ambient pH were first identified in the fungus *Aspergillus nidulans* by Dorn in the early 1960s (21). *A. nidulans* has optimal growth pH on solid medium at a pH near to 6.5. At least six genes have been identified for which a mutation interferes with pH regulation of the synthesis of Pi-repressible extracellular enzymes and permeases. Mutations in the *pal A, B, C, E, and F* genes increase colony staining for acid phosphatase at pH 4.8. By contrast, mutations in the *pacC* gene increase colony staining for alkaline phosphatase at pH 8.2. Dorn suggested that the *pacC* gene encoded a Pi-repressible acid phosphatase and that the *pal* genes encoded Pi-repressible alkaline phosphatases. These predictions assume that increased colony staining corresponds to an increased expression of both enzymes. Indeed, the early work of Dorn revealed that the *pacC5* mutant of *A. nidulans* synthesizes temperature-sensitive acid phosphatase, mutant *palB7*, a temperature-sensitive alkaline phosphatase, and mutant *palcA1*, temperature-sensitive acid and alkaline phosphatases (21). In an attempt to interpret these and other data generated by classical genetics studies, Dorn proposed a hypothesis whereby acid and alkaline phosphatases may be composed of two different monomers, with one monomer common to two of these enzymes (PalcA), thus implying a structural function for the *pacC*, *palB*, and *palcA* genes. However, the classic work of Caddick et al. (3) in the 1980s showed that mutations in any of the *pal* or *pacC* genes (e.g., *palA1*, *palB7*, *palF15*, *pacC5*, and *pacC14*) increased the levels of Pi-repressible acid (PacA) and alkaline (PalD) phosphatase, respectively, at pH 6.5. This finding implies that at a pH near 6.5, the *pal* and *pacC* mutants show a response similar to the wild-type strain at a more acidic and alkaline pH, respectively. The *pacC5* and the

pacC14 mutations are alleles and code for truncated proteins in which the acidic C-terminal segment is absent; however, the zinc-finger region of PacC is conserved (4). A null mutant (*pacC⁻*) deleted for the entire *pacC* coding region mimics acidic growth conditions more extremely and, in addition, results in cryosensitive growth, poor growth, and conidiation. This strain is very sick probably because both the positive and negative actions of PacC are prevented. Classical and molecular genetics analyses have supported that the *pacC* gene is a wide-domain regulatory gene whose products directly mediate pH regulation, whereas the products of the *palA, B, C, E, and F* genes are involved in a metabolic pathway that leads to the synthesis of an effector molecule that interacts with the *pacC* product (3,13). This cognate effector molecule would be able to prevent the positive and negative action of the *pacC* gene; in other words, the product of the *pacC* gene acts positively on the transcription of *palD* and negatively on the transcription of *pacA* at alkaline pH (4). Thus, in the absence of a functional *pacC* product, the presence or absence of the cognate effector molecule would be of no consequence. In the absence of the cognate effectors, the derepression of *pacA* transcription at alkaline pH would occur. Interestingly, although the promoters of alkaline-expressed genes such as *ipnA*, *pacC*, and the alkaline protease-encoding *pvtA* contain a number of PacC-binding sites (consensus 5'-GCCARG-3'), the pH-regulated acid phosphatase-encoding *pacA* gene contains none in the 1,311-bp upstream of the initiation codon (4,22). Regardless of the underlying reason, it is clear that the structural and regulatory hypotheses are incompatible (23). As the regulatory nature of the *pacC* gene is now well documented, is it possible to reconcile these two hypotheses?

Secretion of Pi-Repressible Phosphatases and Other Hydrolytic Enzymes

Most microorganisms modulate their metabolic activities through a complex network that involves several genes that sense the availability of Pi. Under Pi shortage, this metabolic pathway signals for the derepression of phosphatases and transporters to satisfy the cellular demand for Pi. High Pi concentrations repress the function of PalcA, a transcriptional regulator homologous to the *Neurospora crassa* NUC-1 protein. PalcA is a highly conserved DNA-binding protein that is involved in the sensing of Pi deprivation. The promoter region of genes *pacA* and *palD* contains NUC-1-binding sites (consensus 5'-CACGTG-3'), and under conditions of Pi shortage, the NUC-1 repressor is removed. Consequently, the Pi-repressible phosphatases are transcribed (24–26).

The secretion of both acid and alkaline Pi-repressible phosphatases (among other proteins and enzymes) responds to ambient pH under the regulation of the Pal/PacC signal transduction pathway. Thus, if the *pal* genes represent metabolic steps involved in the activation of a single regulatory protein (transcription factor PacC), the molecular properties of the

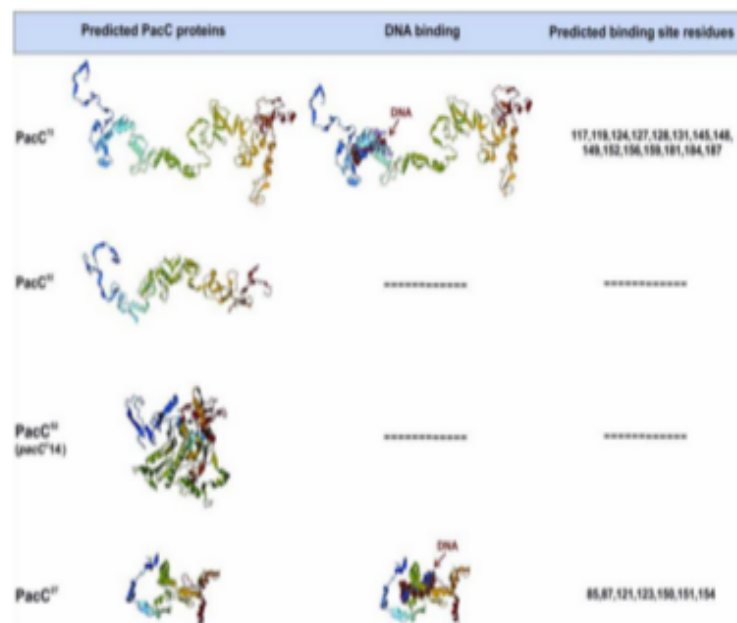


FIG 1

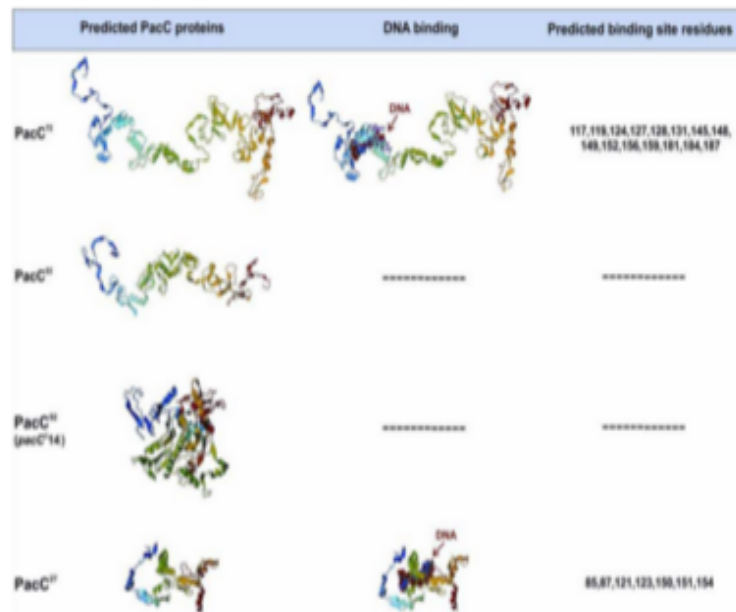
Predicted PacC proteins: PacC²², PacC²³, PacC²⁵, and PacC²⁷. Predicted DNA-binding domains in the proteins are indicated by red arrows. The predicted binding site residues in the PacC²² and PacC²⁷ proteins are indicated by the amino acid residue numbers, which were determined based on protein sequence. Predictions were generated using the I-TASSER server (30–32). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

secreted Pi-repressible acid phosphatase, for example, should be identical in all *pal* mutants and wild-type strain. However, this is not the case, as indicated by the molecular mass, electrophoretic mobility, chromatographic behavior, thermostability, kinetic properties, and glycosylation of the acid phosphatases that are secreted by the *palA1*, *palB7*, *palC4*, and *palF15* mutant strains (27–29). We hypothesized that each of the *pal* genes perform specific functions in the activation of PacC including, in addition to proteolysis, other post-translational modifications, such as glycosylation. It is worth noting that a large number of enzymatic steps are necessary to accomplish the full glycosylation needed to secrete Pi-repressible phosphatases in the native form. Incomplete post-translational modifications may change the affinity of enzymes involved in tagging PacC, which probably occurred with the truncated PacC14 protein, that is, PacC14 affinity for the PacC-binding sites has probably been changed (Fig. 1). It is likely that the alterations in steady-state kinetic properties, temperature sensitivity, and electrophoretic mobility reflect structural changes in the enzyme molecule synthesized by the *pal* and *pacC* mutant strains. For example, the acid phosphatase secreted by the *palB*¹ strain at pH 6.5 showed hydrolytic activity over *p*-nitrophenyl phosphate (PNP-P) with negative cooperativity, whereas the enzyme secreted by the *palB7* mutant showed Michaelian behavior (23). This difference could explain the approximately twofold increase in the enzyme activity secreted by the *palB7* strain, as shown by colony staining or enzymatic hydrolysis of PNP-P. This occurs because enzymes showing Michaelian

behavior hydrolyze substrate faster than isoenzymes showing negative cooperativity, assuming that substrate concentrations are equivalent (23). The *pacC*¹⁴ mutant should poorly secrete the Pi-repressible acid phosphatase, as irrespective of the ambient pH, the secretion of alkaline phosphatase would be predominant; however, this is also not the case. Indeed, the level of *pacA*-encoded acid phosphatase secreted by the *pacC*¹⁴ mutant at pH 5.0 was comparable with that secreted by the *pacC*¹ strain when the temperature of the fungal culture was decreased from 37 °C to 22 °C (8). Moreover, the *pacC*¹⁴ mutation drastically reduced the mannose and *N*-acetylglucosamine content of the *pacA*-encoded acid phosphatase that was secreted at pH 5.0. In addition, the *pacA*-encoded acid phosphatase secreted by the *pacC*¹⁴ mutant strain was not observed by staining for this enzyme in cultures grown at the restrictive temperature of 37 °C. Thus, it seems that one of the PacC-dependent metabolic responses to pH signaling in both *N. crassa* and *A. nidulans* is not transcriptional regulation of phosphatases, but rather the pH-dependent multistep glycosylation of secreted Pi-repressible phosphatases.

Is Proteolysis of the Transcription Regulator PacC Imperative for Its Function?

The molecular characterization of the *pal/pacC* genes of *A. nidulans* helped to improve the understanding of ambient pH


FIG 1

Predicted PacC proteins: PacC²², PacC²³, PacC²², and PacC²⁷. Predicted DNA-binding domains in the proteins are indicated by red arrows. The predicted binding site residues in the PacC²² and PacC²⁷ proteins are indicated by the amino acid residue numbers, which were determined based on protein sequence. Predictions were generated using the I-TASSER server (30–32). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

secreted Pi-repressible acid phosphatase, for example, should be identical in all *pal* mutants and wild-type strain. However, this is not the case, as indicated by the molecular mass, electrophoretic mobility, chromatographic behavior, thermostability, kinetic properties, and glycosylation of the acid phosphatases that are secreted by the *palA1*, *palB7*, *palC4*, and *palF15* mutant strains (27–29). We hypothesized that each of the *pal* genes perform specific functions in the activation of PacC including, in addition to proteolysis, other post-translational modifications, such as glycosylation. It is worth noting that a large number of enzymatic steps are necessary to accomplish the full glycosylation needed to secrete Pi-repressible phosphatases in the native form. Incomplete post-translational modifications may change the affinity of enzymes involved in tagging PacC, which probably occurred with the truncated PacC14 protein, that is, PacC14 affinity for the PacC-binding sites has probably been changed (Fig. 1). It is likely that the alterations in steady-state kinetic properties, temperature sensitivity, and electrophoretic mobility reflect structural changes in the enzyme molecule synthesized by the *pal* and *pacC* mutant strains. For example, the acid phosphatase secreted by the *palB*¹ strain at pH 6.5 showed hydrolytic activity over *p*-nitrophenyl phosphate (PNP-P) with negative cooperativity, whereas the enzyme secreted by the *palB7* mutant showed Michaelian behavior (23). This difference could explain the approximately twofold increase in the enzyme activity secreted by the *palB7* strain, as shown by colony staining or enzymatic hydrolysis of PNP-P. This occurs because enzymes showing Michaelian

behavior hydrolyze substrate faster than isoenzymes showing negative cooperativity, assuming that substrate concentrations are equivalent (23). The *pacC*¹⁴ mutant should poorly secrete the Pi-repressible acid phosphatase, as irrespective of the ambient pH, the secretion of alkaline phosphatase would be predominant; however, this is also not the case. Indeed, the level of *pacA*-encoded acid phosphatase secreted by the *pacC*¹⁴ mutant at pH 5.0 was comparable with that secreted by the *pacC*¹ strain when the temperature of the fungal culture was decreased from 37 °C to 22 °C (8). Moreover, the *pacC*¹⁴ mutation drastically reduced the mannose and *N*-acetylglucosamine content of the *pacA*-encoded acid phosphatase that was secreted at pH 5.0. In addition, the *pacA*-encoded acid phosphatase secreted by the *pacC*¹⁴ mutant strain was not observed by staining for this enzyme in cultures grown at the restrictive temperature of 37 °C. Thus, it seems that one of the PacC-dependent metabolic responses to pH signaling in both *N. crassa* and *A. nidulans* is not transcriptional regulation of phosphatases, but rather the pH-dependent multistep glycosylation of secreted Pi-repressible phosphatases.

Is Proteolysis of the Transcription Regulator PacC Imperative for Its Function?

The molecular characterization of the *pal/pacC* genes of *A. nidulans* helped to improve the understanding of ambient pH



We hypothesized that putative *pal*-dependent PacC post-translational modifications are determinants for the conversion of PacC to its functional form, irrespective of ambient pH, in which the active PacC protein should carry the post-translational modification promoted by the *pal*-signaling cascade. Putative candidate post-translational modifications predicted by sequence analysis of PacC⁷² include phosphorylation, glycosylation, sumoylation, palmitoylation, and/or acetylation of PacC⁷². Interestingly, phosphorylation is important for the nuclear localization of RIM101 transcription factor (an ortholog of PacC) in *Saccharomyces cerevisiae*. When the cyclin-dependent kinase Pho85 (an ortholog of PGOV in *N. crassa*) is functional, RIM101 localizes in the cytoplasm, a physiological condition in which Pi is abundant. When functional Pho85 is absent, RIM101 accumulates in the nucleus (25,36). It has been reported that the full-length form of RIM101 could localize in the nucleus as well and bind DNA (37). Also interesting are the observations that a mammalian PalB homolog shows preferential nuclear localization when expressed in COS cells (28,38,39), suggesting that PalB has specific functions in the processing of transcription factors, as does its homolog Rim13p in *S. cerevisiae* (40,41). PacC is also phosphorylated in *A. nidulans*; however, in this case, it was speculated that phosphorylation leads to recruitment of the proteasome machinery (17). Moreover, even in the presence of the *pal* signal, a fraction of the full-length form of PacC is localized in the nucleus at both acidic and alkaline pH (42).

Transcription of the *pacC* gene is also modulated in response to nutrient changes, phosphate and carbon availability, and alternative splicing of the *palB* gene, which showed variant mRNA splicing patterns in response to changes in growth conditions (43–45). The *palB* pre-RNA was spliced in strains cultured in minimal medium, regardless of extracellular pH and Pi changes, whereas it was apparently not spliced in yeast extract (YE) cultures, except when grown in low Pi at pH 5.0. Interestingly, the intronic regions I and III of *palB* pre-RNA were spliced concomitantly, resulting in a predicted inactive PalB protein when introns I and/or III were not spliced. Thus, we presumed that PalB is inactive in YE cultures at pH 8.0, an experimental condition in which PacC is active, suggesting that PacC protein is potentially activated through an alternative metabolic pathway to PalB proteolysis (Fig. 2). Thus, it remains possible that a full-length version of PacC is functional (8,43). Accumulation of higher levels of *pacC* transcripts in low-Pi YE cultures at pH 8.0 may be correlated with the absence of spliced forms of the *palB*¹ allele. Furthermore, transcription of *pacC* is downregulated in *palB*¹ and *palB* strains grown in high- or low-Pi cultures, respectively. Downregulation of *pacC* in a *palB* background probably occurs because the protease PalB is inactive. Moreover, transcription of Pi-repressible phosphatases is modulated by Pi and pH and, consequently, depends on both PalcA and PacC transcription factors. This finding suggests the occurrence of crosstalk between the pH- and Pi-regulatory circuits, implying synergy between the regulators PalcA and PacC. Thus, the transcription regulator PacC may be functional in both acidic and alkaline

line ambient pH, in the full-length or proteolyzed form, if it carries in either case the *pal*-dependent molecular tag. If it is demonstrated that the full-length version is the only active molecular form of PacC, the implication will be that the proteolysis event regulates PacC turnover.

Acknowledgements

This work was supported by research grants from the Brazilian funding agencies FAPESP (Grant No. 2008/58634-7 and Postdoctoral position No. 2012/03689-7), CNPq, CAPES, and FAPPA. The authors thank C. A. Vieira and S. H. Castrechini for technical assistance.

References

- Li, X., Wang, X., and Snyder, M. (2012) Systematic investigation of protein-small molecule interactions. *IUBMB Life* 65, 2–8.
- Nahas, E., Terenzi, H. F., and Rossi, A. (1982) Effect of carbon source and pH on the production and secretion of acid-phosphatase (EC3.1.3.2) and alkaline-phosphatase (EC3.1.3.1) in *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microbiol.* 128, 2017–2021.
- Caddick, M. X., Brownlee, A. G., and Arst, H. N. (1986) Regulation of gene-expression by pH of the growth-medium in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* 203, 346–353.
- Tilburn, J., Sarkar, S., Widdick, D. A., Espeso, E. A., Orejas, M., et al. (1995) The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. *EMBO J.* 14, 779–790.
- Li, M. C., Martin, S. J., Bruno, V. M., Mitchell, A. P., and Davis, D. A. (2004) *Candida albicans* Rim13p, a protease required for Rim101p processing at acidic and alkaline pHs. *Eukaryot. Cell* 3, 741–751.
- Ferreira-Nowara, M. S., Silveira, H. C. S., Ono, C. J., Fachin, A. L., Rossi, A., et al. (2006) The pH signaling transcription factor PacC mediates the growth of *Trichophyton rubrum* on human nail in vitro. *Med. Mycol.* 44, 641–646.
- Martinez-Rossi, N. M., Persinoti, G. F., Peres, N. T. A., and Rossi, A. (2012) Role of pH in the pathogenesis of dermatophytoses. *Mycoses* 55, 381–387.
- Nowara, S. R., Ferreira-Nowara, M. S., Martinez-Rossi, N. M., and Rossi, A. (2003) The pH-induced glycosylation of secreted phosphatases is mediated in *Aspergillus nidulans* by the regulatory gene *pacC*-dependent pathway. *Fungal Genet. Biol.* 39, 286–295.
- Eisenle, M., Oberegger, H., Buttlinger, R., Illmer, P., and Haas, H. (2004) Biosynthesis and uptake of siderophores is controlled by the PacC-mediated ambient-pH regulatory system in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell* 3, 561–563.
- Wang, Q., and Szaniszto, P. J. (2008) Roles of the pH signaling transcription factor PacC in *Wangiella (Exophiala) dermatitidis*. *Fungal Genet. Biol.* 46, 657–666.
- Silveira, H. C. S., Gras, D. E., Cazzaniga, R. A., Sanches, P. R., Rossi, A., et al. (2010) Transcriptional profiling reveals genes in the human pathogen *Trichophyton rubrum* that are expressed in response to pH signaling. *Microb. Pathog.* 48, 91–96.
- Trushina, N., Levin, M., Mukherjee, P. K., and Horwitz, B. A. (2013) PacC and pH-dependent transcriptome of the mycotrophic fungus *Trichoderma virens*. *BMC Genomics* 14, 138.
- Orejas, M., Espeso, E. A., Tilburn, J., Sarkar, S., Arst, H. N., et al. (1995) Activation of the *Aspergillus* PacC transcription factor in response to alkaline ambient pH requires proteolysis of the carboxy-terminal moiety. *Genes Dev.* 9, 1622–1632.
- Meccheroni, W., Jr., May, G. S., Martinez-Rossi, N. M., and Rossi, A. (1997) The sequence of *palF*, an environmental pH response gene in *Aspergillus nidulans*. *Gene* 194, 163–167.
- Calcagno-Pizarelli, A. M., Negrete-Urtasun, S., Denison, S. H., Rudnicka, J. D., Bussink, H. J., et al. (2007) Establishment of the ambient pH signaling