Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Programa de Pós Graduação em Genética

Análise do perfil transcricional do dermatófito *Trichophyton rubrum* durante a interação com o agente inibidor acriflavina

Gabriela Felix Persinoti

Ribeirão Preto

2012

GABRIELA FELIX PERSINOTI

Análise do perfil transcricional do dermatófito *Trichophyton rubrum* durante a interação com o agente inibidor acriflavina

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Genética

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Nilce Maria Martinez-Rossi

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Zorzetto Nicoliello Vêncio

Ribeirão Preto

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Persinoti, Gabriela Felix

Análise do perfil transcricional do dermatófito *Trichophyton rubrum* durante a interação com o agente inibidor acriflavina. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

p. 114 : il. ; 30cm

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

Orientadora: Profa. Dra. Nilce M. Martinez-Rossi

1. *Trichophyton rubrum*.
2. Acriflavina.
3. RNA-seq.
4. Fatores de virulência

Dedico

Ao meu filho, Heitor

Ao meu esposo, Leonardo e

Aos meus pais, Carmen e Antônio

Amo vocês!

Agradecimentos

Agradeço, especialmente, à Prof^a. Dr^a. Nilce M. Martinez-Rossi pela oportunidade de integração ao seu grupo, por todo o apoio, respeito, confiança e incentivo durante a realização deste projeto. Muito obrigada pela sua orientação e dedicação a minha formação profissional!

Ao Prof. Dr. Ricardo N. Z. Vêncio pela orientação, pelas discussões e por todo o apoio e incentivo oferecido durante o desenvolvimento deste projeto.

Ao Prof. Dr. Antonio Rossi pela oportunidade de trabalhar em seu grupo, pelas discussões, sugestões e colaborações realizadas.

À PhD Cristina Cuomo por me receber em seu laboratório no Broad Institute, ao PhD Diego Martinez e ao PhD Chris Desjardins, pelo apoio na realização de algumas análises de Bioinformática.

Agradeço a disposição dos membros da banca examinadora para avaliar e discutir o presente projeto.

Agradeço ao Departamento de Genética e à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pela estrutura oferecida para minha formação na pós-graduação.

Agradeço à FAPESP pela bolsa de Doutorado oferecida para a realização deste projeto e todo o suporte financeiro.

Ao CNPq, CAPES e FAEPA pelo apoio financeiro dado ao projeto.

À Dra. Nalu Teixeira de Aguiar Peres, grande amiga e colega de laboratório, por suas contribuições com discussões, experimentos e sempre dando apoio e incentivo para a finalização deste trabalho. Obrigada Ná!

Aos colegas do Laboratório de Genética e Biologia Molecular de Fungos Elza Akie Sakamoto Lang, Hemelin Ludmila dos Santos, Jeny Cursino-Santos, Larissa Gomes da Silva, Maíra Martins Pompeu, Nalu Teixeira de Aguiar Peres, Pablo Rodrigo Sanches e Rodrigo Cazzaniga, Tiago Rinaldi Jacob, pelo apoio, convívio e colaborações durante esses anos.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Fungos Aline Helena da Silva Cruz, Glaucete Trevisan, Nígea Silva Mendes, Patrícia Martins e Rodrigo da Silva Santos, pela convivência e colaborações.

Aos técnicos do Laboratório de Genética e Biologia Molecular de Micro-organismos, Mendelson Mazucato, Marcos Martins e Vanderci Massaro de Oliveira por todo o auxílio técnico, no preparo de materiais, nos experimentos, sequenciamento, extrações de DNA, e pela amizade!

Às secretárias do departamento Susie, Maria Aparecida, Silvia, Ana Cláudia e ao Gustavo pela atenção e pelos auxílios prestados.

Ao meu esposo, Leonardo e ao meu filho Heitor, por todo o amor, carinho, apoio, compreensão, incentivo, cobrança, e companherismos, sem vocês nada teria sentido!

Agradeço aos meus pais, Carmen e Antônio pela educação, pelos ensinamentos, por todo seu esforço e por todo o apoio, compreensão, que me deram e dão sempre.

Agradeço ao meu irmão Luiz Fernando, pela amizade, pelo apoio, por ser um ótimo irmão.

Agradeço aos meus avôs vó Lina e vô Álvaro por todo o apoio, incentivo, e por tudo que já fizeram por mim.

A toda a minha família que sempre apoiou minhas decisões e sempre se manteve ao meu lado em todos os momentos.

Agradeço à Lúcia e ao Renato, por todo o apoio nos momentos de dificuldade, incentivo e amizade.

Em fim, agradeço a todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, colaboraram com a realização deste projeto. Meu muito obrigado!

Apoio e Suporte Financeiro

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

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP
(Proc.: nº 2009/08403-1).

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência – FAEPA.

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP.

Normalização Adotada

Este documento foi elaborado de acordo com:

Referências: Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) – NBR 6023

Universidade de São Paulo. Sistema Integrado de Bibliotecas. Diretrizes para apresentações de dissertações e teses da USP: documento eletrônico e impresso. São Paulo, 2004.

RESUMO

Persinoti, G. F. **Análise do perfil transcricional do dermatófito *Trichophyton rubrum* durante a interação com o agente inibidor acriflavina.** Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

O dermatófito *Trichophyton rubrum* é um fungo filamentosso, antropofílico que infecta preferencialmente tecidos queratinizados, e é o agente etiológico mais frequentemente isolado em casos de dermatofitoses humanas. Recentemente, este fungo tornou-se a causa de infecções profundas e generalizadas em pacientes imunocomprometidos. As estratégias terapêuticas para controlar esse tipo de infecção apresentam várias limitações, como o aparecimento de linhagens resistentes e o número restrito de alvos celulares disponíveis. Novas estratégias terapêuticas são necessárias, sendo o foco de muitas investigações. Acriflavina é uma droga citotóxica com atividade antifúngica envolvida na inibição da topoisomerase. Embora seja um composto intercalante de DNA, já foi relatada a super expressão de genes que codificam enzimas envolvidas no transporte de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial e no transporte de ferro em resposta a esta droga, sugerindo um amplo espectro de efeitos celulares. A fim de melhor compreender seus efeitos moleculares, o objetivo deste trabalho foi avaliar o transcriptoma de *T. rubrum* em resposta a acriflavina. Os perfis transcricionais em resposta a esta droga foram analisados utilizando a metodologia de RNA-seq empregando o sequenciamento em larga escala SOLiD System. Foram comparadas quatro bibliotecas sendo uma o cultivo de *T. rubrum* em meio Sabouraud e três períodos de exposição à droga: 3 horas, 12 horas e 24 horas. Foram geradas aproximadamente 200 milhões de *reads*, as quais foram filtradas e alinhadas no genoma de *T. rubrum* disponível no *Dermatophyte Comparative Database* – Broad Institute utilizando os algoritmos *Bowtie* e *Tophat*. As *reads* alinhadas foram processadas utilizando os algoritmos *Cufflinks* e *Cuffdiff* para estimar a abundancia dos transcritos e testar os genes diferencialmente expressos entre o controle e as condições de exposição à droga. Foram identificados 3.153 genes diferencialmente expressos. Após o estabelecimento de critérios mais estridentes, foram selecionados 490 genes diferencialmente expressos em resposta à droga. Estes genes estão relacionados a vários processos celulares como reações de oxidação e redução, transporte transmembrana, transporte de íons e metais e a patogenicidade. Os genes envolvidos com patogenicidade foram reprimidos, sugerindo que a droga interfira com processos importantes para instalação e manutenção da infecção no hospedeiro. Outros fatores de virulência como genes envolvidos no ciclo do glioxilato, também foram reprimidos pela droga. Além disso, genes da via de biossíntese do ergosterol foram reprimidos pela droga, o que constitui um provável novo mecanismo de ação de acriflavina. Os resultados obtidos nesta análise em larga escala contribuem com a elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos na adaptação ao estresse em dermatófitos e podem auxiliar o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas. Além disso, estes resultados contribuem com a anotação do genoma e transcriptoma de *T. rubrum* e outros dermatófitos.

Palavras-chave: *Trichophyton rubrum*, Acriflavina, RNA-seq, Fatores de Virulência.

ABSTRACT

Persinoti, G. F. **Transcriptional Profile of the Dermatophyte *Trichophyton rubrum* in Response to the inhibitor agent Acriflavine.** PhD (Thesis) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

The dermatophyte *Trichophyton rubrum* is an anthropophilic filamentous fungus that infects keratinized tissues and is the most common etiologic agent isolated in cases of human dermatophytoses. Recently, it has become the cause of deep and widespread infections in immunocompromised patients. Therapeutic strategies to control these infections have several limitations, such as the appearance of resistant strains and the limited number of antifungal cellular targets. New therapeutic strategies are necessary, being the focus of many investigations. Acriflavine is a cytotoxic drug with antifungal activity involved in topoisomerase inhibition. Although it presents DNA intercalating properties, it has already been reported the over-expression of genes coding for enzymes involved in mitochondrial respiratory-electron transport and in iron transport in response to this drug, suggesting a broad spectra of cellular effects. In order to better understand its molecular effects we evaluated *T. rubrum* transcriptome in response to acriflavine in a time-course assay using the next generation sequencing technology SOLiD System. RNA-seq was performed comparing *T. rubrum* growth in Sabouraud medium as the control and the three periods of drug exposure, 3h, 12h, and 24h. RNA-seq generated approximately 200 million short reads that were mapped to the Broad Institute's Dermatophyte Comparative Database using Bowtie and TopHat algorithms. Differential gene expression analysis was performed using Cufflinks and Cuffdiff. It was identified 3,153 differentially expressed genes. A more stringent cut-off threshold was established and this analysis revealed a subset of 490 genes modulated in response to the stress caused by exposure of *T. rubrum* to acriflavine. These genes are involved in various cellular processes such as oxidation-reduction reactions, transmembrane transport, metal ion binding, and pathogenicity. The genes involved in pathogenicity were down-regulated, suggesting that this drug interferes with virulence factors that allow the development of infection and persistence of the dermatophyte in the host. Other virulence factors such as genes involved in the glyoxylate cycle were also repressed by the drug. Moreover, genes involved in ergosterol biosynthesis pathway were down-regulated by the drug and may constitute a new mechanism of action of acriflavine. The results obtained in this large scale analysis provide insights into the molecular mechanisms underlying the responses of *T. rubrum* to stress conditions and may aid the development of new antifungal drugs. Furthermore, these results contribute to improve gene annotation and open reading frame prediction for *T. rubrum* and other dermatophyte genomes and transcriptomes.

Keywords: *Trichophyton rubrum*, Acriflavine, RNA-seq, Virulence factors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química da acriflavina.	21
Figura 2: Esquema representativo da metodologia utilizada pelo Sistema SOLiD (Adaptado do Manual SOLiD System 3).	39
Figura 3: Eletroforese do gel de agarose das amostras de RNA extraídas em diferentes condições da linhagem CBS118893. E: Experimentos independentes.	50
Figura 4: Eletroforese em gel de agarose das amostras de RNA após a preparação dos pools utilizados para o sequenciamento.	51
Figura 5: Distribuição da cobertura de reads de cada uma das condições analisadas ao longo de um fragmento do genoma de <i>T. rubrum</i> , o supercontig 1. Cada barra vertical representa a frequência de reads plotadas contra as coordenadas do genoma.	55
Figura 6: Gráficos Volcano plot das condições analisadas.	57
Figura 7: Diagrama de Venn mostrando a distribuição dos 490 genes modulados em resposta a acriflavina nas diferentes condições analisadas. <i>T. rubrum</i> foi exposto à acriflavina por 3 horas, 12 horas e 24 horas, comparado com o controle (0 hora).	58
Figura 8: Genes modulados em resposta a acriflavina na via de biossíntese de esteróis.	69
Figura 9: PCR em tempo Real de genes relacionados à patogenicidade.	72
Figura 10: Esquema do ciclo do glicoxilato e ciclo do ácido tricarboxílico. Em tracejado estão destacados os passos do ciclo do glicoxilato, específico para micro-organismos e plantas. Destacados em vermelho genes induzidos, em verde genes reprimidos em resposta a acriflavina. Adaptado de (Lorenz e Fink, 2002).	73
Figura 11: PCR em Tempo Real de genes relacionados ao ciclo do glicoxilato.	75
Figura 12: PCR em Tempo Real de genes relacionados à biossíntese de ergosterol e a ativação de acriflavina.	77
Figura 13: Perfil de expressão de genes altamente induzidos em resposta à acriflavina em 3 horas quando comparados com as demais drogas. ACR: acriflavina, AMB: anfotericina B, KTC: cetoconazol, TRB: terbinafina.	78
Figura 13: RT-PCR de possíveis transcritos intergênicos. M: Marcador de massa molecular 1Kb plus. gDNA: DNA genômico.	80
Figura 14: Alinhamento entre a sequência representando o TAR CUFF.32441(isoforma 1) e o genoma de <i>T. rubrum</i>	82
Figura 15: Alinhamentos entre a sequência representando o TAR CUFF.32441 (isoforma 2) e o genoma de <i>T. rubrum</i>	82
Figura 16: Alinhamento entre a sequência representando o TAR CUFF.16909 (isoforma 1) e o genoma de <i>T. rubrum</i>	84
Figura 17: Alinhamento entre a sequência representando o TAR CUFF.16909 CUFF.16909 (isoforma 2) e o genoma de <i>T. rubrum</i>	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Constituintes do meio RPMI-1640.....	33
Tabela 2: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para o PCR em tempo real.	42
Tabela 3: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados no RT-PCR.....	44
Tabela 4: Concentração Inibitória Mínima da droga acriflavina para T. rubrum.	49
Tabela 5: Quantificação das amostras de RNAs extraídas da linhagem CBS118892 após cultivo na presença e ausência de acriflavina.	50
Tabela 6: Re-quantificação das amostras de RNA após a preparação dos pools.	51
Tabela 7: Análise primária resultante do sequenciamento.	52
Tabela 8: Alinhamento das sequências com o genoma de T. rubrum.	53
Tabela 9: Genes modulados em resposta a acriflavina.....	56
Tabela 10: Genes que codificam Transportadores ABC, MDR e MSF modulados em resposta à acriflavina.....	63
Tabela 11: Genes modulados em resposta à acriflavina da família citocromo P450.	65
Tabela 12: Genes envolvidos com o transporte de ferro e zinco modulados em resposta à acriflavina.....	65
Tabela 13: Genes envolvidos com a patogenicidade.....	66
Tabela 14: Comparação da expressão gênica obtida por RNA-seq e qPCR.	70
Tabela 15: Genes altamente induzidos em resposta à acriflavina em 3 horas.	78
Tabela 16: Regiões transcricionalmente ativas geradas na montagem de novo do transcriptoma de T. rubrum.	79

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Categorização funcional de acordo com o Gene Ontology dos genes modulados em resposta à acriflavina no tempo de 3 horas. As categorias funcionais super-representadas são apresentadas. Barras vermelhas e verdes representam, respectivamente, o número de genes induzidos e reprimidos em cada categoria.	59
Gráfico 2: Categorização funcional de acordo com o Gene Ontology dos genes modulados em resposta à acriflavina no tempo de 12 horas. As categorias funcionais super-representadas são apresentadas. Barras vermelhas e verdes representam, respectivamente, o número de genes induzidos e reprimidos em cada categoria.	60
Gráfico 3: Categorização funcional de acordo com o Gene Ontology dos genes modulados em resposta à acriflavina no tempo de 24 horas. As categorias funcionais super-representadas são apresentadas. Barras vermelhas e verdes representam, respectivamente, o número de genes induzidos e reprimidos em cada categoria.	61
Gráfico 4: Genes modulados em resposta à acriflavina envolvidos no metabolismo de carboidratos...	67
Gráfico 5: Genes modulados envolvidos no metabolismo de aminoácidos.....	68
Gráfico 6: Genes modulados em resposta à acriflavina envolvidos no processamento da informação genética.	Erro! Indicador não definido.

SUMÁRIO

1 Introdução	16
1.1 <i>Trichophyton rubrum</i>	17
1.2 Drogas antifúngicas	19
1.3 Expressão gênica e mecanismos moleculares envolvidos na resposta e na resistência a antifúngicos.....	22
2 Hipótese do Trabalho	27
3 Objetivos.....	29
3.1 Objetivos específicos.....	29
4 Materiais e Métodos	31
4.1 Linhagens	31
4.1.1 Linhagem de <i>Trichophyton rubrum</i>	31
4.1.2 Cepa de <i>Escherichia coli</i>	31
4.2 Manutenção e Estoque das Linhagens.....	31
4.2.1 Linhagem de <i>Trichophyton rubrum</i>	31
4.2.2 Cepa de <i>E. coli</i>	31
4.3 Meios de Cultura	32
4.3.1 Meio Extrato de Malte – MEA (<i>Malt Extract Agar</i>) (Atlas, 1993).....	32
4.3.2 Meio Sabouraud modificado (Atlas, 1993)	32
4.3.3 Meio de Luria e Bertani – LB (Sambrook J, 1989).....	32
4.3.4 Meio RPMI-1640.....	33
4.4 Soluções.....	34
4.4.1 Solução estoque de acriflavina (Sigma)	34
4.4.2 Solução de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosídeo) (Sambrook J, 1989)	34
4.4.3 Solução de IPTG (Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo) (Sambrook J, 1989)	34
4.4.4 Água livre de RNase (Sambrook J, 1989)	34
4.4.5 Tampão de corrida MOPS 5X	34
4.4.6 Gel para RNA (Sambrook J, 1989)	35
4.4.7 Tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) (Sambrook J, 1989).....	35
4.4.8 Tampão TE (Tris-EDTA) (Sambrook J, 1989)	35
4.5 Suspensão de conídios.....	35
4.6 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	36
4.7 Condições de cultivo para análises de expressão gênica.....	36
4.8 Extração de RNA total.....	36
4.9 Transcritômica quantitativa (RNA-seq)	37
4.9.1 Construção das bibliotecas	37

4.9.2 Sequenciamento em larga escala	38
4.10 Análise do transcrito de <i>T. rubrum</i> em resposta a acriflavina	40
4.11 Confirmação das análises transcricionais por PCR em Tempo Real	41
4.11.1 Síntese de cDNA	41
4.11.2 PCR em tempo real.....	41
4.12 RT-PCR	44
4.13 Purificação e clonagem dos fragmentos	45
4.14 Transformação bacteriana.....	45
4.14.1 Preparo das células competentes	45
4.14.2 Transformação por choque térmico.....	45
4.15 Extração de DNA plasmidial	46
4.16 Sequenciamento.....	46
4.17 Análise das sequências intergênicas	46
5 Resultados e Discussão	49
5.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima	49
5.2 Preparo das amostras para sequenciamento.....	49
5.3 Sequenciamento do Transcritoma de <i>T. rubrum</i>	52
5.4 Mapeamento das sequências no genoma de <i>T. rubrum</i>	52
5.5 Distribuição da cobertura das sequências.....	54
5.6 Análise transcricional de <i>T. rubrum</i> em resposta à acriflavina	56
5.7 Categorização funcional dos genes diferencialmente expressos	58
5.7.1 Genes relacionados ao transporte transmembrana.....	62
5.7.2 Genes relacionados à citocromo P450.....	64
5.7.3 Genes relacionados ao transporte de metais	65
5.7.4 Genes relacionados à patogenicidade	66
5.8 Análise das vias metabólicas afetadas pelo tratamento com acriflavina.....	66
5.9 Validação por PCR em Tempo Real.....	69
5.10 Análise comparativa entre várias drogas	77
5.11 Análise estrutural do transcrito.....	79
6 Conclusões	87
7 Referências Bibliográficas	89
Anexos.....	101
Anexo de Publicação	

Introdução

1 Introdução

Os fungos são organismos eucariotos que apresentam grande diversidade biológica tanto do ponto de vista morfológico quanto fisiológico. São organismos heterotróficos, uni ou pluricelulares que podem se reproduzir tanto de forma assexuada quanto sexuada. São classificados em um reino próprio por diferir dos demais organismos e apresentam uma variedade de estilos de vidas, podendo ser saprófitas, comensais, simbiontes ou parasitas. Estes organismos têm grande importância ambiental atuando na decomposição de matéria orgânica, econômica e biotecnológica, sendo utilizados como alimentos, em processos de fermentação e produção de substâncias de interesse como, por exemplo, antibióticos. Além disso, algumas espécies patogênicas causam infecções em humanos, animais e plantas, ocasionando perdas econômicas na agricultura e na produção animal, além de afetar a saúde humana diminuindo a qualidade de vida desses pacientes.

Nas últimas décadas o número de infecções fúngicas tem aumentado cada vez mais. No início do século XX a principal causa de mortalidade humana eram as doenças infecciosas. Sua incidência começou a diminuir com o melhoramento das condições sanitárias, desenvolvimento de vacinas e descobrimento de agentes antimicrobianos. Porém, com o aumento do número de pacientes imunocomprometidos, seja pelo surgimento da AIDS, o aumento da frequência de transplantes de órgãos ou pelo uso de agentes que suprimem o sistema imunológico, a incidência de infecções vem novamente aumentando. Alguns fungos que normalmente causam infecções superficiais ou são saprófitas, se tornaram invasivos atingindo tecidos e órgãos, caracterizando-se como agentes oportunistas (Sganga, 2011).

Os dermatófitos constituem um grupo de fungos filamentosos capazes de invadir e colonizar tecidos queratinizados em humanos e animais, causando infecções denominadas dermatofitoses (Grumbt et al., 2011). São organismos queratinofílicos, ou seja, são capazes de utilizar a queratina presente no estrato córneo como fonte de nutrientes (carbono, nitrogênio e enxofre), devido a sua capacidade de secretar uma ampla gama de enzimas proteolíticas, como proteases e queratinases. Os dermatófitos são classificados em três gêneros *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton* de acordo com a formação morfológica de seus conídios, ou seja, as estruturas de reprodução assexuada. Esses organismos são divididos em espécies geofílicas, zoofílicas e antropofílicas, dependendo se seu habitat primário, solo, animais ou homem, respectivamente (Weitzman e Summerbell, 1995). As espécies zoofílicas eventualmente causam infecções no homem, sendo responsáveis por cerca de 30% destas

infecções, e geralmente provocam uma inflamação aguda, enquanto as espécies antropofílicas são os agentes responsáveis por 70% das infecções humanas, causando infecções crônicas e de progressão lenta. Até o momento, cerca de 30 espécies de dermatófitos já foram identificadas como patógenos humanos (White et al., 2008).

As dermatofitoses acometem tanto indivíduos imunocompetentes quanto imunodeprimidos atingindo tecidos queratinizados, como pele, pêlos, cabelos e unhas e recebem o nome de *tineas* seguido do nome da região corpórea onde a infecção está instalada, como por exemplo, *tinea unguium* (unhas), *tinea capitis* (cabelo), *tinea pedis* (pele dos pés), *tinea manum* (mãos), *tinea cruris* (virilha), sendo que as infecções que acometem as unhas podem também ser denominadas de onicomicoses. Estas infecções podem ser transmitidas diretamente por meio de contato físico entre as pessoas ou animais, ou indiretamente por fômites contaminados (Weitzman e Summerbell, 1995). As manifestações clínicas destas infecções podem ser diversas dependendo da virulência da espécie infectante, do sítio anatômico envolvido e do estado imunológico do hospedeiro. As infecções podem ser assintomáticas, severas, leves ou crônicas, ocasionando normalmente manchas na pele e deformações nas unhas (White et al., 2008). Porém, em alguns casos, estas infecções podem evoluir para infecções invasivas em indivíduos imunocomprometidos (Dan et al., 2011).

As micoses cutâneas constituem o grupo de infecções fúngicas mais frequentes e sua incidência vem aumentando consideravelmente nos últimos anos, acometendo a população em geral, desde crianças a idosos, além de indivíduos imunocomprometidos (Rodwell et al., 2008; Peres et al., 2010a). Estima-se que entre 20 e 25% da população mundial seja afetada por essas infecções (Marques et al., 2000; Ameen, 2010), sendo a espécie *Trichophyton rubrum* o agente etiológico responsável pela maioria dos casos de *tinea unguium*, *tinea cruris*, *tinea corporis* e *tinea pedis*. No Brasil, *T. rubrum* é o agente responsável por aproximadamente 50% das dermatofitoses (Cordeiro et al., 2006), sendo considerado um problema de saúde pública. Estudos epidemiológicos, assim como os que visam compreender melhor os mecanismos moleculares destas infecções podem ajudar no estabelecimento de políticas de saúde pública para controlar a incidência destas infecções.

1.1 *Trichophyton rubrum*

O dermatófito *Trichophyton rubrum* é um fungo patogênico filamentoso, antropofílico, cosmopolita e é o agente etiológico isolado com mais frequência nos casos de dermatofitoses humanas (Vena et al., 2012). Atualmente, um fator agravante das

dermatofitoses é que em pacientes imunocomprometidos, *T. rubrum* pode atuar de maneira invasiva provocando infecções profundas e generalizadas, até mesmo com o surgimento de granulomas dermatofíticos (Marconi et al., 2010). Em alguns casos, *T. rubrum* pode provocar reações inflamatórias intensas, diminuindo a qualidade de vida dos pacientes infectados (Isa-Isa et al., 2010).

Para que *T. rubrum* possa causar infecções, primeiramente é necessário que este ultrapasse as barreiras imunológicas impostas pelo hospedeiro. Um mecanismo de defesa do hospedeiro contra micro-organismos que atingem tecidos superficiais é a queratinização, renovação constante do estrato córneo realizada pelos queratinócitos, que leva à sua descamação e pode fazer com que o patógeno seja removido do tecido epidérmico (Wagner e Sohnle, 1995). Dessa forma, o patógeno deve se aderir à superfície do tecido, para que possa ocorrer a germinação do artroconídio e a hifa penetrar rapidamente no estrato córneo (Kaufman et al., 2007). Para isso, é necessário que o patógeno altere a expressão de seus genes em resposta ao ambiente hospedeiro, como o pH da pele que é levemente ácido e aos compostos presentes no tecido. A expressão de adesinas, lipases, fosfatases, DNAses, proteases e queratinases que atuam sobre o estrato córneo, composto principalmente por queratina, é essencial para a adesão do fungo e obtenção de nutrientes necessários para sua sobrevivência, permitindo a invasão do tecido e disseminação da infecção (Peres et al., 2010b; Martinez-Rossi et al., 2012).

Apesar da importância clínica deste dermatófito, principalmente por sua alta incidência, pouco se sabe sobre a fiso-patologia das infecções causadas por ele, devido principalmente ao fato de não existirem modelos de infecção animal e das dificuldades em sua manipulação genética, pois este patógeno não apresenta ciclos sexual e parassexual descritos.

O projeto do genoma comparativo de dermatófitos, iniciativa do *Broad Institute* (MIT Harvard), realizou o sequenciamento do genoma de cinco espécies de dermatófitos, entre as quais está incluído o de *T. rubrum*. Além disso, foram sequenciados os genomas de *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton tonsurans* e *Trichophyton equinum* (Martinez et al., 2012). Uma iniciativa independente realizou o sequenciamento de outras duas espécies de dermatófitos, *Arthroderma benhamiae* e *Trichophyton verrucosum* (Burmaster et al., 2011). Estes dados estão atualmente disponíveis (Broad, 2010) e constituem uma importante ferramenta para as pesquisas relacionadas à dermatófitos. A estimativa do tamanho do genoma de *T. rubrum*, feita após a montagem das sequências, é de 22,5 MB, corroborando com a estimativa anterior de pelo menos 22 MB, utilizando a técnica de

eletrofose em campo pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*), a qual permitiu a identificação de cinco cromossomos (Cervelatti et al., 2004).

Os resultados do projeto genoma comparativo de dermatófitos demonstraram que um grupo de proteinases necessárias para a degradação de queratina é maior neste grupo de fungos do que em outras espécies (Achterman e White, 2012). Este e outros resultados representam grande avanço nesta área, pois fornecem uma comparação entre estes fungos e a possibilidade de realização de muitos outros estudos baseados no genoma, como o do presente trabalho, que visa revelar alvos moleculares para o desenvolvimento de novos antifúngicos que apresentem um amplo espectro de ação.

1.2 Drogas antifúngicas

No final do século dezenove, 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 e os ácidos benzóico, acetilsalicílico e undecanóico foram introduzidos na prática médica, como os primeiros antifúngicos orgânicos de uso tópico (Martinez-Rossi et al., 2008). Somente em 1958, a griseofulvina, o primeiro antifúngico oral de efeito sistêmico para tratamento de micoses superficiais, foi introduzido no mercado. A griseofulvina interfere com a função dos microtúbulos, desfazendo o fuso mitótico e consequentemente, inibindo a mitose.

O tratamento clínico de dermatofitoses normalmente é longo e oneroso, e devido ao fato de patógeno e hospedeiro serem organismos eucariotos, existe um número limitado de alvos celulares que são utilizados como alvo de drogas. Desta forma, muitos dos antifúngicos disponíveis no mercado atuam sobre o mesmo alvo celular, o ergosterol, principal componente da membrana celular fúngica, responsável por manter sua integridade e fluidez, ou nas enzimas envolvidas em sua biossíntese (Pena-Muralla, 2002).

As principais classes de antifúngicos utilizados na prática clínica são os polienos, azóis, alilaminas, pirimidinas e as equinocandinas. Os principais polienos utilizados no tratamento de infecções fúngicas são a nistatina e a anfotericina B. Estas moléculas se ligam ao ergosterol, o que leva à formação de poros na membrana plasmática e ao extravasamento do conteúdo citoplasmático, consequentemente levando à morte da célula. Um dos efeitos tóxicos do uso clínico da anfotericina B é a nefrotoxicidade. Porém, novas formulações que utilizam lipídeos complexados à anfotericina B estão sendo desenvolvidas e mostraram diminuição desse efeito colateral (Ostrosky-Zeichner et al., 2010).

Os antifúngicos da classe dos azóis incluem os imidazóis como o miconazol, tioconazol e cetoconazol que são utilizados apenas em formulações tópicas, e os triazóis itraconazol, fluconazol, posaconazol e voriconazol que são antifúngicos eficazes tanto em micoses superficiais quanto em micoses sistêmicas. Estas drogas atuam inibindo a enzima esterol 14- α -demetilase, do citocromo P450 do fungo, impedindo a síntese do ergosterol, levando à desestabilização da membrana celular devido à diminuição da quantidade de ergosterol e ao acúmulo de seu precursor, o lanosterol (Blyth, 2011). As formulações posaconazol e voriconazol apresentam maior espectro de ação e correspondem a avanços no desenvolvimento de novos azóis, com maior atividade contra as infecções fúngicas, sendo que novas formulações continuam sendo desenvolvidas (Ostrosky-Zeichner et al., 2010).

A terbinafina, antifúngico da classe das alilaminas, apresenta alta eficácia contra dermatófitos e é muito utilizada no tratamento de dermatofitoses, normalmente em conjunto com itraconazol. Esta droga atua bloqueando a síntese do ergosterol por meio da inibição da enzima esqualeno epoxidase, responsável pela conversão de esqualeno em lanosterol, apresentando 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).

As equinocandinas correspondem à mais recente classe de antifúngicos introduzida no mercado, e atualmente contam com três drogas disponíveis, caspofungina, anidulafungina e micafungina. Estas drogas interferem com a biossíntese da parede celular por meio da inibição da enzima (1,3)- β -D-glucano-sintetase, inibindo, portanto, a síntese de (1,3)- β -D-glucano, polissacarídeo que confere integridade à parede celular fúngica (Cowen e Steinbach, 2008).

Além do limitado número de alvos celulares, existem relatos do aparecimento de resistência dos patógenos a estes antifúngicos (Warnock et al., 1999; Meneau e Sanglard, 2005; Balci e Cetin, 2008; Martinez-Rossi et al., 2008). Portanto, a descoberta de novos alvos celulares e o desenvolvimento de novas drogas ou formulações com atividade antifúngica mais eficazes são essenciais para o controle destas infecções (Martinez-Rossi et al., 2004; Akins, 2005).

Um inibidor fúngico que aparentemente não atuaria na via de biossíntese do ergosterol é a acriflavina, cuja estrutura molecular é apresentada na Figura 1. O primeiro uso clínico de derivados de acridina como antibacteriano e antiparasitário ocorreu no início do século passado. A disponibilidade da penicilina na década de 1940 diminuiu o progresso no desenvolvimento de quimioterapia baseada em acridinas, apesar de suas propriedades biológicas. A descoberta das propriedades intercalantes das acridinas nas estruturas da dupla

hélice do DNA, na década de 1960, levou ao desenvolvimento de derivados de acridina para uso na quimioterapia de câncer (Wainwright, 2001; Belmont et al., 2007). Agentes intercalantes derivados de acridina, como a acriflavina contém anéis hidrofóbicos que podem se inserir entre os pares de bases na dupla hélice de ácidos nucleicos e inibir a ação da topoisomerase I e II (Hassan et al., 2011). Estes intercalantes parecem entrar livremente na célula e interferir em um grande número de processos como a replicação, tradução, recombinação, processamento do RNA (Seto e Tomasz, 1977) e formação do Z-DNA (Walker et al., 1985). Estes agentes podem causar morte celular, provavelmente devido à mutagenicidade ou outros efeitos tóxicos (Lee et al., 1996). O efeito mutagênico da acriflavina pode ser evidenciado pelo seu amplo uso para induzir mutações que levam à deficiência respiratória em micro-organismos, como o fenótipo *petite* em leveduras (Avers et al., 1965; Ferguson e Denny, 2007). A atividade mutagênica da acriflavina é resultado principalmente de mutações *frameshift* devido à inserção ou deleção de nucleotídeos na molécula de DNA (Funatsuki et al., 1997). Outros alvos biológicos para derivados de acridinas, como telômero/telomerase e integrases de retrovírus têm sido descritos (Mathe et al., 1998; Kelland, 2005; Belmont et al., 2007). Acriflavina apresenta propriedades antibacteriana, antifúngica e antiparasitária, porém seu uso como antiséptico tópico é limitado devido ao seu efeito tóxico (Wainwright, 2001).

Figura 1: Estrutura química da acriflavina.

Tendo em vista a necessidade de novas estratégias terapêuticas para controlar infecções fúngicas é fundamental compreender os mecanismos de adaptação ao estresse provocado por drogas, além dos mecanismos de resistência a essas drogas. A resistência a drogas vem se revelando uma questão importante em uma variedade de infecções causadas por fungos, com reflexos na saúde humana. Quando confrontados com drogas antifúngicas, alguns fungos patogênicos tem a capacidade de superar a sua ação inibitória por meio de diversos mecanismos. Essa resposta biológica reflete na seleção de linhagens resistentes a

antifúngicos tanto *in vitro* como *in vivo* (Capa et al., 1998; Miyamoto et al., 2002; Rocha et al., 2002). No contexto clínico, estes antifúngicos são utilizados para combater infecções, mas a exposição excessiva a esses agentes tem levado a seleção de isolados resistentes. O número crescente de infecções fúngicas em todo o mundo tem favorecido potencialmente a ocorrência deste fenômeno, pois o número de tratamentos tem aumentado. Inúmeros genes envolvidos na resistência já foram identificados em *Aspergillus nidulans* e outros fungos (Threlfall, 1968; Martinez-Rossi e Azevedo, 1989; Rocha et al., 2002). Além disto, muitos mecanismos de resistência a antifúngicos foram descritos em *Aspergillus*, *Trichophyton*, *Candida* e *Saccharomyces* (Martinez-Rossi et al., 2008).

Dentre os principais mecanismos que contribuem para o aparecimento do fenótipo de resistência às drogas estão a redução da captação ou o aumento do seu efluxo celular, modificação ou degradação da droga pela célula, mudanças na interação do composto com o seu sítio alvo ou ainda a interação com outras enzimas.

Mutações no gene *acrA* de *A. nidulans* foram descritas inicialmente como responsáveis pela resistência à acriflavina (Roper e Kafer, 1957). Posteriormente, verificou-se que esta mutação também era responsável pela resistência ao brometo de etídio (Scarazzatti et al., 1979) e ao tioconazol (Pereira et al., 1998), um antimicótico do grupo dos azóis que atua como inibidor da demetilação C-14 do lanosterol na via de biossíntese do ergosterol. O tioconazol e os derivados de acridina (acriflavina e brometo de etídio) não tem, aparentemente, os mesmos mecanismos de ação, por isto foi sugerido que o mecanismo de resistência a estas drogas, proporcionado pelo alelo *acriAI*, fosse a ocorrência de alterações na membrana celular (Pereira et al., 1998). Estas alterações podem interferir com a captação da droga, ou no seu efluxo.

1.3 Expressão gênica e mecanismos moleculares envolvidos na resposta e na resistência a antifúngicos

Durante a infecção de tecidos hospedeiros ou em resposta a diferentes estímulos ambientais como a exposição a drogas antifúngicas, os fungos modulam a expressão de seus genes, para que ocorra a ativação ou repressão de genes que permitam sua sobrevivência frente à diversidade de condições encontradas. Entretanto, os mecanismos envolvidos na regulação da expressão gênica em sua maioria, ainda não estão totalmente esclarecidos. Conhecer os genes que são expressos em determinadas condições, bem como seus níveis de expressão, fornecem informações importantes sobre processos celulares, auxiliando na

elucidação de sua função. A genômica funcional é uma ferramenta importante para o estudo de mecanismos moleculares envolvidos em diversos processos biológicos, inclusive na patogênese das doenças infecciosas, que podem direcionar a descoberta de novos alvos moleculares para o desenvolvimento de novas terapias (Kramer e Cohen, 2004). Dentre estas abordagens destacam-se os estudos de expressão gênica, que fornecem informações importantes.

Existem diversas técnicas para estimar a expressão diferencial de genes. Uma ferramenta muito útil neste tipo de estudo é a análise de bibliotecas de *ESTs* (*Expressed Sequence Tags*). Outras técnicas que podem ser utilizadas para analisar sequências gênicas expressas são *Suppressive Subtractive Hybridization* (SSH) (Diatchenko et al., 1996), *Serial Analyses of Gene Expression* (SAGE) (Velculescu et al., 1995) e Microarranjos de cDNA (*Microarrays*) (Schena et al., 1998). A utilização dessas técnicas tem contribuído para a análise global dos transcritos, entendimento da expressão diferencial, e caracterização da transcrição em células ou tecidos específicos ou em diferentes condições fisiológicas.

O sequenciamento e a categorização de 10.250 *ESTs* isoladas durante o desenvolvimento de *T. rubrum* revelaram genes envolvidos em diferentes processos celulares, permitindo um maior conhecimento sobre sua fisiologia, metabolismo celular, transdução de sinais, composição da parede celular, entre outros (Wang et al., 2006). O perfil de expressão gênica de *T. rubrum* submetido à ação de cetoconazol e anfotericina B foi analisado com o objetivo de aumentar o conhecimento sobre o mecanismo de ação destes antifúngicos e das respostas ao estresse provocado por eles (Yu et al., 2007). A exposição de *T. rubrum* a anfotericina B aumentou a transcrição de genes envolvidos no metabolismo de lipídios, ácidos graxos e esterol, transporte transmembrana e de genes relacionados com a resposta ao estresse, e provocou uma redução na transcrição de genes envolvidos na manutenção da integridade da parede celular e vias de transdução de sinais. Em resposta à exposição ao cetaconazol, houve uma indução da expressão de genes que codificam proteínas envolvidas no metabolismo de lipídios, ácidos graxos, incluindo genes da via de biossíntese do ergosterol e um transportador ABC em *T. rubrum* (Yu et al., 2007). O perfil transcricional de *T. rubrum* frente a diversas condições ambientais como variações no pH ambiente, fontes nutricionais e ao estresse causado pela exposição à drogas citotóxicas revelou a modulação de genes envolvidos nos processos adaptativos deste dermatófito (Peres et al., 2010b).

Com o objetivo de identificar genes relacionados à resistência ao fluconazol em isolados clínicos de *C. albicans* foram analisados os perfis transcricionais de isolados resistentes e susceptíveis a este antifúngico (Rogers e Barker, 2002). O gene *Erg2*, que

codifica a esterol isomerase envolvida na biosíntese de ergosterol teve sua expressão induzida no isolado resistente exposto à droga, assim como outros genes que até então não haviam sido associados com a resistência ao fluconazol. Entre eles estavam os genes CWH8 e GPI1, relacionados à manutenção da parede celular; IFD5, envolvido no transporte de ferro; e muitos outros pertencentes a processos metabólicos diversos como estresse celular, metabolismo de lipídios, aminoácidos e carboidratos (Rogers e Barker, 2002).

A resposta de *S. cerevisiae* frente a perturbações na via de síntese do ergosterol foi avaliada por meio da análise da expressão gênica após tratamento com uma série de agentes químicos (clotrimazol, cetoconazol, itraconazol voriconazol, terbinafina e amorolfina) (Bammert e Fostel, 2000). Estes perfis foram comparados aos perfis transcricionais de alguns mutantes com deleções em genes que codificam proteínas da via do ergosterol, revelando que o padrão de expressão gênica da linhagem tratada foi similar ao das linhagens com alterações gênicas no ponto de intervenção da droga na via de síntese do ergosterol (gene alvo). O mesmo foi relatado para *C. albicans* onde foram identificados genes diferencialmente expressos após tratamento com itraconazol, sendo que uma série deles pertence à via de síntese do ergosterol (alvo do itraconazol) (De Backer et al., 2001).

Hibridação subtrativa supressiva (Paião et al., 2007) e *Differential Display* RT-PCR (Segato et al., 2008) foram utilizadas para isolar transcritos super expressos durante a exposição de *T. rubrum* a acriflavina, fluconazol, griseofulvina, terbinafina e ácido undecanóico. Esses ensaios revelaram genes que codificam transportadores ABC e MFS, esterase, proteína de reparo do DNA, um retrotransposon e transportadores de elétrons da cadeia respiratória mitocondrial foram modulados em resposta a estas drogas, sugerindo novos efeitos e mecanismos de adaptação ao estresse celular. A ativação de transposons está associada à resposta ao estresse em plantas e *Drosophila melanogaster*, mas é inédita em dermatófitos e é também a primeira evidência da ativação de um transposon associada ao estresse provocado por inibidores fúngicos (Paião et al., 2007).

O recente desenvolvimento da técnica de RNA-seq, a qual, à princípio, emprega qualquer uma das novas tecnologias de sequenciamento em larga escala, é atualmente uma alternativa muito atrativa ao uso de microarranjos para estudos de expressão gênica, (Marioni et al., 2008). A metodologia de RNA-seq permite analisar os perfis transcricionais, quantificar a expressão gênica, descobrir novos genes e isoformas expressas e, além disso, pode ser utilizada para melhorar a anotação estrutural de genomas (Wang et al., 2009), especialmente de organismos não modelos como os dermatófitos. Esta metodologia apresenta vantagens claras ao uso de microarranjos ou mesmo de *tilling arrays*, pois fornece resultados com

resolução de um nucleotídeo, o que permite determinar com maior acurácia as junções entre exons e íntrons e apresenta maior abrangência na detecção de genes diferencialmente expressos. A técnica de RNA-seq está sendo cada vez mais utilizada para avaliar o transcrito de vários organismos como os fungos modelo *Saccharomyces cerevisiae* (Nagalakshmi et al., 2008; Parkhomchuk et al., 2009) e *Schizosaccharomyces pombe* (Wilhelm et al., 2008), os patógenos *Aspergillus fumigatus* (Gibbons et al., 2012) e *Candida albicans* (Dhamgaye et al., 2012), entre outros.

O limitado número de alvos terapêuticos associado ao aumento nos casos de linhagens resistentes às drogas antifúngicas impulsiona constantemente pesquisas nas áreas de genômica, transcritômica e proteômica visando à identificação de novos alvos ou estratégias alternativas para o controle destes patógenos. Trabalhos em larga escala, que avaliam o perfil de expressão gênica de fungos expostos a diferentes condições ambientais, tem fornecido importantes informações quanto à regulação gênica envolvida com o desenvolvimento e com os processos adaptativos utilizados por esses organismos frente a essas variações ambientais. Estudos sobre o perfil de expressão gênica de fungos modelo, patogênicos e oportunistas na presença e ausência de drogas e em linhagens sensíveis e resistentes vem sendo realizados por diversos pesquisadores na tentativa de elucidar mecanismos moleculares envolvidos na resposta e na resistência a antifúngicos e assim nortear o uso dos antifúngicos existentes e revelar novos alvos terapêuticos, criando perspectivas para melhorar as terapias atualmente disponíveis (Agarwal et al., 2003; Yu et al., 2007; Zhang et al., 2009; Peres et al., 2010b).

Hipótese do Trabalho

2 Hipótese do Trabalho

Dada a importância do dermatófito *T. rubrum* devido à alta e crescente incidência de infecções na população, a necessidade de se estudar os mecanismos utilizados por este patógeno para a instalação e manutenção da infecção e sobrevivência em condições de estresse, o presente trabalho teve como hipótese avaliar se a exposição de *T. rubrum* ao agente citotóxico acriflavina, modularia a expressão de genes que constituiriam alvos moleculares potenciais para o desenvolvimento de novas drogas.

Objetivos

3 Objetivos

Tendo em vista a importância clínica de *T. rubrum*, a necessidade do desenvolvimento e do conhecimento da ação de novos antifúngicos e inibidores do crescimento fúngico, o presente trabalho teve como objetivo estudar os mecanismos moleculares envolvidos na resposta adaptativa de *T. rubrum* ao estresse causado pela exposição à droga acriflavina.

3.1 Objetivos específicos

- Analisar o perfil transcricional de *T. rubrum* durante a exposição à acriflavina por meio da técnica de RNA-seq.
- Analisar por Bioinformática os dados obtidos no RNA-seq para identificação das sequências obtidas por meio da comparação com transcritos depositados em bancos de dados e com o genoma de *T. rubrum*.
- Analisar os genes diferencialmente expressos em resposta à acriflavina visando identificar vias metabólicas envolvidas na adaptação ao estresse provocado pela droga, que podem representar tanto o mecanismo de ação da droga quanto a resposta do fungo à sua presença.
- Validar a expressão diferencial de genes de interesse por PCR em Tempo Real.
- Utilizar os dados gerados por meio da técnica de RNA-seq para verificar a anotação do genoma de *T. rubrum*, identificando genes ainda não descritos.

Materiais e Métodos

4 Materiais e Métodos

4.1 Linhagens

4.1.1 Linhagem de *Trichophyton rubrum*

Neste trabalho foi utilizada a linhagem de *Trichophyton rubrum* CBS118892 doada pelo *Centraalbureau voor Schimmelcultures* (CBS - Holanda), cultivada a 28 °C por 15 dias, em meio agar extrato de malte (MEA). Após 15 dias, esta linhagem apresenta uma colônia branca de aspecto cottonoso e o reverso da cultura com pigmentação vermelha. Esta linhagem foi utilizada no projeto Genoma Compartivo de Dermatófitos, sendo que seu genoma sequenciado está disponível em (Broad, 2010).

4.1.2 Cepa de *Escherichia coli*

A cepa TOP10F' (Invitrogen) foi utilizada para experimentos de transformação visando a amplificação dos plasmídios recombinantes.

4.2 Manutenção e Estoque das Linhagens

4.2.1 Linhagem de *Trichophyton rubrum*

Para a preservação da linhagem de *Trichophyton rubrum* CBS118892 por períodos mais longos, foram utilizados tubos de ensaio contendo meio MEA inclinado. Após o cultivo, as linhagens foram mantidas em temperatura ambiente e, para repiques periódicos, foram inoculadas em placas de Petri contendo meio MEA e incubadas a 28 °C por 15 dias.

4.2.2 Cepa de *E. coli*

A cepa de *E. coli* foi cultivada em meio LB líquido contendo estreptomicina (25 µg/mL) por 24 h a 37 °C. Aliquotas de 1 mL da cultura contendo 15% (v/v) de glicerol esterilizado foram estocadas a -80 °C. Quando necessário, uma alíquota foi descongelada e inoculada em meio de cultura apropriado. As bactérias contendo plasmídio com o gene que confere resistência à ampicilina foram estocadas na presença deste antibiótico na concentração de 100 µg/mL.

4.3 Meios de Cultura

4.3.1 Meio Extrato de Malte – MEA (*Malt Extract Agar*) (Atlas, 1993)

Extrato de Malte	20 g
Glicose	20 g
Peptona	1 g
Água Destilada (q.s.p.)	1000 mL

O pH do meio foi ajustado para 5,7 e autoclavado a 1 atm de pressão e 120 °C por 20 min. Para o preparo do meio sólido foi adicionado agar para uma concentração final de 2,0% (m/v).

4.3.2 Meio Sabouraud modificado (Atlas, 1993)

Glicose	20 g
Peptona	10 g
Água Destilada (q.s.p.)	1000 mL

O pH do meio foi ajustado para 5,7 e autoclavado a 1 atm de pressão e 120 °C por 20 min. Para o preparo do meio sólido foi adicionado agar para uma concentração final de 2,0% (m/v).

4.3.3 Meio de Luria e Bertani – LB (Sambrook J, 1989)

Triptona	10 g
Extrato de levedura	5 g
Cloreto de potássio	0,2 g
Cloreto de sódio	0,6 g
Água destilada (q.s.p.)	1000 mL

O pH do meio foi ajustado para 7,4 e autoclavado a 1 atm de pressão e 120 °C por 20 min. Para o preparo do meio sólido foi adicionado ágar para uma concentração final de 1,5% (m/v).

4.3.4 Meio RPMI-1640

Foram dissolvidos 10,4 g do meio RPMI-1640 (Gibco BRL) em 900 mL de água destilada. A seguir, foi adicionado MOPS [ácido 3-(N-morfolina) propanosulfônico] para uma concentração final de 0,165 M, agitando-se até a completa dissolução do meio. O pH foi ajustado para 7,0 utilizando hidróxido de sódio 1 M e o volume completado para 1 litro com água destilada. O meio foi esterilizado através de um sistema de filtração com membrana de náilon de 22 µm e estocado a 4 °C. Na Tabela 1 é apresentada a composição deste meio de cultura.

Tabela 1. Constituintes do meio RPMI-1640.

Constituinte	g/L	Constituinte	g/L
L-arginina	0,200	Biotina	0,0002
L-asparagina (anidro)	0,050	D-pantotênico	0,00025
Ácido L-aspártico	0,020	Cloreto de colina	0,003
L-cisteína.2HCl	0,0652	Ácido fólico	0,001
Ácido L-glutâmico	0,020	Mio-inositol	0,035
L-glutamina	0,0300	Niacinamida	0,001
Glicina	0,010	Ácido p-aminobenzóico	0,001
L-histidina	0,015	Piridoxina HCl	0,001
L-hidroxiprolina	0,020	Riboflavina	0,0002
L-isoleucina	0,050	Tiamina HCl	0,001
L-leucina	0,050	Vitamina B ₁₂	0,000005
L-lisina HCl	0,040	Nitrato de cálcio.H ₂ O	0,100
L-metionina	0,015	Cloreto de potássio	0,400
L-fenilalanina	0,015	Sulfato de magnésio (anidro)	0,04884
L-prolina	0,020	Cloreto de sódio	6,000
L-serina	0,030	Fosfato de sódio dibásico (anidro)	0,800
L-treonina	0,020	D-glicose	2,000
L-triptofano	0,005	Glutathione reduzida	0,001
L-tirosina.2Na	0,020	Vermelho de fenol	0,0053
L-valina	0,020		

4.4 Soluções

4.4.1 Solução estoque de acriflavina (Sigma)

A solução estoque de acriflavina foi preparada na concentração de 10 mg/mL, utilizando água como solvente, e mantida a 4 °C.

4.4.2 Solução de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosideo) (Sambrook J, 1989)

A solução estoque de X-gal foi preparada em N, N-dimetilformamida na concentração de 20 mg/mL. Esta solução foi mantida a -20 °C em frasco escuro, para evitar a fotodegradação.

4.4.3 Solução de IPTG (Isopropil- β -D-tiogalactopiranosideo) (Sambrook J, 1989)

A solução estoque de IPTG foi preparada dissolvendo-se 2 g de IPTG em 10 mL de água destilada esterilizada, e mantida a -20 °C.

4.4.4 Água livre de RNase (Sambrook J, 1989)

Para evitar a contaminação da água com RNase, a água deionizada utilizada na extração e no preparo de soluções para RNA foi tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) 0,1% (v/v) e incubada a 37 °C por 18-20 h e autoclavada por 30 min, a 1 atm de pressão e 120 °C.

4.4.5 Tampão de corrida MOPS 5X

MOPS pH 7,0	100 mM
Acetato de Sódio	40 mM
EDTA pH 8,0	5 mM

Este tampão foi preparado com água livre de RNase e mantido em frasco escuro à temperatura ambiente.

4.4.6 Gel para RNA (Sambrook J, 1989)

Formaldeído	10 mL
Agarose 1,5% (m/v) fundida	1,5 g
MOPS 5X	20 mL
Água tratada com DEPC (q.s.p)	100 mL

4.4.7 Tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) (Sambrook J, 1989)

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

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

4.4.8 Tampão TE (Tris-EDTA) (Sambrook J, 1989)

Tris-HCl,	10 M
EDTA pH8,0,	1 M

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

4.5 Suspensão de conídios

Conídios e micélio de *T. rubrum* cultivado por 10 a 15 dias em Placas de Petri foram removidos da superfície do meio com solução salina 0,9% esterilizada, com o auxílio de uma espátula esterilizada. A solução foi agitada em vortex para desagregar os conídios, filtrada em lâ de vidro esterilizada e centrifugada a 6000 x g por 10 min. A seguir, suspendeu-se os conídios em solução salina esterilizada e a concentração foi estimada em Câmara de Neubauer.

4.6 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima (CIM) é definida como a menor concentração de um agente inibidor na qual não se observa o crescimento macroscópico do micro-organismo. Para se determinar a CIM de *T. rubrum* ao agente inibidor acriflavina foi utilizado o método de microdiluição em meio RPMI, que é o método recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) para determinação da CIM em fungos filamentosos. Uma alíquota de 0,1 mL de uma suspensão de conídios contendo 3×10^4 conídios/mL, correspondente a uma transmitância de 70-75% a 530 nm, foi inoculada em meio RPMI contendo concentrações da droga que variaram de 10 a 0,039 $\mu\text{g/mL}$ (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 e sem droga 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.

4.7 Condições de cultivo para análises de expressão gênica

Aproximadamente, 1×10^6 conídios da linhagem CBS118892 foram inoculados em 100 mL de meio de cultura *Sabouraud* e cultivados sob agitação lenta por 96h. Após o cultivo, o micélio foi coletado, lavado e transferido para o meio RPMI contendo acriflavina, na concentração de 1,75 $\mu\text{g/mL}$, que corresponde a 70% da CIM de acriflavina para esta linhagem. Após os períodos de 3h, 12h e 24h de exposição no meio com droga, os micélios foram coletados por filtração com o auxílio de uma bomba a vácuo, prensados entre folhas de papel de filtro para remoção do excesso de meio de cultura, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C até a extração de RNA total. Para a condição controle (0 h), o micélio foi coletado após o cultivo em meio *Sabouraud* por 96 h, congelado e estocado conforme mencionado.

4.8 Extração de RNA total

A extração de RNA total foi realizada utilizando o kit *Illustra RNAspin Mini* (GE Healthcare) conforme instruções do fabricante. Aproximadamente, 100 mg de micélio foram utilizados para cada extração. A concentração de RNA foi determinada por espectrofotometria utilizando o NanoDrop Thermo e a integridade das amostras de RNA extraídas foi analisada

por meio de eletroforese em gel de agarose sob condições desnaturantes. As amostras foram mantidas a -80 °C até o sequenciamento.

4.9 Transcritômica quantitativa (RNA-seq)

Para determinar o perfil transcricional de *T. rubrum* em resposta a exposição à acriflavina foi utilizada a metodologia de transcritômica quantitativa conhecida como RNA-seq, que é baseada nas novas tecnologias de sequenciamento em larga escala. A princípio qualquer tecnologia de sequenciamento em larga escala pode ser utilizada. Neste projeto, foi empregado o sistema de sequenciamento de nova geração SOLiD System (Applied Biosystems) que se baseia no sequenciamento por ligação.

4.9.1 Construção das bibliotecas

Para o experimento de RNA-seq, foram construídas quatro bibliotecas de fragmentos, sendo que o RNA total de cada uma das condições foram primeiramente depletados de RNA ribossomais usando o *kit RiboMinus* (Invitrogen). Em seguida, os RNAs depletados foram fragmentados utilizando o *SOLiD 4 Total RNA Seq Kit* (Applied Biosystems) e convertidos em cDNAs utilizando a enzima *ArrayScript Reverse Transcriptase* (Ambion). Os cDNAs sintetizados foram purificados utilizando o *Qiagen MinElute PCR Purification Kit* (Qiagen, CA), e a seleção dos fragmentos por tamanho foi realizada em gel TBE-Uréia Novex 6% (Invitrogen, Carlsbad, CA). Os cDNAs que apresentavam tamanhos entre 150 – 200 pb foram selecionados e amplificados para obtenção de uma quantidade de material suficiente para a realização da PCR de emulsão (emPCR). Durante essa amplificação, cada biblioteca foi marcada com um *barcode* diferente, usando diferentes oligonucleotídeos iniciadores acoplados com os respectivos *barcodes*, o que permite o sequenciamento paralelo (*multiplex*) das quatro bibliotecas. A emPCR foi realizada segundo o *Applied Biosystems SOLiD 4 System Templated Bead Preparation Guide*. As *beads* amplificadas na etapa de emPCR foram verificadas quanto a quantidade e qualidade. Em seguida, foi realizada a deposição das *beads* na lâmina e realizado o sequenciamento em uma única corrida do equipamento *SOLiD 4 System* segundo o *SOLiD 4 System Instrument Operation Guide*. Tanto a construção das bibliotecas quanto o sequenciamento foi realizado na empresa *Cofactor Genomics* (St. Louis, USA).

4.9.2 Sequenciamento em larga escala

O sistema de sequenciamento SOLiD é baseado na ligação sequencial de sondas fluorescentemente marcadas. O sistema utiliza quatro fluoróforos distintos, que representam dezesseis sondas diferentes, que correspondem às dezesseis diferentes possibilidades de combinação entre duas bases. Dessa forma cada sonda é composta por duas bases de interrogação, três bases degeneradas e três bases universais marcadas com um dos quatro fluoróforos. A reação de sequenciamento se inicia com o pareamento do oligonucleotídeo iniciador universal, seguido da adição das sondas à reação. A sonda que apresentar o dinucleotídeo de interrogação complementar à sequência se pareia adjacente ao oligonucleotídeo iniciador e é ligada a ele por meio de uma ligase. A fluorescência emitida pela sonda é capturada pelo sistema e, em seguida as três bases universais são clivadas. As etapas de ligação, detecção e clivagem são repetidas várias vezes, o que determina o tamanho do *read* sequenciado. Seguindo a série de ligações, a sequência é reinicializada, e um oligonucleotídeo iniciador *n-1* é adicionado para uma segunda etapa de ligações. Na Figura 2 é mostrado um esquema ilustrativo da metodologia utilizada no Sistema SOLiD.

Figura 2: Esquema representativo da metodologia utilizada pelo Sistema SOLiD (Adaptado do Manual SOLiD System 3).

4.10 Análise do transcrito de *T. rubrum* em resposta a acriflavina

Após o sequenciamento do transcrito de *T. rubrum*, a primeira etapa da análise consistiu na remoção das sequências de baixa qualidade utilizando um filtro de qualidade previamente desenvolvido (Sasson e Michael, 2010) específico para sequências geradas pela tecnologia SOLiD. O filtro estabelecido foi o valor de qualidade, de acordo com o *Phred Score*, maior que 20. As sequências que não cumpriam esse parâmetro foram descartadas das análises subsequentes.

O mapeamento das sequências com o genoma de *T. rubrum* disponível no banco de dados do *Broad Institute* foi realizado utilizando os algoritmos *Bowtie* (Langmead et al., 2009) e *Tophat* (Trapnell et al., 2009). Estes algoritmos são baseados na transformação de *Burrows-Wheller* e são específicos para o alinhamento de sequências curtas. Os alinhamentos e a cobertura média dos transcritos foram visualmente inspecionados utilizando os softwares *Gaggle Genome Browser* (Bare et al.) e *Genome View* (Abeel et al., 2009).

As análises transcricionais foram realizadas utilizando o algoritmo *Cufflinks* (Trapnell et al., 2010), que estima a abundância dos transcritos em termos de Fragmentos por Kilobase por Milhão de *Reads* Mapeadas (FPKM), e o algoritmo *Cuffdiff* que testa os genes diferencialmente expressos entre a condição controle e as condições de exposição à droga. Este algoritmo foi aplicado, pois permite a inclusão de *reads* que eventualmente são mapeadas em mais de uma posição no genoma. O *volcano plot*, gráfico entre a significância *versus* o *fold change* plotados no eixo y e x, respectivamente, foram construídos utilizando o pacote estatístico R e a partir da análise destes gráficos, foram aplicados limiares para selecionar genes estatisticamente significativos e diferencialmente expressos.

Após o mapeamento e determinação dos perfis transcricionais foi realizada a categorização funcional dos genes diferencialmente expressos de acordo com o *Gene Ontology* (Blake e Harris, 2008) utilizando o algoritmo *Blast2GO* (Gotz et al., 2008). As categorias super-representadas em cada uma das condições analisadas foram determinadas a partir da análise de enriquecimento implementada pelo algoritmo *BayGO* (Vencio et al., 2006). Para identificar as vias metabólicas, nas quais os genes modulados em resposta a acriflavina poderiam estar envolvidos, foi realizada a anotação com o *Kegg Orthology* (Kanehisa et al., 2010) utilizando o KAAS (*Kegg Automatic Annotation Server*), sendo que o organismo modelo referência utilizado foi o fungo filamentoso patogênico *Aspergillus fumigatus*. Utilizando novamente o *Cufflinks* foi realizada a montagem *de novo* do transcriptoma, ou seja, a geração de todos os transcritos possivelmente presentes no genoma, baseando-se apenas no mapeamento dos *reads* no genoma. Estes transcritos representam as regiões que apresentam alinhamentos com os reads gerados no RNA-seq. Estes transcritos gerados na montagem *de novo* foram comparados com a anotação atualmente disponível do genoma de *T. rubrum* a fim de verificar a existência de novos transcritos, ainda não anotados.

4.11 Confirmação das análises transcricionais por PCR em Tempo Real

4.11.1 Síntese de cDNA

Duas amostras independentes de RNA para cada condição analisada foram primeiramente tratadas com DNase I (Invitrogen) utilizando 1 µg de RNA e 1 U de DNase. Em seguida, foi realizado um PCR utilizando o gene da tubulina como controle positivo, pois os oligonucleotídeo iniciadores deste gene foram desenhados flanqueando uma região que apresenta um íntron, para verificar que não havia contaminação com DNA genômico nas amostras de RNA que seriam utilizadas para a síntese de cDNA.

A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada utilizando os RNA tratados com DNase, empregando-se o *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração do cDNA foi estimada utilizando *NanoDrop* e estes foram diluídos para 25 ng/µl para utilização nos experimentos de PCR em Tempo Real.

4.11.2 PCR em tempo real

A expressão de alguns genes selecionados para validação da metodologia de RNA-seq foi realizada por meio da metodologia de PCR em Tempo Real (qPCR) utilizando o equipamento *StepOnePlus Real Time System* (Applied Biosystems). Duas amostras de RNA provenientes de experimentos independentes foram utilizadas para cada um dos pontos analisados e as reações foram realizadas em triplicata. Oligonucleotídeos iniciadores específicos foram desenhados utilizando o software *Primer3* (Tabela 2) e tiveram sua especificidade confirmada por meio de buscas no genoma de *T. rubrum* utilizando o *Blast* e por meio da análise da curva de dissociação de cada um dos oligonucleotídeos utilizados. Os experimentos de qPCR foram realizados utilizando o *Syber Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), usando 50 ng de cDNA e 1 µl de cada oligonucleotídeo, em reações de 12,5 µl. O ciclo de PCR consistiu em 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 s, e 60°C por 1 min. A curva de dissociação foi gerada ao final de cada corrida para verificação da amplificação de um único produto.

O método de quantificação relativa $2^{-\Delta\Delta C_t}$ foi utilizado para calcular a expressão de cada gene, usando o gene *rpb2* como endógeno (Jacob et al., 2012). As análises foram realizadas utilizando o software *StepOne Software v2.2* e o *GraphPad Prims v5*. Como amostra referência foi utilizada a condição de cultivo em meio *Sabouraud*, aqui denominada 0 hora.

Tabela 2: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para o PCR em tempo real.

ID ^(*)	Gene	Oligonucleotídeos (5' - 3')	Amplicon (bp)	Eficiência (%)	Concentração (nM)
TERG_02214	zinc carboxypeptidase	FW: ACGAAGGCGTCGTCCTACTACT REV: AAAGCAACAAAGGCAAGAGC	121	101,89	800
TERG_07861	subtilase	FW: AACTATGACCGCTGGGATTG REV: CTTCTCCTGGAGGACGTTGA	138	101,72	700
TERG_06053	catalase (peroxisomal catalase)	FW: CTGAATCGCAACGTGAAAGA REV: CAAACATACGCGCTTGAAGA	118	95,42	700
TERG_08557	serine carboxypeptidase	FW: TGGACGGAGGCAAGTTTTAC REV: TGCAGGTGCTGGTGTCTAAG	114	100,03	700
TERG_02979	Delta(24(24(1)))-sterol reductase (Erg4)	FW: CCTTCCCTTGGTTTTACTTCG REV: TGTAGGGAACAGCCTTCTCG	126	102,07	600
TERG_03102	sterol 24-c-methyltransferase (Erg6)	FW: GGCTGACAAAGGGGACATAA REV: TGGTCACTCGAAGAGCACTG	98	101,35	800
TERG_01252	catalase (catalase A)	FW: CCACTGGTGATGCAGTCAAT REV: CACACCATAGCTCTCCACGA	107	100,45	800
TERG_01281	malate synthase	FW: CGCTGAGGGAAAGAGAGTTG REV: CAGCGAGCTGGTACTTGTTG	107	102,92	600
TERG_00825	isocitrate lyase	FW: TATCCATCGTCTGGGAGAGC REV: GCTTAGCGTATGCCTTGGAA	107	108,63	700
TERG_01076	aconitase	FW: GGAATGCTTCCCCTTACCTT REV: GGTGGACACGGAGAGTCATT	121	91,35	800
TERG_01871	acetyl-CoA acetyltransferase	FW: CAGCAAGTTCACCACTGCTC REV: TGATCTCAAAGGCGTCAATG	92	100,55	600
TERG_03762	malate dehydrogenase	FW: GTTGACAGCCCCCTCTACAA	116	96,77	700

ID (*)	Gene	Oligonucleotídeos (5' - 3')	Amplicon (bp)	Eficiência (%)	Concentração (nM)
TERG_04125	citrate synthase	REV: TGCTCGTACTCGGAGACCTT	107	106,77	600
		FW: GCTACGTGTCTCAGCGTGAA			
TERG_02198	CAMK protein kinase	REV: GTGTTCCGGTCAAGACACCAG	112	95,14	700
		FW: CAAGGAATCCCAGAGCAAAG			
TERG_06573	calcineurin regulatory subunit b	REV: GTAGAATTCGCACCGAAAGC	61	97,80	400
		FW: AGATGGCGGTGGTGACGTA			
TERG_06392	calmodulin	REV: CGAACTGAAGGCCGATAACC	58	107,50	400
		FW: GGCCAGAACCCTTCGGAAT			
TERG_05742	DNA-dependent RNA polymerase II (rpb2)	REV: TGTCGGCGTCAACCTCATT	59	94,99	300
		FW: TGCAGGAGCTGGTGGAAGA			
TERG_07904	tubulin beta chain	REV: GCTGGGAGGTACTGTTTGATCAA	253	93,99	200
		FW: AACATGATGGCTGCCACTGA			
		REV: AAGATGGCAGAGCAGGTAAGGT			

(*) TERG: Número de acesso do gene no genoma de *T. rubrum* disponível no *Broad Institute* (Broad, 2010).

4.12 RT-PCR

A validação da expressão de algumas regiões intergênicas identificadas por meio da montagem *de novo* do transcriptoma foi realizada por meio de RT-PCR. Nestas reações foram utilizados:

cDNA	100 ng
10 X <i>High Fidelity Buffer</i>	2,5 µl
MgSO ₄ 50 mM	0,8 µl
Oligonucleotídeo F+R 10 µM	0,5 µl
dNTPs 10mM	0,5 µl
<i>Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity</i>	0,2 µl
Água destilada (q.s.p.)	19,5 µl

O ciclo de PCR consistiu em 95°C por 2 min, seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 s, a temperatura de fusão (T_m – *melting temperature*) de cada oligonucleotídeo por 30s (Tabela 3) e 68°C por 1 min.

Tabela 3: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados no RT-PCR.

Símbolo da região *	Oligonucleotídeos (5'-3')	Amplicon (pb)	T _m
CUFF.32441	FW: AGAAGGATGAATGGCACTGG	342	55
	REV: CAGGTTTCAGTTTGGCATGAA		
CUFF.10177	FW: GTAATGGCCGAAGGGAAACT	211	55
	REV: GGCCTCTGCAGAATTGCTT		
CUFF.16909	FW: CCAATCAACACTCCAAAACG	616	52
	REV: GCCAATTGAACAGTGGAGGT		
CUFF.37329	FD: GAGGAAACCGCAAAAGTGAC	197	55
	REV: ACAATTGCCAGGGTAACACC		
CUFF.17999	FD: CCCACCTGCGAATATACGAT	206	50
	REV: CTTGTCATCCCATGCAAATG		
act (TERG_06637)	FWD: GAATCTCCCCCTCATGCTT	198	60
	REV: GCCTGGGCTTCCGACACT		

(*) CUFF: Designação genérica gerada na montagem *de novo* do transcriptoma.

4.13 Purificação e clonagem dos fragmentos

Os fragmentos amplificados no RT-PCR foram verificados por meio de eletroforese em gel de Agarose 1%. Os fragmentos que apresentaram duas bandas foram recortados do gel e purificados em colunas utilizando o kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare). Em seguida, esses fragmentos foram ligados em vetor *pGEM-T Vector Systems* (Promega) utilizando-se 100 ng de DNA, 25 ng do vetor, 1X tampão de ligação e 5U de T4 DNA ligase. As ligações foram realizadas em um volume final de 10 µL e incubadas por 18 h a 16 °C. Em seguida, os plasmídios recombinantes foram utilizados para transformar células competentes de *E. coli* por choque térmico.

4.14 Transformação bacteriana

4.14.1 Preparo das células competentes

A cepa de *E. coli* TOP10F' foi inoculada em 5 mL de meio LB líquido contendo estreptomicina (15 µg/mL), a partir de uma célula que foi previamente estriada do estoque, e cultivada *overnight* a 37 °C. A seguir, uma alíquota de 3 mL desta cultura foi inoculada em 250 mL de meio LB e cultivada por aproximadamente 2h e 30 min a 37 °C, até a obtenção de uma DO₆₀₀ de 0,6-0,8. A cultura foi então colocada em gelo por 15 min e recolhida por centrifugação a 4000 rpm por 10 min a 4 °C. As células foram ressuspensas em 125 mL de tampão I (10mM Tris-HCl pH7,5; 50mM cloreto de Calcio), incubadas em gelo por 15 min e centrifugadas a 4000 rpm por 10 min, a 4 °C. O precipitado foi ressuspendido em 3,5 mL tampão II (10mM Tris-HCl pH7,5; 50mM cloreto de Cálcio; 15% glicerol) e dividido em alíquotas de 200 µL. As células foram congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -80 °C até o momento do uso.

4.14.2 Transformação por choque térmico

Uma alíquota de 200 µL de células competentes foi descongelada em banho de gelo e a essa alíquota foi adicionado 10-50 ng de DNA transformante. As células foram colocadas em banho Maria a 42 °C por 40 s e imediatamente transferida para gelo por 2 min. Imediatamente, as bactérias foram ressuspensas em 250 µL de meio LB e incubadas por 1 h

a 37 °C, sob agitação. A seguir, foram plaqueadas em meio ágar LB contendo 100 µg/mL de ampicilina, 50 mg/mL de X-gal e 0,2 mg/mL de IPTG, e incubadas a 37 °C por 18 h. As colônias bacterianas transformadas foram selecionadas e inoculadas em meio LB contendo ampicilina, em microplacas de 96 poços, e incubadas a 37 °C por 18 h sob agitação. Uma alíquota destas bactérias foi congelada a -80 °C em glicerol 15%.

4.15 Extração de DNA plasmidial

Uma colônia bacteriana transformada foi inoculada em 5 mL de meio LB contendo o antibiótico 100 µg/mL do antibiótico ampicilina e cultivada a 37 °C por 18 h, sob agitação a 200 rpm. A cultura foi transferida para um microtubo de 1,5 mL e centrifugada a 14000 rpm por 1 min a 4 °C. O precipitado foi utilizado para a extração de DNA plasmidial utilizando o kit *Quiaprep Spin Miniprep kit* (Qiagen), conforme instruções do fabricante.

4.16 Sequenciamento

O sequenciamento automático foi realizado no aparelho *ABI 3130 Genetic Analyser* (Applied Biosystems) e as reações foram feitas com o *Kit Big Dye Terminator Cycle Sequence Ready Reaction*, seguindo os protocolos recomendados pelo fabricante. Foram utilizados na reação de sequenciamento, de 100 a 200 ng de DNA plasmidial, 2,5 pmol de oligonucleotídeo universal M13 *forward* ou *reverse* e 2 µL de *Big Dye Terminator v3.1*. As reações foram incubadas no programa de PCR: 95° C por 1 min, seguido de 25 ciclos de 95° C por 10 s, 51 °C por 5 s e 60 °C por 1 min. Após a ciclagem, as amostras foram precipitadas com 60 µL de isopropanol 100% (v/v), 30 µL de água Milli-Q, incubadas à temperatura ambiente por 20 min no escuro e centrifugadas por 45 min a 4000 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi descartado, e em seguida foi adicionado 200 µL de etanol 70% (v/v) gelado, centrifugado por 20 min a 4000 rpm a 4 °C. As amostras foram secas e mantidas à temperatura ambiente no escuro até o momento da aplicação no equipamento de sequenciamento.

4.17 Análise das sequências intergênicas

Os cromatogramas gerados no sequenciamento dos fragmentos correspondentes às regiões intergênicas foram processados por meio de um *pipeline* previamente desenvolvido

em nosso laboratório. Os cromatogramas foram analisados quanto à qualidade pelo *software Phred* (Ewing et al., 1998; Ewing e Green, 1998), e a retirada das regiões referentes ao vetor de clonagem foi feita utilizando o programa *cross-match*. As sequências que apresentaram qualidade *Phred* ≥ 20 foram alinhadas ao genoma de *T. rubrum* utilizando o BLAST (Altschul et al., 1997) para verificar se corresponderiam às regiões previamente identificadas. Posteriormente, estas sequências foram anotadas também com os bancos de dados *NR non-redundant protein database - GenBank* (Li et al., 2010) e com o *Rfam RNA families – Wellcome Trust Sanger Institute* (Gardner et al., 2011).

Resultados e Discussão

5 Resultados e Discussão

Conclusões

6 Conclusões

A técnica de RNA-seq possibilitou a análise do transcriptoma de *T. rubrum* e a identificação de genes diferencialmente expressos em resposta à acriflavina envolvidos em diversos processos celulares, ampliando o conhecimento do espectro de efeitos celulares causados por esta droga.

A análise dos genes diferencialmente expressos indica que acriflavina interfere com a expressão de fatores de virulência necessários para a instalação e manutenção da infecção no hospedeiro. Estes genes foram reprimidos por *T. rubrum* e constituem potenciais alvos para o desenvolvimento de novas drogas.

Acriflavina interfere na via de biossíntese do ergosterol em enzimas diferentes das quais os antifúngicos convencionais atuam, constituindo um provável novo mecanismo de ação de acriflavina.

Foi possível identificar e analisar a expressão de regiões transcritas, ainda não descritas no genoma de *T. rubrum*, e verificar a presença de isoformas alternativas destes transcritos, o que contribui com a anotação do genoma e do transcriptoma deste e de outros dermatófitos.

Os resultados do presente trabalho contribuem para o entendimento dos mecanismos de adaptação de *T. rubrum* ao estresse provocado pela exposição à doses subinibitórias de acriflavina e possibilitam a realização de novos estudos mais específicos sobre a regulação da expressão gênica neste dermatófito.

Referências Bibliográficas

7 Referências Bibliográficas

Abeel, T., J. De Ridder e L. Peixoto. Highlights from the 5th International Society for Computational Biology Student Council Symposium at the 17th Annual International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology and the 8th European Conference on Computational Biology. BMC Bioinformatics, v.10 n.Suppl 13, p.II. 2009.

Achterman, R. R. e T. C. White. Dermatophyte virulence factors: identifying and analyzing genes that may contribute to chronic or acute skin infections. Int J Microbiol, v.2012, p.358305. 2011.

_____. A foot in the door for dermatophyte research. PLoS Pathog, v.8, n.3, p.e1002564. 2012.

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.

Akins, R. A. An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. Medical Mycology, v.43, n.4, Jun, p.285-318. 2005.

Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller e D. J. Lipman. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res, v.25, n.17, Sep 1, p.3389-402. 1997.

Ameen, M. Epidemiology of superficial fungal infections. Clin Dermatol, v.28, n.2, Mar 4, p.197-201. 2010.

Atlas, R. Handbook of microbiological media: Edited by Lawrence C. Perks. Ed. CRC Press. 1993. 786 p.

Attar, F., S. Khavari-Nejad, J. Keyhani e E. Keyhani. Structural and functional alterations of catalase induced by acriflavine, a compound causing apoptosis and necrosis. Ann N Y Acad Sci, v.1171, Aug, p.292-9. 2009.

Avers, C. J., C. R. Pfeffer e M. W. Rancourt. Acriflavine Induction of different kinds of "petite" mitochondrial populations in *Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol, v.90, Aug, p.481-94. 1965.

Balci, D. D. e M. Cetin. Widespread, chronic, and fluconazole-resistant *Trichophyton rubrum* infection in an immunocompetent patient. Mycoses, v.51, n.6, Nov, p.546-8. 2008.

Bammert, G. F. e J. M. Fostel. Genome-wide expression patterns in *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of drug treatments and genetic alterations affecting biosynthesis of ergosterol. Antimicrob Agents Chemother, v.44, n.5, May, p.1255-65. 2000.

Bare, J. C., T. Koide, D. J. Reiss, D. Tenenbaum e N. S. Baliga. Integration and visualization of systems biology data in context of the genome. BMC Bioinformatics, v.11, p.382. 2010.

Belmont, P., J. Bosson, T. Godet e M. Tiano. Acridine and acridone derivatives, anticancer properties and synthetic methods: where are we now? Anticancer Agents Med Chem, v.7, n.2, Mar, p.139-69. 2007.

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.

Bratkovic, T. e B. Rogelj. Biology and applications of small nucleolar RNAs. Cell Mol Life Sci, v.68, n.23, Dec, p.3843-51. 2011.

Broad, I. Comparative Dermatophyte Database. 2011 2010.

Burmester, A., E. Shelest, G. Glockner, C. Heddergott, S. Schindler, P. Staib, A. Heidel, M. Felder, A. Petzold, K. Szafranski, M. Feuermann, I. Pedruzzi, S. Priebe, M. Groth, R. Winkler, W. Li, O. Kniemeyer, V. Schroeckh, C. Hertweck, B. Hube, T. C. White, M. Platzer, R. Guthke, J. Heitman, J. Wostemeyer, P. F. Zipfel, M. Monod e A. A. Brakhage. Comparative and functional genomics provide insights into the pathogenicity of dermatophytic fungi. Genome Biol, v.12, n.1, p.R7. 2011.

Capa, L., A. Mendoza, J. L. Lavandera, F. Gomez De Las Heras e J. F. Garcia-Bustos. Translation elongation factor 2 is part of the target for a new family of antifungals. Antimicrob Agents Chemother, v.42, n.10, Oct, p.2694-9. 1998.

Cervelatti, E. P., M. S. Ferreira-Nozama, R. Aquino-Ferreira, A. L. Fachin e N. M. Martinez-Rossi. Electrophoretic molecular karyotype of the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. Genetics and Molecular Biology, v.27, p.99-102. 2004.

Cordeiro, R. A., R. S. Brilhante, M. F. Rocha, S. H. Rabenhorsch, J. L. Moreira, T. B. Grangeiro e J. J. Sidrim. Antifungal susceptibility and genetic similarity of sequential isolates of *Trichophyton rubrum* from an immunocompetent patient with chronic dermatophytosis. Clin Exp Dermatol, v.31, n.1, Jan, p.122-4. 2006.

Cowen, L. E. e W. J. Steinbach. Stress, drugs, and evolution: the role of cellular signaling in fungal drug resistance. Eukaryot Cell, v.7, n.5, May, p.747-64. 2008.

Cresnar, B. e S. Petric. Cytochrome P450 enzymes in the fungal kingdom. Biochim Biophys Acta, v.1814, n.1, Jan, p.29-35. 2011.

Dan, P., R. Rawi, S. Hanna e B. Reuven. Invasive cutaneous *Trichophyton schoenleinii* infection in an immunosuppressed patient. Int J Dermatol, v.50, n.10, Oct, p.1266-9. 2011.

De Backer, M. D., T. Ilyina, X. J. Ma, S. Vandoninck, W. H. Luyten e H. Vanden Bossche. Genomic profiling of the response of *Candida albicans* to itraconazole treatment using a DNA microarray. Antimicrob Agents Chemother, v.45, n.6, Jun, p.1660-70. 2001.

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, n.1, Aug 16, p.396. 2012.

Diao, Y., R. Zhao, X. Deng, W. Leng, J. Peng e Q. Jin. Transcriptional profiles of *Trichophyton rubrum* in response to itraconazole. Med Mycol, v.47, n.3, May, p.237-47. 2009.

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 U S A, v.93, n.12, Jun 11, p.6025-30. 1996.

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.

Ferguson, L. R. e W. A. Denny. Genotoxicity of non-covalent interactions: DNA intercalators. Mutat Res, v.623, Apr 6, p.14-23. 2007.

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.

Garcia, M. X., C. Roberts, H. Alexander, A. M. Stewart, A. Harwood, S. Alexander e R. H. Insall. Methanol and acriflavine resistance in *Dictyostelium* are caused by loss of catalase. Microbiology, v.148, n.Pt 1, Jan, p.333-40. 2002.

Gardner, P. P., J. Daub, J. Tate, B. L. Moore, I. H. Osuch, S. Griffiths-Jones, R. D. Finn, E. P. Nawrocki, D. L. Kolbe, S. R. Eddy e A. Bateman. Rfam: Wikipedia, clans and the "decimal" release. Nucleic Acids Res, v.39, n.Database issue, Jan, p.D141-5. 2011.

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.

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.

Haas, H. Iron - A Key Nexus in the Virulence of *Aspergillus fumigatus*. Front Microbiol, v.3, p.28. 2012.

Haas, H., M. Eisendle e B. G. Turgeon. Siderophores in fungal physiology and virulence. Annu Rev Phytopathol, v.46, p.149-87. 2008.

Hassan, S., D. Laryea, H. Mahteme, J. Felth, M. Fryknas, W. Fayad, S. Linder, L. Rickardson, J. Gullbo, W. Graf, L. Pahlman, B. Glimelius, R. Larsson e P. Nygren. Novel activity of acriflavine against colorectal cancer tumor cells. Cancer Sci, v.102, n.12, Dec, p.2206-13. 2011.

Isa-Isa, R., R. Arenas e M. Isa. Inflammatory tinea capitis: kerion, dermatophytic granuloma, and mycetoma. Clin Dermatol, v.28, n.2, Mar 4, p.133-6. 2010.

Jacob, T. R., N. T. A. 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, Sep 29, p.368-377. 2012.

Jochl, C., M. Rederstorff, J. Hertel, P. F. Stadler, I. L. Hofacker, M. Schrettl, H. Haas e A. Huttenhofer. Small ncRNA transcriptome analysis from *Aspergillus fumigatus* suggests a novel mechanism for regulation of protein synthesis. Nucleic Acids Res, v.36, n.8, May, p.2677-89. 2008.

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. 2010.

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.

Kawasaki, L. e J. Aguirre. Multiple catalase genes are differentially regulated in *Aspergillus nidulans*. J Bacteriol, v.183, n.4, Feb, p.1434-40. 2001.

Kelland, L. R. Overcoming the immortality of tumour cells by telomere and telomerase based cancer therapeutics--current status and future prospects. Eur J Cancer, v.41, n.7, May, p.971-9. 2005.

Keyhani, E., S. Khavari-Nejad, J. Keyhani e F. Attar. Acriflavine-mediated apoptosis and necrosis in yeast *Candida utilis*. Ann N Y Acad Sci, v.1171, Aug, p.284-91. 2009.

Kishore, S. e S. Stamm. The snoRNA HBII-52 regulates alternative splicing of the serotonin receptor 2C. Science, v.311, n.5758, Jan 13, p.230-2. 2006.

Kosman, D. J. Molecular mechanisms of iron uptake in fungi. Mol Microbiol, v.47, n.5, Mar, p.1185-97. 2003.

Kramer, R. e D. Cohen. Functional genomics to new drug targets. Nat Rev Drug Discov, v.3, n.11, Nov, p.965-72. 2004.

Kraus, P. R. e J. Heitman. Coping with stress: calmodulin and calcineurin in model and pathogenic fungi. Biochem Biophys Res Commun, v.311, n.4, Nov 28, p.1151-7. 2003.

Langmead, B., C. Trapnell, M. Pop e S. L. Salzberg. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. Genome Biol, v.10, n.3, p.R25. 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.

Li, W., H. McWilliam, A. R. De La Torre, A. Grodowski, I. Benediktovich, M. Goujon, S. Nauche e R. Lopez. Non-redundant patent sequence databases with value-added annotations at two levels. Nucleic Acids Res, v.38, n.Database issue, Jan, p.D52-6. 2010.

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.

Maranhao, F. C., F. G. Paiao e N. M. Martinez-Rossi. Isolation of transcripts over-expressed in human pathogen *Trichophyton rubrum* during growth in keratin. . microb Pathog, v.43, p.166-172. 2007.

Maranhão, F. C. A., F. G. Paiao, 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.

Marconi, V. C., R. Kradin, F. M. Marty, D. R. Hospenthal e C. N. Kotton. Disseminated dermatophytosis in a patient with hereditary hemochromatosis and hepatic cirrhosis: case report and review of the literature. Med Mycol, v.48, n.3, May, p.518-27. 2010.

Marioni, J. C., C. E. Mason, S. M. Mane, M. Stephens e Y. Gilad. RNA-seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. Genome Res, v.18, n.9, Sep, p.1509-17. 2008.

Marques, S. A., A. M. Robles, A. M. Tortorano, M. A. Tuculet, R. Negroni e R. P. Mendes. Mycoses associated with AIDS in the Third World. Med Mycol, v.38 Suppl 1, p.269-79. 2000.

Martinez-Rossi, N. M. e J. L. Azevedo. Additive effect involving a new locus of benomyl resistance in *Aspergillus nidulans*. Fungal Genet News, v.36, p.50-51. 1989.

Martinez-Rossi, N. M., M. S. Ferreira-Nozawa, M. A. S. Graminha, S. R. Nozawa, A. L. Fachin, E. P. Cervelatti, R. A. Prade e A. Rossi. Molecular aspects of dermatophyte-host interactions. In: K. R.K.S. (Ed.). Fungi in human and animal health. Jodhpur, India: Scientific Publishers, v.9, 2004. Molecular aspects of dermatophyte-host interactions, p.143-165

Martinez-Rossi, N. M., N. T. Peres e A. Rossi. Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. Mycopathologia, v.166, n.5-6, Nov-Dec, p.369-83. 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.381-387. 2012.

Martinez, D. A., B. G. Oliver, Y. Graser, J. M. Goldberg, W. Li, N. M. Martinez-Rossi, M. Monod, E. Shelest, R. C. Barton, E. Birch, A. A. Brakhage, Z. Chen, S. J. Gurr, D. Heiman, J. Heitman, I. Kosti, A. Rossi, S. Saif, M. Samalova, C. W. Saunders, T. Shea, R. C. Summerbell, J. Xu, S. Young, Q. Zeng, B. W. Birren, C. A. Cuomo e T. C. White. Comparative Genome Analysis of *Trichophyton rubrum* and Related Dermatophytes Reveals Candidate Genes Involved in Infection. mBio, v.3, n.5, September/October 2012. 2012.

Mathe, G., K. Triana, P. Pontiggia, D. Blanquet, M. Hallard e C. Morette. Data of pre-clinical and early clinical trials of acriflavine and hydroxy-methyl-ellipticine reviewed, enriched by the experience of their use for 18 months to 6 years in combinations with other HIV1 virostatics. Biomed Pharmacother, v.52, n.9, p.391-6. 1998.

Mathy, A., A. Baldo, L. Schoofs, L. Cambier, V. Defaweux, J. Tabart, F. Marechal, F. Symoens e B. Mignon. Fungalsin and dipeptidyl-peptidase gene transcription in *Microsporum canis* strains isolated from symptomatic and asymptomatic cats. Vet Microbiol, v.146, n.1-2, Nov 20, p.179-82. 2010.

Meneau, I. e D. Sanglard. Azole and fungicide resistance in clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* isolates. Medical Mycology, v.43, May, p.S307-S311. 2005.

Miyamoto, Y., K. Machida, M. Mizunuma, Y. Emoto, N. Sato, K. Miyahara, D. Hirata, T. Usui, H. Takahashi, H. Osada e T. Miyakawa. Identification of *Saccharomyces cerevisiae* isoleucyl-tRNA synthetase as a target of the G1-specific inhibitor Reveromycin A. J Biol Chem, v.277, n.32, Aug 9, p.28810-4. 2002.

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.

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.

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.

Parkhomchuk, D., T. Borodina, V. Amstislavskiy, M. Banaru, L. Hallen, S. Krobitsch, H. Lehrach e A. Soldatov. Transcriptome analysis by strand-specific sequencing of complementary DNA. Nucleic Acids Res, v.37, n.18, Oct, p.e123. 2009.

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

Pereira, M., A. L. Fachin e N. M. Martinez-Rossi. The gene that determines resistance to tioconazole and to acridine derivatives in *Aspergillus nidulans* may have a corresponding gene in *Trichophyton rubrum*. Mycopathologia, v.143, n.2, p.71-5. 1998.

Peres, N. T. A., F. C. Maranhao, A. Rossi e N. M. Martinez-Rossi. Dermatophytes: host-pathogen interaction and antifungal resistance. An Bras Dermatol, v.85, n.5, Oct, p.657-67. 2010a.

Peres, N. T. A., P. R. Sanches, J. P. Falcao, H. C. S. Silveira, F. G. Paiao, F. C. A. Maranhao, D. E. Gras, F. Segato, R. A. Cazzaniga, M. Mazucato, J. R. Cursino-Santos, R. Aquino-Ferreira, A. Rossi e N. M. Martinez-Rossi. Transcriptional profiling reveals the expression of novel genes in response to various stimuli in the human dermatophyte *Trichophyton rubrum*. BMC Microbiol, v.10, p.39. 2010b.

Rocha, E. M., C. B. Almeida e N. M. Martinez-Rossi. Identification of genes involved in terbinafine resistance in *Aspergillus nidulans*. Lett Appl Microbiol, v.35, n.3, p.228-32. 2002.

Rodwell, G. E., C. L. Bayles, L. Towersey e R. Aly. The prevalence of dermatophyte infection in patients infected with human immunodeficiency virus. Int J Dermatol, v.47, n.4, Apr, p.339-43. 2008.

Rogers, P. D. e K. S. Barker. Evaluation of differential gene expression in fluconazole-susceptible and -resistant isolates of *Candida albicans* by cDNA microarray analysis. Antimicrob Agents Chemother, v.46, p.3412-3417. 2002.

Roper, J. A. e E. Kafer. Acriflavine-resistant mutants of *Aspergillus nidulans*. J Gen Microbiol, v.16, n.3, Jun, p.660-7. 1957.

Rosenblad, M. A., N. Larsen, T. Samuelsson e C. Zwieb. Kinship in the SRP RNA family. RNA Biol, v.6, n.5, Nov-Dec, p.508-16. 2009.

Sambrook J, F. E., Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual: Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York-USA. 1989

Sasson, A. e T. P. Michael. Filtering error from SOLiD Output. Bioinformatics, v.26, n.6, Mar 15, p.849-50. 2010.

Scarazzatti, M. E., R. Bonatelli e J. L. Azevedo. Resistance to ethidium bromide in *Aspergillus nidulans*. Experientia, v.35, p.307-308. 1979.

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.

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.

Sganga, G. Fungal infections in immunocompromised patients. Mycoses, v.54 Suppl 4, Dec, p.1-3. 2011.

Sharon, A., A. Finkelstein, N. Shlezinger e I. Hatam. Fungal apoptosis: function, genes and gene function. FEMS Microbiol Rev, v.33, n.5, Sep, p.833-54. 2009.

Silveira, H. C., D. E. Gras, R. A. Cazzaniga, P. R. Sanches, A. Rossi e N. M. Martinez-Rossi. Transcriptional profiling reveals genes in the human pathogen *Trichophyton rubrum* that are expressed in response to pH signaling. Microb Pathog, v.48, n.2, Feb, p.91-6. 2009.

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. 2010.

Steinbach, W. J., R. A. Cramer, Jr., B. Z. Perfect, Y. G. Asfaw, T. C. Sauer, L. K. Najvar, W. R. Kirkpatrick, T. F. Patterson, D. K. Benjamin, Jr., J. Heitman e J. R. Perfect. Calcineurin controls growth, morphology, and pathogenicity in *Aspergillus fumigatus*. Eukaryot Cell, v.5, n.7, Jul, p.1091-103. 2006.

Stie, J. e D. Fox. Calcineurin regulation in fungi and beyond. Eukaryot Cell, v.7, n.2, Feb, p.177-86. 2008.

Suzuki, S., N. Ono, C. Furusawa, B. W. Ying e T. Yomo. Comparison of sequence reads obtained from three next-generation sequencing platforms. PLoS One, v.6, n.5, p.e19534. 2011.

Threlfall, R. J. The agents and biochemistry of *Aspergillus nidulans* resistant to chlorinated nitrobenzene. J Genet Microbiol, v.53, p.35-44. 1968.

Trapnell, C., L. Pachter e S. L. Salzberg. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. Bioinformatics, v.25, n.9, May 1, p.1105-11. 2009.

Trapnell, C., B. A. Williams, G. Pertea, A. Mortazavi, G. Kwan, M. J. Van Baren, S. L. Salzberg, B. J. Wold e L. Pachter. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. Nat Biotechnol, v.28, n.5, May, p.511-5. 2010.

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.

Vena, G. A., P. Chieco, F. Posa, A. Garofalo, A. Bosco e N. Cassano. Epidemiology of dermatophytoses: retrospective analysis from 2005 to 2010 and comparison with previous data from 1975. New Microbiol, v.35, n.2, Apr, p.207-13. 2012.

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.

Wagner, D. K. e P. G. Sohnle. Cutaneous defenses against dermatophytes and yeasts. Clin Microbiol Rev, v.8, n.3, Jul, p.317-35. 1995.

Wainwright, M. Acridine - a neglected antibacterial chromophore. J Antimicrob Chemother, v.47, n.1, Jan, p.1-13. 2001.

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, L., L. Ma, W. Leng, T. Liu, L. Yu, J. Yang, L. Yang, W. Zhang, Q. Zhang, J. Dong, Y. Xue, Y. Zhu, X. Xu, Z. Wan, G. Ding, F. Yu, K. Tu, Y. Li, R. Li, Y. Shen e Q. Jin. Analysis of the dermatophyte *Trichophyton rubrum* expressed sequence tags. BMC Genomics, v.7, p.255. 2006.

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.

Wang, Z. Y., C. R. Thornton, M. J. Kershaw, L. Debaio e N. J. Talbot. The glyoxylate cycle is required for temporal regulation of virulence by the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. Mol Microbiol, v.47, n.6, Mar, p.1601-12. 2003.

Warnock, D. W., B. A. Arthington-Skaggs e R. K. Li. Antifungal drug susceptibility testing and resistance in *Aspergillus*. Drug Resist Updat, v.2, n.5, Oct, p.326-334. 1999.

Weitzman, I. e R. C. Summerbell. The dermatophytes. Clin Microbiol Rev, v.8, n.2, Apr, p.240-59. 1995.

White, T., B. G. Oliver, Y. Gräser e M. R. Henn. Generating and testing molecular hypotheses in the Dermatophytes. Eukaryotic Cell. 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.

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.

Zhang, W., L. Yu, J. Yang, L. Wang, J. Peng e Q. Jin. Transcriptional profiles of response to terbinafine in *Trichophyton rubrum*. Appl Microbiol Biotechnol, v.82, n.6, Apr, p.1123-30. 2009.

Zintel, S., D. Bernhardt, A. Rogowska-Wrzesinska e H. D. Osiewacz. PaCATB, a secreted catalase protecting *Podospora anserina* against exogenous oxidative stress. Aging (Albany NY), v.3, n.8, Aug, p.768-81. 2011.

Anexos

Anexos

Anexo A – Tabela Suplementar 1

Genes diferencialmente expressos em resposta à acriflavina.

3 horas				
ID	3 horas	12 horas	24 horas	Nome do produto gênico
TERG_04160	9.51			hypothetical protein
TERG_03272	9.40			pre-mRNA branch site protein p14
TERG_07875	9.21			integral membrane protein
TERG_03023	9.15			hypothetical protein
TERG_02897	9.08			methylene-fatty-acyl-phospholipid synthase
TERG_01501	8.68			hypothetical protein
TERG_00732	8.59			hypothetical protein
TERG_03159	8.56			hypothetical protein
TERG_07957	8.45			hypothetical protein
TERG_03274	8.44			ammonium transporter MeaA
TERG_05514	8.25			oligosaccharyltransferase subunit ribophorin II
TERG_00854	8.22			hypothetical protein
TERG_00344	8.21			hypothetical protein
TERG_01219	8.15			malate/L-lactate dehydrogenase
TERG_08170	8.14			hypothetical protein
TERG_05137	8.11			microsomal dipeptidase
TERG_06006	7.87			hypothetical protein
TERG_08522	7.86			pyruvate dehydrogenase E1 B-subunit
TERG_08993	7.70			hypothetical protein
TERG_04487	7.69			hypothetical protein
TERG_06506	7.69			hypothetical protein
TERG_07879	7.64			hypothetical protein
TERG_00575	7.62			hypothetical protein
TERG_04531	7.53			hypothetical protein
TERG_02819	7.52			hypothetical protein
TERG_02385	7.51			hypothetical protein
TERG_02734	7.11			hypothetical protein
TERG_05478	6.96			chromatin remodeling complex subunit Arp5
TERG_07970	6.94			hypothetical protein
TERG_01291	6.62			hypothetical protein
TERG_00731	6.53			hypothetical protein
TERG_04504	2.44			hypothetical protein
TERG_07491	2.33			hypothetical protein
TERG_03388	2.18			hypothetical protein
TERG_00616	2.15			sodium transport ATPase
TERG_05363	2.14			hypothetical protein
TERG_04952	2.14			ABC transporter
TERG_04899	2.13			ubiquitin fusion protein

ID	3 horas	12 horas	24 horas	Nome do produto gênico
TERG_03037	2.03			dnaK-type molecular chaperone
TERG_01242	1.94			short chain dehydrogenase/reductase
TERG_06367	1.92			hypothetical protein
TERG_01659	1.92			hypothetical protein
TERG_07260	1.90			hypothetical protein
TERG_00807	1.88			hypothetical protein
TERG_08104	1.88			sodium transport ATPase
TERG_07921	1.86			adenosine 5'-phosphosulfate kinase
TERG_01973	1.86			mRNA cleavage and polyadenylation specificity factor complex subunit
TERG_08609	1.83			UV excision repair protein Rad2
TERG_06315	1.81			hypothetical protein
TERG_03283	1.80			hypothetical protein
TERG_03414	1.80			acetyl-CoA carboxylase
TERG_04521	1.77			hypothetical protein
TERG_04776	1.76			SH3 domain-containing protein
TERG_04662	1.75			protein disulfide isomerase
TERG_02028	1.75			FAS1 domain-containing protein
TERG_02891	1.72			hypothetical protein
TERG_00109	1.71			hypothetical protein
TERG_01871	1.71			acetyl-CoA acetyltransferase
TERG_03464	1.69			stress protein DDR48
TERG_08527	1.69			fatty acid synthase alpha subunit
TERG_00240	1.68			hypothetical protein
TERG_07456	1.68			hypothetical protein
TERG_05484	1.68			acyl-CoA dehydrogenase
TERG_07527	1.67			calnexin
TERG_05769	1.65			D-xylose reductase
TERG_01107	1.65			anthranilate synthase component I
TERG_08405	1.65			leucine aminopeptidase
TERG_01334	1.64			C6 finger domain-containing protein
TERG_07041	1.63			hypothetical protein
TERG_07997	1.63			acetamidase
TERG_07587	1.62			hypothetical protein
TERG_03618	1.61			endochitinase
TERG_07713	1.61			homoserine kinase
TERG_03062	1.61			DnaJ domain-containing protein
TERG_06505	1.61			hsp70-like protein
TERG_07946	1.61			3-ketodihydrosphingosine reductase
TERG_03158	1.60			hypothetical protein
TERG_03781	1.58			pyruvate dehydrogenase complex
TERG_01640	1.58			hypothetical protein
TERG_07764	1.58			protein transporter SEC61 alpha subunit
TERG_04096	1.57			SUMO activating enzyme
TERG_06007	1.57			coatomer subunit alpha

ID	3 horas	12 horas	24 horas	Nome do produto gênico
TERG_08065	1.57			membrane transporter
TERG_04400	1.56			monosaccharide transporter
TERG_05797	1.55			hypothetical protein
TERG_02221	1.54			proteasome subunit beta
TERG_03736	1.54			transcriptional corepressor Cyc8
TERG_07012	1.54			fibrillarin
TERG_05737	1.53			hypothetical protein
TERG_03224	1.52			choline oxidase
TERG_06511	1.52			mitochondrial escape protein 2
TERG_03487	1.51			translocation protein Sec62
TERG_02950	1.51			3',5'-bisphosphate nucleotidase
TERG_00633	1.50			40S ribosomal protein S9
TERG_07216	-1.50			hypothetical protein
TERG_02311	-1.51			hypothetical protein
TERG_03629	-1.51			hypothetical protein
TERG_07159	-1.52			protein kinase subdomain-containing protein
TERG_07987	-1.53			hypothetical protein
TERG_08557	-1.54			serine carboxypeptidase
TERG_02184	-1.56			hypothetical protein
TERG_06993	-1.58			hypothetical protein
TERG_06151	-1.60			pyridoxine kinase
TERG_06707	-1.62			arginase
TERG_06650	-1.65			hypothetical protein
TERG_08422	-1.71			hypothetical protein
TERG_02176	-1.79			small nuclear ribonucleoprotein LSM2
TERG_06333	-1.81			DNA ligase 4
TERG_08213	-1.86			hypothetical protein
TERG_01330	-1.90			hypothetical protein
TERG_08046	-2.01			hypothetical protein
TERG_05617	-2.04			hypothetical protein
TERG_06883	-2.22			hypothetical protein

*Os valores de expressão gênica são expressos em $\log_2$ ratio entre cada condição analisada e o controle (0 hora).

12 horas

ID	3 horas	12 horas	24 horas	Nome do produto gênico
TERG_01685		9.98		glutathione transferase
TERG_05361		9.03		cript family protein
TERG_06053		8.37		catalase
TERG_08680		2.20		hypothetical protein
TERG_05284		2.18		hypothetical protein
TERG_06647		1.92		hypothetical protein
TERG_08979		1.91		CMGC/SRPK protein kinase
TERG_02369		1.81		MFS transporter
TERG_03896		1.78		mannose-6-phosphate isomerase
TERG_00020		1.72		SH3 domain-containing protein
TERG_08059		1.70		membrane transporter
TERG_04518		1.70		chromatin assembly factor 1 subunit C
TERG_01062		1.68		hypothetical protein
TERG_06500		1.62		mitochondrial carrier protein
TERG_08431		1.61		hypothetical protein
TERG_00614		1.61		dihydrodipicolinate synthetase
TERG_05175		1.60		hypothetical protein
TERG_07323		1.58		hypothetical protein
TERG_07672		1.56		GABA permease
TERG_01738		1.55		hypothetical protein
TERG_07876		1.55		hypothetical protein
TERG_08054		1.53		homoserine acetyltransferase
TERG_06504		1.53		hypothetical protein
TERG_07802		1.50		aerobactin siderophore biosynthesis protein iucB
TERG_08825		-1.61		hypothetical protein
TERG_02303		-1.62		ankyrin repeat protein
TERG_05558		-1.68		ornithine decarboxylase
TERG_07518		-1.72		histidyl-tRNA synthetase
TERG_08961		-1.81		hypothetical protein
TERG_05828		-1.83		DNA excision repair protein
TERG_06116		-1.84		indoleamine 2,3-dioxygenase
TERG_01550		-2.23		60S ribosomal protein L38
TERG_01496		-2.24		hypothetical protein
TERG_00298		-5.85		hypothetical protein

24 horas

ID	3 horas	12 horas	24 horas	Nome do produto gênico
TERG_00209			11.66	hypothetical protein
TERG_05855			9.73	ZIP zinc transporter
TERG_06788			9.66	zinc/iron transporter
TERG_02583			9.58	phosphate permease
TERG_05445			4.15	hypothetical protein
TERG_00911			3.46	hypothetical protein
TERG_00967			3.24	hypothetical protein
TERG_08353			2.97	cytochrome P450
TERG_01956			2.91	hypothetical protein
TERG_05270			2.85	C2H2 finger domain-containing protein
TERG_03172			2.79	sodium/phosphate symporter
TERG_07469			2.64	hypothetical protein
TERG_04107			2.58	hypothetical protein
TERG_02278			2.49	hypothetical protein
TERG_05615			2.43	hypothetical protein
TERG_00714			2.36	cell pattern formation-associated protein
TERG_08228			2.32	sphinganine hydroxylase
TERG_03762			2.21	malate dehydrogenase
TERG_08503			2.11	hypothetical protein
TERG_02809			1.99	hypothetical protein
TERG_07274			1.99	hypothetical protein
TERG_08982			1.96	hypothetical protein
TERG_00595			1.96	mitogen-activated protein kinase MAF1
TERG_07832			1.93	hypothetical protein
TERG_04855			1.90	hypothetical protein
TERG_01672			1.86	hypothetical protein
TERG_06759			1.85	C2H2 transcription factor
TERG_08380			1.84	hypothetical protein
TERG_01256			1.81	60S ribosomal protein L14
TERG_02818			1.77	hypothetical protein
TERG_04382			1.75	c-14 sterol reductase
TERG_03923			1.73	hypothetical protein
TERG_08090			1.73	plasma membrane iron permease
TERG_01623			1.72	MFS transporter
TERG_05178			1.69	nuclear and cytoplasmic polyadenylated RNA-binding protein pub1
TERG_02198			1.68	CAMK protein kinase
TERG_07681			1.68	hypothetical protein
TERG_08023			1.68	NAD(P) transhydrogenase
TERG_01994			1.67	hypothetical protein
TERG_07555			1.67	CAMKK protein kinase
TERG_04042			1.66	serine/threonine protein kinase
TERG_00838			1.65	zinc finger transcription factor pacC
TERG_07236			1.65	hypothetical protein

ID	3 horas	12 horas	24 horas	Nome do produto gênico
TERG_05381			1.64	Na(+)/H(+) antiporter
TERG_07199			1.64	hypothetical protein
TERG_05971			1.64	ribonucleotide reductase small subunit RnrA
TERG_08141			1.63	hypothetical protein
TERG_05524			1.61	phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase
TERG_00243			1.60	hypothetical protein
TERG_00976			1.60	serine hydroxymethyltransferase
TERG_00625			1.59	Glucanosyltransferase
TERG_00393			1.56	hypothetical protein
TERG_05518			1.54	short chain dehydrogenase
TERG_01127			1.54	glucan synthase
TERG_05832			1.54	serine/threonine protein phosphatase
TERG_01731			1.53	hypothetical protein
TERG_00802			1.52	hypothetical protein
TERG_07810			1.50	hypothetical protein
TERG_02450			-1.50	phosphoserine phosphatase
TERG_04726			-1.50	nuclear transcription factor Y subunit B-7
TERG_03684			-1.51	stress activated MAP kinase interacting protein
TERG_00174			-1.51	anion-transporting ATPase
TERG_03307			-1.52	hypothetical protein
TERG_02063			-1.52	hypothetical protein
TERG_00278			-1.53	electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase
TERG_03263			-1.53	GTPase activating protein Gyp1
TERG_04363			-1.53	cysteine synthase
TERG_05265			-1.53	DEAD/DEAH box helicase
TERG_03221			-1.53	C6 transcription factor
TERG_01165			-1.54	40S ribosomal protein S10-A
TERG_03102			-1.54	sterol 24-C-methyltransferase
TERG_02603			-1.54	hypothetical protein
TERG_02788			-1.56	DNA-directed RNA polymerase I
TERG_06113			-1.56	hypothetical protein
TERG_02532			-1.56	hypothetical protein
TERG_01588			-1.56	60S ribosome biogenesis protein Mak11
TERG_02237			-1.56	30S ribosomal protein S28e
TERG_03804			-1.58	dihydroxyacid dehydratase
TERG_04983			-1.58	histone acetyltransferase E
TERG_08336			-1.59	MFS multidrug transporter
TERG_02886			-1.59	hypothetical protein
TERG_01163			-1.59	hypothetical protein
TERG_04512			-1.60	transcriptional regulator Cwf13/SkiP
TERG_07525			-1.60	methionine aminopeptidase
TERG_07058			-1.61	hypothetical protein
TERG_04852			-1.61	U-box domain-containing protein
TERG_02283			-1.61	MFS transporter

ID	3 horas	12 horas	24 horas	Nome do produto gênico
TERG_02644			-1.62	hypothetical protein
TERG_02325			-1.62	T-complex protein 1
TERG_01603			-1.63	hypothetical protein
TERG_05257			-1.63	integral membrane protein
TERG_03494			-1.64	hypothetical protein
TERG_03654			-1.65	NADH-cytochrome b5 reductase
TERG_06187			-1.65	nucleolar ATPase Kre33
TERG_00903			-1.65	SNF7 family protein
TERG_04139			-1.65	hypothetical protein
TERG_04692			-1.66	replication factor A 1
TERG_04951			-1.66	hypothetical protein
TERG_06398			-1.66	Hsp90 co-chaperone Cdc37
TERG_06090			-1.67	C2H2 transcription factor
TERG_00008			-1.68	MFS phospholipid transporter
TERG_00075			-1.70	hypothetical protein
TERG_03516			-1.73	mitochondrial dicarboxylate Carrier
TERG_03933			-1.73	ABC metal ion transporter
TERG_07779			-1.75	LCCL domain-containing protein
TERG_00961			-1.75	T-complex protein 1
TERG_01310			-1.75	nascent polypeptide-associated complex subunit beta
TERG_06103			-1.76	uroporphyrinogen decarboxylase
TERG_06846			-1.77	IMP dehydrogenase
TERG_05827			-1.77	sphingolipid long chain base-responsive protein PIL1
TERG_08367			-1.79	aconitate hydratase
TERG_07897			-1.79	CCAAT-box-binding transcription factor
TERG_06207			-1.80	hypothetical protein
TERG_02491			-1.81	glutaryl-CoA dehydrogenase
TERG_06177			-1.81	peroxisomal carrier protein
TERG_04807			-1.81	Aminotransferase
TERG_01281			-1.83	malate synthase
TERG_01597			-1.84	small nucleolar ribonucleoprotein complex subunit
TERG_06451			-1.84	nucleolus protein required for cell viability
TERG_02031			-1.84	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase
TERG_07639			-1.85	atypical/ABC1/ABC1-B protein kinase
TERG_03202			-1.86	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C
TERG_00217			-1.88	Ubiquitin
TERG_03935			-1.89	hypothetical protein
TERG_01002			-1.90	chaperone dnaK
TERG_02979			-1.91	Delta(24(24(1)))sterol reductase
TERG_07157			-1.91	hypothetical protein
TERG_03262			-1.92	dimethyladenosine transferase dimethyltransferase
TERG_00069			-1.93	Fumarylacetoacetase
TERG_02078			-1.93	thiamine biosynthesis protein Nmt1
TERG_02172			-1.95	cytochrome P450 monooxygenase
TERG_00232			-1.95	rRNA processing protein Nop9

ID	3 horas	12 horas	24 horas	Nome do produto gênico
TERG_02833			-1.95	hypothetical protein
TERG_06078			-1.96	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit
TERG_06147			-2.02	rubredoxin-NAD(+) reductase
TERG_00604			-2.02	nucleolar protein 16
TERG_06792			-2.03	hypothetical protein
TERG_04686			-2.04	porphobilinogen synthase
TERG_07027			-2.08	MFS drug transporter
TERG_03292			-2.10	NADH-ubiquinone oxidoreductase 24 kDa subunit
TERG_03360			-2.10	prolyl peptidase
TERG_00181			-2.10	nucleolar protein NOP58
TERG_06522			-2.10	mitochondrial cytochrome b2
TERG_00281			-2.16	AGC/RSK protein kinase
TERG_07140			-2.17	serine/threonine protein kinase
TERG_07585			-2.18	Emp24/gp25L/p24 membrane trafficking protein
TERG_06452			-2.20	purine nucleoside phosphorylase
TERG_06573			-2.25	calcineurin regulatory subunit B
TERG_05058			-2.26	thiamine pyrophosphokinase
TERG_05388			-2.27	ribosome biogenesis protein
TERG_06783			-2.28	nucleolar GTP-binding protein
TERG_00820			-2.30	MFS multidrug resistance transporter
TERG_03780			-2.53	hypothetical protein
TERG_03455			-2.70	isochorismatase family hydrolase
TERG_00067			-2.89	hypothetical protein
TERG_00546			-3.04	Glutaredoxin
TERG_04238			-3.38	cation-transporting ATPase
TERG_03385			-9.43	hypothetical protein

3 e 12 horas

ID	3 horas	12 horas	24 horas	Nome do produto gênico
TERG_00500	8.43	9.57		hypothetical protein
TERG_02069	8.75	9.54		hypothetical protein
TERG_07426	8.55	9.25		hypothetical protein
TERG_05520	8.63	8.79		hypothetical protein
TERG_03127	7.32	8.70		hypothetical protein
TERG_08976	8.46	8.43		hypothetical protein
TERG_03764	8.02	8.35		hypothetical protein
TERG_08259	7.02	8.16		hypothetical protein
TERG_01658	3.18	3.16		hypothetical protein
TERG_00856	2.35	2.56		hypothetical protein
TERG_00580	3.31	2.55		7-dehydrocholesterol reductase
TERG_02001	1.86	2.49		oligopeptidase
TERG_04765	2.30	2.35		hypothetical protein
TERG_01507	2.37	2.29		hypothetical protein
TERG_08264	1.64	2.20		mannitol dehydrogenase
TERG_06757	2.89	2.18		hypothetical protein
TERG_07928	2.18	2.11		hypothetical protein
TERG_00624	2.44	2.07		actin polymerization protein Bzz1
TERG_01122	1.94	1.95		hypothetical protein
TERG_03597	1.78	1.93		integral membrane protein
TERG_07566	2.48	1.88		hypothetical protein
TERG_00250	1.62	1.78		N-acetylglucosamine-phosphate mutase
TERG_04125	1.71	1.73		citrate synthase
TERG_02140	1.70	1.64		bZIP transcription factor
TERG_08388	1.71	1.56		hypothetical protein
TERG_04103	-1.87	-1.51		hypothetical protein
TERG_06250	-1.81	-1.54		hypothetical protein
TERG_03303	-1.52	-1.73		extracellular 3-ketosteroid 1-dehydrogenase
TERG_02012	-1.67	-2.03		hypothetical protein
TERG_08231	-2.21	-2.21		hypothetical protein
TERG_01981	-1.78	-2.24		hypothetical protein

3 e 24 horas

ID	3 horas	12 horas	24 horas	Nome do produto gênico
TERG_05040	1.74		3.01	hypothetical protein
TERG_03234	1.80		2.51	hypothetical protein
TERG_02447	2.25		2.30	ATP sulphurylase
TERG_07631	1.74		2.10	hypothetical protein
TERG_02787	2.34		2.00	protein kinase subdomain-containing protein
TERG_07595	1.61		1.62	hypothetical protein
TERG_08288	1.88		1.59	ATP-citrate synthase subunit 1
TERG_00762	1.55		1.58	vesicle-fusing ATPase
TERG_01443	1.80		1.52	ABC multidrug transporter
TERG_00121	-1.72		-1.53	FAD dependent oxidoreductase
TERG_06553	-1.81		-1.55	hypothetical protein
TERG_06270	-1.77		-1.55	hypothetical protein
TERG_00865	1.78		-1.63	hypothetical protein
TERG_04290	-1.78		-1.68	D-arabinitol dehydrogenase
TERG_03368	-1.69		-1.72	hypothetical protein
TERG_08619	-2.76		-1.72	siderophore iron transporter
TERG_03605	-1.54		-1.83	mitochondrial ribosomal protein L16
TERG_03708	-1.90		-1.88	hypothetical protein
TERG_03364	-2.00		-1.99	hypothetical protein
TERG_05899	-1.69		-2.20	hypothetical protein
TERG_03363	-1.66		-2.46	GABA permease
TERG_08620	-2.25		-2.61	siderophore iron transporter mirB
TERG_07539	-1.64		-3.49	hypothetical protein
TERG_08906	-1.62		-8.74	hypothetical protein

12 e 24 horas

ID	3 horas	12 horas	24 horas	Nome do produto gênico
TERG_00698		9.42	10.63	L-ornithine 5-monooxygenase
TERG_02132		8.23	8.71	hypothetical protein
TERG_02242		2.82	5.02	hypothetical protein
TERG_03174		3.69	4.97	siderochrome-iron transporter Sit1
TERG_00511		2.54	3.72	hypothetical protein
TERG_00697		2.79	3.51	non-ribosomal peptide synthetase
TERG_07801		2.60	3.13	ABC multidrug transporter Mdr4
TERG_04228		1.77	3.13	hypothetical protein
TERG_06267		1.61	3.13	hypothetical protein
TERG_03145		1.61	3.03	hypothetical protein
TERG_00509		1.89	2.78	hypothetical protein
TERG_08201		1.55	2.63	serine protease
TERG_04240		2.12	2.59	hypothetical protein
TERG_08102		1.77	2.45	3-isopropylmalate dehydrogenase A
TERG_02177		1.55	2.43	hypothetical protein
TERG_04862		2.26	2.37	C6 sexual development transcription factor NosA
TERG_02454		2.02	2.30	deoxyribose-phosphate aldolase
TERG_02984		1.83	2.28	cytochrome P450 51
TERG_04234		1.79	2.24	hypothetical protein
TERG_00520		2.03	2.23	hypothetical protein
TERG_01494		2.10	2.14	hypothetical protein
TERG_07241		1.75	2.06	saccharopine dehydrogenase
TERG_08983		1.55	2.00	hypothetical protein
TERG_05651		1.79	1.95	hypothetical protein
TERG_02367		1.54	1.88	hypothetical protein
TERG_00830		1.60	1.57	hypothetical protein
TERG_04105		1.91	1.57	cyclin domain-containing protein
TERG_00456		1.64	1.52	cysteine dioxygenase
TERG_04323		-1.60	-1.56	hypothetical protein
TERG_04194		-1.61	-1.72	acyltransferase
TERG_02256		-1.67	-1.77	hypothetical protein
TERG_08130		-1.70	-1.77	ABC transporter
TERG_07346		-1.62	-1.79	tRNA ligase
TERG_01811		-1.92	-1.85	lipase
TERG_03625		-1.62	-1.94	hypothetical protein
TERG_02174		-2.32	-1.96	hypothetical protein
TERG_08278		-1.84	-1.99	serine/threonine protein kinase
TERG_00959		-1.94	-2.04	hypothetical protein
TERG_04020		-2.18	-2.06	polymerase
TERG_08613		-1.70	-2.14	multidrug resistance protein
TERG_01644		-1.70	-2.15	SNF2 family helicase/ATPase
TERG_02942		-1.78	-2.22	hypothetical protein
TERG_05450		-2.16	-2.23	acetyltransferase
TERG_07215		-1.90	-2.26	hypothetical protein

ID	3 horas	12 horas	24 horas	Nome do produto gênico
TERG_02029		-1.63	-2.31	hypothetical protein
TERG_07906		-1.72	-2.37	hypothetical protein
TERG_05153		-1.89	-2.37	MFS transporter
TERG_00068		-2.24	-2.45	homogentisate 1,2-dioxygenase
TERG_03380		-1.99	-2.67	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
TERG_00825		-2.18	-2.69	isocitrate lyase
TERG_04612		-1.63	-2.76	branched-chain-amino-acid aminotransferase
TERG_05668		-1.69	-2.80	hypothetical protein
TERG_05816		-3.15	-2.82	hypothetical protein
TERG_06938		-1.95	-3.01	zinc metallopeptidase
TERG_03529		-1.78	-3.11	hypothetical protein
TERG_05332		-1.61	-3.12	mitochondrial carrier protein
TERG_03337		-2.58	-3.16	hypothetical protein
TERG_07214		-1.78	-3.29	DlpA domain-containing protein
TERG_00066		-2.58	-3.32	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase
TERG_01346		-2.83	-3.40	lipase/serine esterase
TERG_01609		-2.80	-3.66	Na/K ATPase alpha 1 subunit

3, 12 e 24 horas

ID	3 horas	12 horas	24 horas	Nome do produto gênico
TERG_01497	5.50	5.38	6.39	protein kinase subdomain-containing protein
TERG_05744	2.26	2.76	4.29	GTP-binding protein EsdC
TERG_07143	4.09	2.94	3.15	potassium/sodium efflux P-type ATPase
TERG_00710	2.22	1.71	3.03	hypothetical protein
TERG_03678	1.56	1.61	2.83	hypothetical protein
TERG_01252	1.70	2.45	2.80	catalase
TERG_08286	1.90	1.96	2.60	hypothetical protein
TERG_00501	1.75	2.00	2.54	hypothetical protein
TERG_06727	1.80	2.25	2.37	homoserine dehydrogenase
TERG_08287	1.98	1.75	2.34	ATP-citrate-lyase
TERG_01444	2.31	1.71	1.81	nonribosomal peptide synthase
TERG_02610	-1.53	-2.86	-1.54	YjgH family protein
TERG_02199	-2.36	-2.62	-1.70	glutamate carboxypeptidase
TERG_02261	-1.54	-1.53	-1.90	pyruvate formate lyase activating enzyme
TERG_05655	-1.69	-1.79	-1.93	AN1 zinc finger protein
TERG_05039	-1.72	-2.37	-1.96	hypothetical protein
TERG_06220	-2.25	-1.86	-1.97	hypothetical protein
TERG_04458	-1.62	-1.95	-1.99	inosine triphosphate pyrophosphatase
TERG_04915	-1.60	-2.09	-2.06	alpha/beta hydrolase
TERG_07351	-1.85	-2.06	-2.07	hypothetical protein
TERG_03166	-1.67	-1.68	-2.14	hypothetical protein
TERG_05625	-2.09	-1.97	-2.15	hypothetical protein
TERG_06909	-1.95	-1.93	-2.19	succinate-semialdehyde dehydrogenase
TERG_02196	-1.72	-1.75	-2.25	l-allo-threonine aldolase
TERG_00402	-1.60	-2.10	-2.25	multidrug resistance protein
TERG_00955	-1.66	-1.79	-2.29	ABC efflux transporter
TERG_05917	-1.56	-1.90	-2.30	hypothetical protein
TERG_07008	-1.90	-1.77	-2.33	acetylornithine deacetylase
TERG_06730	-1.68	-2.15	-2.36	hypothetical protein
TERG_01893	-1.92	-2.36	-2.39	hypothetical protein
TERG_02528	-2.06	-2.82	-2.42	arsenic methyltransferase Cyt19
TERG_00709	-2.38	-2.22	-2.47	hypothetical protein
TERG_05106	-3.12	-2.61	-2.56	hypothetical protein
TERG_08622	-2.52	-1.56	-2.56	transferase
TERG_00073	-1.88	-1.85	-2.61	NADH-dependent flavin oxidoreductase
TERG_06161	-2.42	-2.26	-2.66	multidrug resistance protein
TERG_06445	-2.30	-3.77	-2.74	hypothetical protein
TERG_05849	-1.84	-1.59	-2.80	thioredoxin reductase
TERG_07427	-2.58	-2.45	-2.82	hypothetical protein
TERG_03855	-1.92	-2.48	-2.90	hypothetical protein
TERG_05409	-1.84	-2.94	-2.98	FAD dependent oxidoreductase
TERG_00523	-2.40	-3.90	-3.01	hypothetical protein
TERG_02538	-1.99	-2.84	-3.18	hypothetical protein
TERG_06701	-2.68	-3.38	-3.19	gamma-glutamyltranspeptidase

ID	3 horas	12 horas	24 horas	Nome do produto gênico
TERG_00227	-1.72	-3.05	-3.25	glutathione S-transferase
TERG_03443	-2.66	-2.40	-3.30	hypothetical protein
TERG_04303	-3.98	-3.33	-3.31	hypothetical protein
TERG_07408	-2.51	-3.14	-3.38	hypothetical protein
TERG_03712	-2.00	-2.70	-3.44	hypothetical protein
TERG_04146	-2.40	-2.77	-3.47	FAD binding domain-containing protein
TERG_03352	-2.23	-2.74	-3.48	tyrosine decarboxylase
TERG_00736	-3.14	-3.47	-3.54	hypothetical protein
TERG_05677	-2.24	-2.64	-3.59	hypothetical protein
TERG_02400	-1.93	-3.01	-3.62	amino acid permease
TERG_06679	-2.67	-3.26	-3.82	hypothetical protein
TERG_07734	-2.47	-4.04	-3.93	O-methyltransferase
TERG_01338	-3.01	-3.77	-3.93	hypothetical protein
TERG_01401	-3.78	-2.15	-4.06	high affinity copper transporter
TERG_02214	-2.59	-3.51	-4.20	zinc carboxypeptidase
TERG_03009	-1.83	-3.11	-4.21	hypothetical protein
TERG_07139	-2.54	-4.14	-4.26	hypothetical protein
TERG_06466	-2.97	-3.98	-4.56	hypothetical protein
TERG_08129	-3.48	-3.71	-4.64	amino acid permease
TERG_07861	-2.54	-3.61	-4.81	subtilase
TERG_01859	-3.58	-2.32	-9.11	hypothetical protein
TERG_01454	-3.56	-2.81	-9.47	microsomal dipeptidase
TERG_05545	-2.86	-4.39	-10.50	hypothetical protein
TERG_05854	-3.63	-3.98	-11.20	beta-lactamase
TERG_02517	-3.70	-5.45	-12.32	hypothetical protein

Anexo de Publicação

Role of pH in the pathogenesis of dermatophytoses

Nilce M. Martinez-Rossi,¹ Gabriela F. Persinoti,¹ Nalu T. A. Peres¹ and Antonio Rossi²

¹Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil and ²Departamento de Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

Summary

The secretion of proteolytic enzymes by dermatophytes is a key factor in their invasion and subsequent dissemination through the stratum corneum of the host. During the first stages of infection, dermatophytes respond to the skin by de-repressing a number of genes coding for proteins and enzymes such as adhesins, lipases, phosphatases, DNases, non-specific proteases, and keratinases. These proteins have their optimal activity at acidic pH values, which matches the acidic pH of human skin, allowing the pathogen to adhere and penetrate the host tissue, scavenge nutrients and overcome host defence mechanisms. The conserved PacC/Rim101p signal transduction pathway mediates diverse metabolic events involved in ambient pH sensing and in the virulence of pathogenic microorganisms. The seven dermatophyte genomes analysed here revealed the presence of the PacC/Rim101p pH-responsive signal transduction pathway, which consists of the six *pal* genes (*palA*, *B*, *C*, *F*, *H* and *I*) and the transcription factor PacC. The PacC binding site was present in the promoter regions of *pacC*, *palB*, *palI* and *palH* genes of all dermatophytes, suggesting functional equivalency with the signalling cascade of other fungi. Moreover, the promoter region of *pacC* gene of the seven dermatophytes had multiple PacC DNA-binding sites, suggesting that these genes, like their homologues in model fungi, are auto-regulated.

Key words: Dermatophytes, pH, *pacC* gene, dermatophytoses, *Trichophyton rubrum*.

Introduction

Dermatophytosis is caused by a select group of filamentous keratinolytic fungi, the dermatophytes, specialised in the colonisation of skin, hair and nails of humans and animals. Dermatophytes are closely related to each other phylogenetically, and represent one of the most common superficial fungal infections in the world.¹ They belong to three anamorphic (asexual or imperfect) genera, *Epidermophyton*, *Microsporum* and *Trichophyton*, and have long been classified as anthropophilic, zoophilic and geophilic fungi on the basis of their primary habitat

associations. When dermatophytes infect humans, they colonise the keratinised outermost layer of the skin, and they usually do not invade living tissue. These infections include tinea capitis (infection of the scalp), tinea pedis (infection of the feet), tinea cruris (infection of the groin area) and tinea unguium or onychomycosis (infection of the nails). However, the disease, generally known as tinea or ringworm, may be a consequence of the host inflammatory reaction to the enzymes secreted by the fungus during its invasive process.² Dermatophytic infections are variable in their manifestations due to the combination of a set of factors encountered by the dermatophyte during its interaction with the host. Throughout the infection process, dermatophyte–host interactions trigger specific metabolic adaptations that allow the pathogen to adhere to and penetrate the host tissue, scavenge nutrients and overcome the host defence mechanisms.³ Thus, coordination of environment sensing, nutrient stimuli and host-defence with control of the genetic responses to these molecular signals is crucial for dermatophytes to successfully colonise and invade the target host.

Correspondence: N. M. Martinez-Rossi, Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Tel.: +55 16 3602 3150. Fax: +55 16 3633 0069.

E-mail: nmmrossi@usp.br

Submitted for publication 22 September 2011

Revised 11 November 2011

Accepted for publication 15 November 2011

In this review, we focus on the role of the skin pH in dermatophytosis and the possible mechanisms involved in the adaptive response of dermatophytes to ambient pH changes. Model fungi, in which the pH regulatory system has been extensively characterised, were used as comparative examples.

Significance of skin surface pH

Numerous studies, starting at the end of the nineteenth century, have confirmed the acidic nature of the skin and nail plates.⁴ The average skin surface and nail plate pH is 4.7, with the skin presenting a pH gradient in which the upper layers are acidic and the pH increases in the deeper layers,⁵ whereas the pH of the nail plate surface is apparently higher than its interior.⁶ The skin pH gradient is important for the proper regulation of the activity of enzymes involved in the keratinisation process that is essential for the removal of dead cells and renewal of the stratum corneum, which prevents the colonisation of the skin by harmful microorganisms.⁴

The acidic character of the skin results from a combination of several molecules derived from epidermal cells, glands and even the resident flora. The molecules that are likely to provide an acidic environment in the skin are the filaggrin-histidine-urocanic acid pathway-related breakdown products, some amino acids and alpha-hydroxy acids derived from sweat, acidic lipids such as cholesterol sulphate and free fatty acids, which may come from sebaceous secretions.^{7–12} Furthermore, the skin surface bears a mutualistic symbiotic relationship with its microflora, in which the human skin provides the proper environment for the resident microflora to survive, reinforcing the host defences against infectious diseases.^{13,14} The microflora also participates in the acidification of the skin with the hydrolysis of the sebum triglycerides releasing free fatty acids.¹⁵ However, molecules that increase the pH, such as ammonia, carbon dioxide and bicarbonate, are also present in the skin.⁵ Thus, the maintenance of skin pH is a complex biochemical process, with the combination of various components being probably responsible for sustaining an acidic environment.⁴

The skin surface represents an important antimicrobial barrier associated with an inhibitory effect of specific fatty acids derived from skin lipids.^{11,12} It is already known that the acidic pH is at least part of our defence against growth of microorganisms, mainly because a number of microbial infections are commonly associated with higher skin pH values. Moreover, acidification of the stratum corneum is required for

the formation of a functionally competent permeability barrier that is involved in several key stratum corneum functions.^{9,16} The anthropophilic species, *Trichophyton rubrum*, grows well in an acidic medium (pH 4.0), which corresponds to the human skin surface pH, shifting the pH of the medium from acidic to alkaline pH values (pH 8.3–8.9).¹⁷ In this way, during the first stages of infection, dermatophytes respond to environmental pH by de-repressing an offensive arsenal represented by a number of genes encoding proteins and enzymes such as adhesins, lipases, phosphatases, DNases, non-specific proteases and keratinases that have optimum activity at acidic pH values, which matches the acidic nature of the human skin, allowing the pathogen to adhere and penetrate the host tissue, scavenge nutrients and overcome the host defence mechanisms. The hydrolysis of skin proteins releases amino acids such as glycine, whose metabolism leads to the secretion of ammonia shifting the extracellular pH value from acidic to alkaline, thus contributing to host tissue damage and thereby enhancing the virulence of the dermatophytes. In *T. rubrum*, the transcription of the gene encoding acetamidase is stimulated in an acidic milieu. This enzyme hydrolyses acetamide, releasing acetate and ammonia. Acetate is metabolised to acetyl-CoA by acetyl-CoA synthase, suggesting that ambient alkalisation is correlated with the metabolism of acetate, concomitant with the secretion of ammonia. During the growth of *T. rubrum* on glycine, keratin or triglycerides as the carbon source, the extracellular pH shifts from acidic to alkaline, reaching pH values of 7.8–8.9.^{18,19} The dermatophytes respond to ambient pH changes by adjusting the synthesis of the pathogenic arsenal at pH values at which it can function effectively; for instance, active acid and alkaline keratinases are secreted at acid pH and alkaline pH respectively.^{3,20–23} Moreover, growth on keratin causes the overexpression of genes encoding several proteases and membrane transporter proteins that are only slightly expressed when the initial culture pH is adjusted to 8.0, and glucose is used as the carbon source. This suggests that the combination of an ambient pH shift and keratin as the carbon source are necessary to induce the expression of these genes, possibly an efficient strategy for the successful installation, development and maintenance of the dermatophytes in the host.

The pH-responsive signal transduction pathway

The PacC/Rim101 pH-responsive signal transduction pathway, which consists of the six *pal* genes (*palA*, *B*, *C*,

Figure 1 Protein interaction domains recognised in the dermatophytes' PacC/Pal homologues. PacC protein is characterised by three zinc-fingers and two YPXL/I motifs. All dermatophytes present the domains highlighted, including *T. verrucosum* *pacC* gene, which was manually reviewed and re-annotated.

F, *H* and *I*) and the zinc-finger transcription factor PacC, is highly conserved among fungi, including the dermatophytes (Fig. 1). The Pal signalling cascade is involved in the activation of PacC in response to changes in ambient pH. PalI and PalH are predicted transmembrane domain proteins; PalF is an arrestin-related protein; PalC, like PalA, contains a BRO1 domain; and PalB is a nuclear calpain-like protease involved in the PacC specific-proteolysis, necessary for its activation. It has been recently demonstrated that, in *Aspergillus nidulans*, the PalF–PalH complex acts upstream of or at the level of PalC,²⁴ thus transmitting the ambient pH signal to the downstream elements of this regulatory pathway (PacC, PalA, and PalB). The PacC/Rim101 regulatory cascade mediates, in *T. rubrum* and possibly in other dermatophytes, a myriad of metabolic events involved in the secretion of a number of hydrolytic enzymes, membrane remodelling, adhesion, cellular transport, growth, development, iron uptake, stress, defence and virulence at either acid or alkaline pHs.²² This indicates that, in *T. rubrum*, PacC has a diversity of metabolic functions in response to acidic and alkaline extracellular pHs, as already reported for *A. nidulans*^{25,26} and *Neurospora crassa*.^{27,28} In *A. nidulans*, the gene *palA* is required for the transcription of the genes *atp9* (mitochondrial ATP synthase) and *mfs* (MFS transporter) at acid pH, whereas *palC* is required for the induction of these same genes at alkaline pH,²⁶ suggesting that the *palA* and *palC* genes may act independently in the induction of these genes, and probably many others, in response to ambient pH changes.

The PacC/Pal signalling cascade and the infectious process

It is well documented that *in vitro* growth of the pathogen, *T. rubrum*, is dependent on the initial culture pH, with an apparent optimum at pH 4.0–5.0, in combination with an ambient pH shift from acidic to alkaline values during keratin utilisation as the carbon source.^{29,30} *T. rubrum* and other dermatophytes have limited mycelial growth in cultures buffered at both pH 5.0 and pH 8.0¹⁷ (Fig. 2). Nevertheless, a number of genes were identified as preferentially expressed in *T. rubrum* incubated at either pH 5.0 or pH 8.0; that is, although the basic metabolic machinery seemed to be functionally similar, distinct genes are up-regulated at acidic or alkaline pHs.²² The genes earlier expressed at either acidic or alkaline pH values are probably involved in the initial stages of the dermatophyte infection and maintenance in the host tissues respectively. The progressive alkalinisation of the growth medium is sensed by the dermatophyte, being the ambient pH signal transmitted downstream to the Pal elements that will activate the transcription factor PacC. The activated PacC protein mediates the expression of a large number of genes, including several proteases and membrane transporter protein encoding genes such as keratinolytic enzymes, contributing to the maintenance of dermatophytoses. Thus, given that dermatophytoses can be transmitted by direct contact, during dissemination of the arthroconidia and transmission of the infection to different hosts and/or anatomical sites, the dermatophytes migrate from an alkaline to an acidic environment. This involves the sensing of acid pH that triggers specific metabolic adaptations re-starting the pH-sensing cycle.

The functioning of PacC protein

The transcription factor PacC of *T. rubrum* is homologous to Rim101p (*Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*) and PacC (*A. nidulans* and *N. crassa*), among others, which regulates pH-conditioned gene expression in eukaryotic microorganisms. Transcription profiling in *T. rubrum* revealed a myriad of genes that were activated or repressed by the product of the *pacC* gene at either acid or alkaline pH.¹⁸ Of note, alkalinisation of the culture medium during growth of *T. rubrum* was not affected by the disruption of the *pacC* gene. Indeed, the gene encoding acetamidase, which correlates with the metabolism of acetate concomitant with the secretion of ammonia, was stimulated in both control and *pacC-1* mutant strains in an acidic milieu.²² Moreover, the

Figure 2 Growth *in vitro* of dermatophytes. All plates were inoculated with the following strains as indicated on the first plate: (1) *T. equinum* CBS127.97; (2) *T. rubrum* CBS118892; (3) *T. rubrum* ATCC MYA-3108; (4) *T. rubrum* *pacC*-1²¹; (5) *M. canis* CBS113480; and (6) *M. gypseum* CBS118893. All CBS strains were donated by the Centraalbureau voor Schimmelcultures (The Netherlands) and sequenced by the Broad Institute. When indicated, the minimal medium (MM)⁴⁰ was supplemented with 50 mmol l⁻¹ glycine, buffered with 50 mmol l⁻¹ sodium citrate (pH 5.0) or 50 mmol l⁻¹ Tris-HCl (pH 8.0). Plates were incubated at 28 °C.

disruption of the *pacC* gene correlates with the reduced secretion of keratinase activities, leading to a reduced capacity of the mutant strain to grow on human nails *in vitro*.²¹ Conidiation is also affected by the disruption of the *pacC* gene, suggesting its involvement in the development of this dermatophyte.

The protein, PacC, binds to 5'-GCCARG-3' sequences upstream of pH-conditioned genes and either activates or represses transcription,³¹ thereby playing a central role in the regulation of numerous cellular reprogramming events in fungi. The initial guanine residue in this consensus sequence is critical for PacC binding,³¹ whereas the Rim101p DNA-binding site is 5'-NCCAAG-3', followed preferentially by A or C in the adjacent 3' positions,³² showing structural variations in this consensus among fungal species.

Comparative genomics

The whole genomes of seven dermatophytes, including anthropophilic, zoophilic and geophilic species, were recently sequenced.^{33,34} *Microsporum gypseum* is a geophilic species (soil dwelling) found throughout the world. In humans, it causes fungal skin infections of the head and torso; *Microsporum canis* is the most commonly encountered zoophilic species in human infections and causes ringworm in pets, including dogs and cats; *Trichophyton equinum* is a zoophilic pathogen that infects humans, and is a significant cause of ringworm in horses; *T. rubrum* is an anthropophilic (human-specific) pathogen that is the most frequent cause of fungal skin infections in the world; *Trichophyton tonsurans* is an anthropophilic pathogen and the most

common cause of scalp infections in children in the United States, Canada, and Latin American countries; *Arthroderma benhamiae*, a teleomorph of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton verrucosum* are zoophilic dermatophytes that cause intractable superficial infections and trigger severe inflammatory responses in humans.

To identify genes involved in the PacC/Pal signalling cascade in these dermatophyte species, we performed a genomic analysis of sequenced genomes based on the *Aspergillus* Comparative Database,³⁵ *Neurospora crassa* Database³⁶ and Dermatophyte Comparative Database,³³ using blast similarity and gene family searches. The seven dermatophyte genomes revealed the PacC/Rim101p pH-responsive signal transduction pathway, which consists of the six *pal* genes (*palA*, *B*, *C*, *F*, *H* and *I*) and the transcription factor PacC (Table 1). The conserved domains in the proteins encoded by the *pacC/pal* genes were identified using the ScanProsite web tool available at ExPASy Bioinformatics Resource Portal and Pfam protein families at the Wellcome Trust Sanger Institute, which are shown in Fig. 1. Three zinc-fingers and two YPXL/I domains were identified in the PacC protein of all dermatophytes, including *T. verrucosum* *pacC* gene, which was manually reviewed and re-annotated (Table 1). The PalA protein interacts with the YPXL/I motifs in the full-length version of PacC, which is required for the activation of PacC.^{37,38} Thus, this signalling cascade is also highly conserved among dermatophytes. As mentioned above, in *T. rubrum*, the PacC/Rim101p regulatory cascade mediates a myriad of metabolic events at either acid or alkaline pHs.²² Thus, in *T. rubrum*, and possibly in all dermatophytes

Table 1 Accession numbers of the *pacC/pal* genes in the Dermatophytes Comparative Database (Broad Institute) and their sequence identities.

Species	<i>pacC</i>	<i>palA</i>	<i>palB</i>	<i>palC</i>	<i>palF</i>	<i>palI</i>	<i>palH</i>
<i>T. rubrum</i>	TERG_00838	TERG_07695	TERG_06178	TERG_02203	TERG_04877	TERG_08749	TERG_08517
<i>T. equinum</i>	TEQG_01042	TEQG_06911	TEQG_04353	TEQG_07129	TEQG_01166	TEQG_01754	TEQG_03361
<i>T. tonsurans</i>	TESG_04572	TESG_01480	TESG_07668	TESG_07417	TESG_05890	TESG_02051	TESG_04871
<i>T. verrucosum</i>	TRV_01305 ¹	TRV_00029	TRV_03517	TRV_02196	TRV_05292	TRV_01605	TRV_02743
<i>M. canis</i>	MCYG_01012	MCYG_01280	MCYG_05934	MCYG_07428	MCYG_06980	MCYG_08401	MCYG_03946
<i>M. gypseum</i>	MGYG_00974	MGYG_01828	MGYG_06033	MGYG_05310	MGYG_03059	MGYG_05821	MGYG_07704
<i>A. benhamiae</i>	ARB_07827	ARB_01679	ARB_04528	ARB_02395	ARB_01437	ARB_03512	ARB_03328
Identity among the dermatophytes (%)	85	89	91	91	85	65	89

¹Manually reviewed and re-annotated to *T. verrucosum* HKI 0517: Supercontig 72, range on 15205--17804 (strain+).

sequenced, PacC has a diversity of metabolic functions in response to acidic and alkaline extracellular pHs, as already reported for other fungi.^{25,27,28,39}

The PacC DNA-binding domain was identified in the promoter region of *pacC/pal* genes using in-house Perl scripts. We identified the 5'-GCCARG-3' consensus in the promoter regions of *pacC*, *palB*, *palI* and *palH* genes for all dermatophytes, suggesting functional equivalency with the signalling cascade of model fungi. This PacC consensus DNA-binding site was also identified in the promoter region of the *palC* gene of all dermatophytes, except *M. canis*. Interestingly, the promoter region of the *pacC* gene of all seven dermatophytes has multiple 5'-GCCARG-3' consensus sequences, suggesting that these genes, like their homologues in *A. nidu-*

lans and *N. crassa*, are auto-regulated (Fig. 3). However, the biological significance of these multiple PacC DNA-binding sites in dermatophytes, if any, in the regulation of gene expression, is yet to be elucidated.

Conclusion and perspectives

The understanding of the metabolic responses that govern pH homeostasis and ambient pH sensing is important in dermatophytes, as these mechanisms are possibly involved in the installation, virulence, development and survival of these microorganisms in humans. The complete sequencing of dermatophyte genomes and the analysis of the promoter regions of the genes involved in this adaptive response allow the identification of

Figure 3 Promoter regions of the *pacC* gene homologues. Schematic representation of 1000 bp upstream of the *pacC* gene showing the 5'-GCCARG-3'-DNA-binding consensus. Homologues are denoted as follows: ANID, *A. nidulans*; NCU, *N. crassa*; MGYG, *M. gypseum*; TEQG, *T. equinum*; TRV, *T. verrucosum*; TERG, *T. rubrum*; TSEG, *T. tonsurans*; ARB, *A. benhamiae*; MCGY, *M. canis*.

genes, providing the prediction of their functions. Thus, comparative genomics approaches can reveal intrinsic differences among dermatophytes, between dermatophytes and other fungi, and between fungi and humans, identifying therapeutic targets selective to fungi and harmless to man. The detection of potential targets by bioinformatics and the role of genetics in target validation will be of fundamental importance to design specific drugs against fungal infections. The recent efforts in dermatophyte genome sequencing, transcriptome and proteome analysis provide effective ways to find new possibilities to cure and prevent diseases caused by fungi.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Brazilian funding agencies FAPESP, CNPq, CAPES and FAEP. We thank P.R. Sanches for the implementation of Perl scripts used.

References

- Garber G. An overview of fungal infections. *Drugs* 2001; **61**(Suppl 1): 1–12.
- Ellis D, Marriott D, Hajjeh RA, Warnock D, Meyer W, Barton R. Epidemiology: surveillance of fungal infections. *Med Mycol* 2000; **38**(Suppl 1): 173–82.
- Martinez-Rossi NM, Peres NTA, Rossi A. Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. *Mycopathologia* 2008; **166**: 369–83.
- Schmid-Wendtner MH, Korting HC. The pH of the skin surface and its impact on the barrier function. *Skin Pharmacol Physiol* 2006; **19**: 296–302.
- Matousek JL, Campbell KL. A comparative review of cutaneous pH. *Vet Dermatol* 2002; **13**: 293–300.
- Murdan S, Milcovich G, Goriparthi GS. An assessment of the human nail plate pH. *Skin Pharmacol Physiol* 2011; **24**: 175–81.
- Ohman H, Vahlquist A. The pH gradient over the stratum corneum differs in X-linked recessive and autosomal dominant ichthyosis: a clue to the molecular origin of the “acid skin mantle”? *J Invest Dermatol* 1998; **111**: 674–7.
- Gibbs NK, Norval M. Urocanic acid in the skin: a mixed blessing? *J Invest Dermatol* 2011; **131**: 14–17.
- Fluhr JW, Elias PM, Man MQ *et al.* Is the filaggrin-histidine-urocanic acid pathway essential for stratum corneum acidification? *J Invest Dermatol* 2010; **130**: 2141–4.
- Drake DR, Brogden KA, Dawson DV, Wertz PW. Thematic review series: skin lipids antimicrobial lipids at the skin surface *J Lipid Res* 2008; **49**: 4–11.
- Peres NTA, Cursino-Santos JR, Rossi A, Martinez-Rossi NM. *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* 2011; **27**: 1719–23.
- Brito-Madurro AG, Prade RA, Madurro JM *et al.* A single amino acid substitution in one of the lipases of *Aspergillus nidulans* confers resistance to the antimycotic drug undecanoic acid. *Biochem Genet* 2008; **46**: 557–65.
- Lambers H, Piessens S, Bloem A, Pronk H, Finkel P. Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. *Int J Cosmet Sci* 2006; **28**: 359–70.
- Chikakane K, Takahashi H. Measurement of skin pH and its significance in cutaneous diseases. *Clin Dermatol* 1995; **13**: 299–306.
- Grice EA, Segre JA. The skin microbiome. *Nat Rev Microbiol* 2011; **9**: 244–53.
- Elias PM. The skin barrier as an innate immune element. *Semin Immunopathol* 2007; **29**: 3–14.
- Ferreira-Nozawa MS, Nozawa SR, Martinez-Rossi NM, Rossi A. The dermatophyte *Trichophyton rubrum* secretes an EDTA-sensitive alkaline phosphatase on high-phosphate medium. *Braz J Microbiol* 2003; **34**: 161–4.
- Peres NTA, Sanches PR, Falcão JP *et al.* Transcriptional profiling reveals the expression of novel genes in response to various stimuli in the human dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *BMC Microbiol* 2010; **10**: 39.
- Maranhão FCA, Silveira HCS, Rossi A, Martinez-Rossi NM. Isolation of transcripts overexpressed in the human pathogen *Trichophyton rubrum* grown in lipid as carbon source. *Can J Microbiol* 2011; **57**: 333–8.
- Nahas E, Terenzi HF, Rossi A. 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* 1982; **128**: 2017–21.
- Ferreira-Nozawa MS, Silveira HCS, Ono CJ, Fachin AL, Rossi A, Martinez-Rossi NM. The pH signaling transcription factor PacC mediates the growth of *Trichophyton rubrum* on human nail *in vitro*. *Med Mycol* 2006; **44**: 641–5.
- Silveira HCS, Gras DE, Cazzaniga RA, Sanches PR, Rossi A, Martinez-Rossi NM. Transcriptional profiling reveals genes in the human pathogen *Trichophyton rubrum* that are expressed in response to pH signaling. *Microb Pathog* 2010; **48**: 91–6.
- Peres NTA, Maranhão FC, Rossi A, Martinez-Rossi NM. Dermatophytes: host-pathogen interaction and antifungal resistance. *An Bras Dermatol* 2010; **85**: 657–67.
- Hervas-Aguilar A, Galindo A, Penalva MA. Receptor-independent ambient pH signaling by ubiquitin attachment to fungal arrestin-like PalF. *J Biol Chem* 2010; **285**: 18095–102.
- Silva EM, Freitas JS, Gras DE *et al.* Identification of genes differentially expressed in a strain of the mold *Aspergillus nidulans* carrying a loss-of-function mutation in the *palA* gene. *Can J Microbiol* 2008; **54**: 803–11.
- Freitas JS, Silva EM, Leal J *et al.* Transcription of the Hsp30, Hsp70, and Hsp90 heat shock protein genes is modulated by the PalA protein in response to acid pH-sensing in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Cell Stress Chaperones* 2011; **16**: 565–72.
- Leal J, Squina FM, Freitas JS *et al.* 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* 2010; **583**: 180–4.
- Squina FM, Leal J, Cipriano VT, Martinez-Rossi NM, Rossi A. Transcription of the *Neurospora crassa* 70-kDa class heat shock protein genes is modulated in response to extracellular pH changes. *Cell Stress Chaperones* 2010; **15**: 225–31.

- 29 Maranhão FCA, Paião FG, Martinez-Rossi NM. Isolation of transcripts over-expressed in human pathogen *Trichophyton rubrum* during growth in keratin. *Microb Pathog* 2007; **43**: 166–72.
- 30 Maranhão FCA, Paião FG, Fachin AL, Martinez-Rossi NM. Membrane transporter proteins are involved in *Trichophyton rubrum* pathogenesis. *J Med Microbiol* 2009; **58**: 163–8.
- 31 Tilburn J, Sarkar S, Widdick DA *et al*. The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. *EMBO J* 1995; **14**: 779–90.
- 32 Ramon AM, Fonzi WA. Diverged binding specificity of Rim101p, the *Candida albicans* ortholog of PacC. *Eukaryot Cell* 2003; **2**: 718–28.
- 33 Broad Institute database. Dermatophyte Comparative Database, 2010. http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/dermatophyte_comparative/MultiHome.html [accessed on 1 September 2011].
- 34 Burmester A, Shelest E, Glockner G *et al*. Comparative and functional genomics provide insights into the pathogenicity of dermatophytic fungi. *Genome Biol* 2011; **12**: R7.
- 35 Broad Institute. *Aspergillus* comparative database, 2010. http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/aspergillus_nidulans/MultiHome.html [accessed on 1 September 2011].
- 36 Broad Institute. *Neurospora crassa* database, 2010. <http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/neurospora/MultiHome.html> [accessed on 1 September 2011].
- 37 Negrete-Urtasun S, Denison SH, Arst HN Jr. Characterization of the pH signal transduction pathway gene *palA* of *Aspergillus nidulans* and identification of possible homologs. *J Bacteriol* 1997; **179**: 1832–5.
- 38 Vincent O, Rainbow L, Tilburn J, Arst HN, Peñalva MA. YPXL/I is a protein interaction motif recognized by *Aspergillus* PalA and its human homologue, AIP1/Alix. *Mol Cell Biol* 2003; **23**: 1647–55.
- 39 Li MC, Martin SJ, Bruno VM, Mitchell AP, Davis DA. *Candida albicans* Rim13p, a protease required for Rim101p processing at acidic and alkaline pHs. *Eukaryot Cell* 2004; **3**: 741–51.
- 40 Cove DJ. The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochim Biophys Acta* 1966; **113**: 51–56.

rpb2 is a reliable reference gene for quantitative gene expression analysis in the dermatophyte *Trichophyton rubrum*

TIAGO R. JACOB*, NALU T.A. PERES*, GABRIELA F. PERSINOTI*, LARISSA G. SILVA*, MENDELSON MAZUCATO*, ANTONIO ROSSI† & NILCE M. MARTINEZ-ROSSI*

*Departamento de Genética and †Departamento de Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

The selection of reference genes used for data normalization to quantify gene expression by real-time PCR amplifications (qRT-PCR) is crucial for the accuracy of this technique. In spite of this, little information regarding such genes for qRT-PCR is available for gene expression analyses in pathogenic fungi. Thus, we investigated the suitability of eight candidate reference genes in isolates of the human dermatophyte *Trichophyton rubrum* subjected to several environmental challenges, such as drug exposure, interaction with human nail and skin, and heat stress. The stability of these genes was determined by geNorm, NormFinder and Best-Keeper programs. The gene with the most stable expression in the majority of the conditions tested was *rpb2* (DNA-dependent RNA polymerase II), which was validated in three *T. rubrum* strains. Moreover, the combination of *rpb2* and *chs1* (chitin synthase) genes provided for the most reliable qRT-PCR data normalization in *T. rubrum* under a broad range of biological conditions. To the best of our knowledge this is the first report on the selection of reference genes for qRT-PCR data normalization in dermatophytes and the results of these studies should permit further analysis of gene expression under several experimental conditions, with improved accuracy and reliability.

Keywords gene expression, reference genes, qRT-PCR, *Trichophyton rubrum*

Abbreviations qRT-PCR, quantitative real-time PCR; Cq, quantification cycle (also known as Ct for threshold cycle).

Introduction

Trichophyton rubrum is the most prevalent etiologic agent on a worldwide basis of clinical cases of dermatophytosis. These infections can be restricted to superficial regions, or it can be invasive in immunocompromised patients. Given its importance, *T. rubrum* genome has been recently sequenced and the data released by the Broad Institute of Harvard and MIT. Furthermore, it was isolated thousands

of expressed sequence tags (ESTs) allowing for the identification of fungal traits involved in several biological conditions (available at TrED and dbEST NCBI databases) [1,2]. This effort has improved the study of functional genomics that seeks to identify the genetic machinery used by this pathogen to establish itself in the host tissue and cause disease in humans.

Quantitative PCR, also known as real-time PCR (qRT-PCR), is being used increasingly in studies of diverse biological processes, including analyses of gene expression. However, to obtain reliable data with this technique, several requirements must be fulfilled [3], among them is the use of appropriate reference genes for data normalization [4]. A suitable reference gene for qRT-PCR can be defined as a gene with stable expression among different biological

Received 30 May 2011; Received in final revised form 14 July 2011; Accepted 17 August 2011

Correspondence: Nilce M. Martinez-Rossi, Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 14049-900 - Ribeirão Preto, SP, Brazil. Tel: +55 16 3602 3150; Fax: +55 16 3633 0069; E-mail: nmmrossi@usp.br

samples, which is little affected by the experimental conditions. In addition, other important characteristics of the reference genes are that their expression should not be very low [quantification cycle (C_q) > 30] or extremely high (C_q < 15), they should not be co-regulated, and their amplification should not reflect variations in RNA quality or quantity, and/or cDNA synthesis efficiency [5–8].

A number of reference genes, such as *gapdh*, β -*tubulin*, and ribosomal subunits (*18S*, *28S rRNA*) have been used to normalize data from qRT-PCR studies in fungi and other organisms [9–12]. However, recent investigations have shown that the genes commonly used as references might not be stably expressed under different experimental conditions, and consequently provide unreliable data [13–15]. It was reported that up to 100-fold variations found in the expression of a target gene could be attributed only to alterations in the expression of the reference genes used for data normalization [15]. Several researchers have evaluated the suitability of housekeeping genes as reference for qRT-PCR in a number of organisms, especially bacteria, plants and humans [7,16,17]. However, little effort has been made to establish reference genes for fungi, even though studies about fungal biology have gained importance in recent times as a result of the increased incidence of infections caused by these organisms.

The lack of available data with regard to the stability of the expression of genes commonly referred to as housekeeping for dermatophytes led us to perform a search for proper reference genes for qRT-PCR studies of *T. rubrum*. In the present study, the suitability of eight candidates to reference genes for qRT-PCR was evaluated by analyzing their expression stability when *T. rubrum* was challenged by 11 environmental factors, such as drug exposure, interaction with human nail and skin, heat, and growth in different culture conditions.

Materials and methods

Strains and growth conditions

T. rubrum strains CBS118892 (*Centraalbureau voor Schimmelcultures* – Netherlands), H6 (ATCC MYA 3108), and *pacC*-1, were used in this study. The *pacC*-1 mutant was obtained from the H6 strain, and carries the disrupted *pacC* gene [18]. The first two strains were grown at 28°C on malt extract agar (MEA; 2% glucose, 2% malt extract, 0.1% peptone, 2% agar, pH 5.7), while the *pacC*-1 strain was grown on MEA supplemented with 400 µg/ml hygromycin B. H6 and *pacC*-1 strains were used for validation of the *rpb2* expression stability, whereas the CBS strain was employed for all other analyses.

For growth in liquid medium with different carbon sources, 1×10^6 conidia were germinated in 100 ml of the

following media; malt extract broth (MEB; 2% glucose, 2% malt extract, 0.1% peptone, pH 5.0), keratin medium [KM; 2.5 g/l keratin powder (Sigma) in water, pH 5.0], and minimal medium (MM) at pH 5.0, which contains glucose as the carbon source [19]. The cultures were incubated at 28°C for 96 h under agitation. For validation of the *rpb2* gene expression stability, 1×10^6 conidia of the H6 or *pacC*-1 strains were germinated in 100 ml of bovine KM (2.5 g/l bovine keratin power in water, pH 5.0) at 28°C for 24, 48, 36 and 60 h.

Drug exposure condition

For drug response assays, 1×10^6 *T. rubrum* conidia were germinated in 100 ml MEB for 96 h and the resultant mycelia were aseptically transferred to RPMI 1640 (Gibco) containing sub-inhibitory concentrations of acriflavin (ACR; 1.75 µg/ml) or terbinafine (TRB; 0.2 µg/ml). After incubation at 28°C for 3 h, the resulting mycelia were harvested by filtration and used for RNA extraction.

Interaction with human skin and nail

For interaction assays, small pieces of human skin were obtained from patients who underwent abdominal surgery at the University Hospital from Ribeirão Preto, SP, Brazil (HCFMRP-USP). After removal of the adipose tissue, the skin fragments were incubated with 1×10^4 *T. rubrum* conidia at 28°C for 96 h as described previously [20]. The fungus was then harvested and used for total RNA extraction. The human nail fragments, obtained from healthy donors, were treated with 96% ethanol and each fragment was exposed to 1×10^4 *T. rubrum* conidia [18]. After incubation at 28°C for 96 h, the fungal morphology was assessed by light microscopy. The infected nails fragments were vortexed to release the fungal mycelia, the nails discarded, and the resulting mycelia used for total RNA extraction. The interaction experiments were approved by the local Ethics Committee (Protocol No. 046/2009). All growth conditions and interactions were performed in three independent experiments.

Heat shock stress condition

For heat shock stress, 1×10^6 *T. rubrum* conidia were germinated in 100 ml of MEB or KM at 28°C for 96 h under agitation, and then shifted to 37°C for 30 min or 120 min for total RNA extraction.

RNA isolation and cDNA synthesis

Total RNA was isolated from mycelia with the Illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare)

containing DNase I to eliminate DNA in the samples which was then confirmed by PCR amplification of the cDNA samples using a primer set designed in an intron flanking region of the β -tubulin gene (Fig. 1B). First-strand cDNA synthesis was performed using SuperScriptIII First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR kit (Invitrogen). RNA extraction and cDNA synthesis under all tested conditions were performed in accord with the manufacturers' recommendations on three separate occasions.

Primer design and qRT-PCR

Eight candidate genes (Table 1) were selected based on their common use as endogenous controls in some fungal species and other organisms, i.e., *18S rRNA* and *actin* (*T. rubrum* [21,22] and *Candida albicans* [23,24]), *gapdh* and *chs1* (*T. rubrum* [12]), β -tubulin (*Fonsecaea monophora* [25]), and *top2*, *atpD* and *rpb2* (*Xanthomonas citri* [17]). Specific primer pairs for the reference genes were designed using the PrimerExpress v.3 software (Applied Biosystems), and their specificity was confirmed by BLAST searches. Real-time PCR reactions were carried out in a total volume of 12.5 μ l, containing 6.25 μ l Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1.0 μ l each primer (*top2*, 150 nM; *gapdh*, *atpD*, β -tub, 200 nM; *18S rRNA*, *actin*, *chs1*, *rpb2*, 300 nM), 2.0 μ l template cDNA (50 ng), and 3.25 μ l ultra pure water (Invitrogen). The thermal conditions for qRT-PCR were 95°C for 10 min, followed by 40 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. All reactions were performed in triplicate in 96-well reaction plates using the StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems). A melting curve for each gene (Fig. 1C), 2% agarose gel electrophoresis showing amplification of a unique PCR product of expected size for each candidate reference gene (Fig. 1A), and the sequencing of the PCR products were performed to confirm primer specificity. Table 1 provides a list of the candidate reference genes evaluated, primer sequences, and PCR efficiency.

Data analysis

StepOne Software v. 2.1 was used to analyze primer efficiency, which was performed on a standard curve that was generated using $2 \times$ dilution series of one cDNA sample at five dilution points measured in triplicate. The algorithms BestKeeper, geNorm, and NormFinder [5,26,27] were used to evaluate the stability of the eight candidate reference genes. The BestKeeper program, an Excel-based descriptive statistical method, estimated inter-gene relations of possible reference gene pairs by performing numerous pairwise correlation analyses using raw C_q values of each gene. This program calculated the gene expression variation based on C_q , which were the number of cycles

necessary to reach the selected threshold fluorescence. Analysis of the data, based on the assessment of raw C_q values, calculated standard deviation SD ($\pm C_q$) and coefficient of variance CV (% C_q) for all the reference genes in all of the samples, was used to determine the stability of gene expression [27]. The geNorm program calculated a gene stability measure (M), which was the mean pairwise variation between an individual gene and all other tested control genes throughout a given sample panel. Genes with M values > 1.5 have greater expression variation and should not be used for data normalization [5]. The NormFinder program focuses on finding the two genes with the lowest expression variability based on intra- and intergroup variations for candidate reference genes [26]. The main difference between both programs is that geNorm algorithm relies on the principle that the expression ratio of two ideal reference genes is uniform in all samples, independent of the experimental condition, whereas the NormFinder algorithm uses a solid statistical framework to estimate the overall expression variations of the candidate reference genes and the changes between sample subgroups of the analyzed set. Relative expression levels of the candidate reference genes were imported to geNorm and NormFinder analysis tool through GenEx software v. 5.1.1.2 (<http://genex.gene-quantification.info/>).

Results

Candidate reference genes and data analysis

To evaluate the suitability of housekeeping genes for data normalization in *T. rubrum* gene expression analyses by qRT-PCR, we tested the stability of eight candidate reference genes (Table 1) in *T. rubrum* strains exposed to the following 11 environmental challenges: growth in MEB (1), KM (2), or MM (3); interaction with human nail (4) or skin (5); exposure to TRB (6) or ACR (7); and heat shock stress [mycelia grown in MEB were shifted from 28–37°C for 30 min (8) or 120 min (9) and mycelia grown in KM were shifted from 28–37°C for 30 min (10) or 120 min (11)]. The cDNA samples were synthesized from RNA obtained from independent biological triplicates of *T. rubrum* submitted to 11 culture conditions mentioned above and the qRT-PCR reactions were performed in technical triplicate, thus resulting in a total of 99 C_q values for each gene.

The expression variation of each candidate reference gene assessed using the BestKeeper program showed that the evaluated genes had a recommended standard deviation (SD) value [$0.52 < SD(C_q) \leq 1.00$] and a high correlation with the BestKeeper index (BI), which is the geometric mean of C_q values of the candidate reference genes (coefficient of correlation $r = 0.70$ – 0.90), except the

Fig. 1 Specificity of qRT-PCR amplification. (A) Agarose gel electrophoresis showing amplification of a specific PCR product of expected size for each gene. Lanes: M, 50 bp molecular marker, 1. *chs1*, 2. *top2*, 3. *18S rRNA*, 4. *gapdh*, 5. *atpD*, 6. *rpb2*, 7. *act*, 8. *β-tub*. (B) PCR amplification of the cDNA samples using a primer set designed in an intron flanking region of the *β-tub* gene. Lanes: 1. genomic DNA, 2. cDNA, M: 50 bp molecular marker. (C) Melting curve of the candidate reference genes.

Table 1 Candidate reference genes evaluated, primer sequences, amplicon length and qPCR efficiency.

Gene symbol	Name (accession number) ^a	Molecular function	Primers (5'–3')	Amplicon length (bp)	Efficiency (%)
<i>18S rRNA</i>	18S ribosomal RNA (X58570)	Protein synthesis	Fwd: TCGACCCCGGAGAAGGA Rev: GCCTGCTGCCTACCTTGGA	51	104.92
<i>gapdh</i>	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (TERG_04402)	Oxidoreductase in glycolysis and gluconeogenesis	Fwd: GCGTGACCCAGCCAACA Rev: CCGTGACTCGACGATGTAGT	62	99.90
<i>act</i>	Actin (TERG_06637)	Cytoskeletal structural protein	Fwd: GAATCTCCCCCTCATGCTT Rev: GCCTGGGCTTCCGACACT	198	92.17
<i>chs1</i>	Chitin synthase (TERG_02562)	Cell wall biogenesis	Fwd: GGCCACAACGAAGCCTATGA Rev: CAATCGGCCTGGGAGATG	58	97.05
β - <i>tub</i>	Tubulin beta chain (TERG_07904)	Cytoskeletal structural protein	Fwd: AACATGATGGCTGCCACTGA Rev: AAGATGGCAGAGCAGGTAAGGT	253	93.99
<i>top2</i>	DNA topoisomerase II (TERG_01475)	Avoid supercoiling in DNA molecule	Fwd: TTTGGAACCCAGCGGTAAC Rev: CGAGCACTGGCACTGTCAGA	63	93.69
<i>rpb2</i>	DNA-dependent RNA polymerase II RPB140 (TERG_05742)	RNA synthesis	Fwd: TGCAGGAGCTGGTGAAGA Rev: GCTGGGAGGTACTGTTTGATCAA	59	94.99
<i>atpD</i>	ATP synthase subunit beta (TERG_06157)	Combination of ATP synthesis and/or hydrolysis with the transport of protons across membranes	Fwd: CGAGGAGGGCGGTCAGA Rev: GGCTGCATAACGGCAAA	61	103.67

^aGene accession numbers at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) or Dermatophytes Genome Database (Broad Institute).

18S rRNA gene (coefficient of correlation $r = 0.46$). Moreover, the expression of all genes correlated with the BI, which is supported by p values < 0.001 (Table 2). These results are in accordance with the recommendations previously reported [27] that genes with a SD of the mean $C_q > 1$ of the BI must be excluded, and thus not be considered as reference genes.

The expression stability of the candidate reference genes was evaluated by performing triplicate analyses with the geNorm and NormFinder programs, and separating the C_q data from the different biological samples. First, we analyzed the data from the samples of all environmental

challenges, and then we analysed independently the data from *T. rubrum* grown in KM, or interaction with human skin and nail, or exposed to drugs, or the heat shock stress conditions.

Stability analyses for candidate reference genes in all tested conditions

qRT-PCR data of these eight reference genes exposed to all environmental challenges were included in the geNorm program and ranked according to their M values, with the GenEx software v. 5.1.1.2. This analysis showed that the

Table 2 Descriptive statistical analysis with BestKeeper.

Gene	chs1	gapdh	18s rRNA	actin	β -tub	atpD	rpb2	top2
N	99	99	99	99	99	99	99	99
GM [C_q]	25.42	20.44	10.06	19.91	21.98	21.29	25.20	22.15
AM [C_q]	25.45	20.47	10.11	19.94	22.01	21.32	25.22	22.18
Min [C_q]	22.82	18.95	8.27	17.49	18.17	18.94	22.57	19.39
Max [C_q]	28.25	22.73	12.00	22.19	23.00	22.67	26.98	23.42
SD [$\pm C_q$]	0.90	0.86	0.92	0.96	0.85	0.96	0.91	0.96
CV [% C_q]	3.53	4.19	9.11	4.83	3.84	4.48	3.60	4.34
Min [x-fold]	-5.82	-2.79	-3.57	-4.83	-12.47	-5.27	-5.80	-6.13
Max [x-fold]	6.81	4.84	3.99	4.44	1.97	2.66	3.29	2.30
SD [$\pm$ x-fold]	1.84	1.79	1.87	1.92	1.78	1.91	1.85	1.92
BK Corr [r]	0.79	0.86	0.46	0.90	0.70	0.78	0.88	0.90
p-value	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001

N , number of samples; GM [C_q], geometric mean of C_q ; AM [C_q], arithmetic mean of C_q ; Min [C_q] and Max [C_q], extreme values of C_q ; SD [C_q], standard deviation of the C_q ; CV [% C_q], coefficient of variance expressed as a percentage on the C_q level; Min [x-fold] and Max [x-fold], extreme values of expression level expressed as an absolute x-fold over- or under-regulation coefficient; SD [$\pm$ x-fold], standard deviation of the absolute regulation coefficients; BK Corr [r], Pearson correlation coefficient, correlation between the BestKeeper index and the contributing gene.

β -tub, *atpD*, *gapdh*, *act*, and *18S rRNA* genes displayed *M* values higher than the threshold of 1.5, and thus they were considered inappropriate for accurate qRT-PCR data normalization in *T. rubrum* cultivated under several different conditions (Fig. 2A). On the other hand, *rpb2* and *chs1* genes presented the most stable expression giving their combination reliable results for data normalization when different biological conditions were evaluated together. To determine the optimal number of reference genes, geNorm calculated the pairwise variation V_n/V_{n+1} between two sequential normalization factors (NF_n and NF_{n+1}) using an increasing number of reference genes. If the added gene has a significant effect on the normalization it should be included for calculation of a reliable normalization factor. Ideally, extra reference genes are included until the variation V_n/V_{n+1} drops below a threshold value of 0.15 [5], although this value should not be considered as a strict cut-off. In our data set, the calculated NF_n showed that the use of two reference genes was suitable to achieve reliable data normalization ($V_{2/3} = 0.131$), but the inclusion of the third gene contributed to a variation in the normalization factor ($V_{3/4} = 0.112$) (Fig. 2B). On the other hand, NormFinder analysis revealed that the *rpb2* gene showed the lowest variability (Table 3), followed by *chs1* and β -tub. Thus, according to both geNorm and NormFinder softwares, the combination of *rpb2* and *chs1* genes provided the most reliable qRT-PCR data normalization in *T. rubrum* gene expression analysis under a broad range of biological conditions.

Identification of the optimal reference genes during interaction with human nail and skin

We analyzed the suitability of the candidate reference genes for data normalization during *T. rubrum* interaction with human skin and nail fragments. geNorm analysis showed that the *act* gene had the lowest *M* value and the combination of *act* and *gapdh* genes provided the most reliable data normalization (Fig. 2C). Pairwise variation V_n/V_{n+1} showed that the use of two reference genes was reliable for accurate normalization ($V_{2/3} = 0.141$), but the use of three reference genes provided the best normalization ($V_{3/4} = 0.112$) (Fig. 2D). The analysis by NormFinder provided similar, but not identical results (Table 3).

Identification of the optimal reference genes in keratin medium

The stability of the eight candidate reference genes expressed in KM was chosen given that keratin is the main substrate available during *T. rubrum* interaction with its natural host. Taking into account the geNorm results, *act* and *rpb2* provided the most reliable data normalization

(Fig. 2E), although the other genes also displayed *M* values lower than the threshold of 1.5 in KM. The pairwise variation V_n/V_{n+1} calculated by the geNorm program showed that, for keratin conditions, just using two reference genes provided reliable results for qRT-PCR data normalization ($V_{2/3} = 0.042$) (Fig. 2F). In addition, NormFinder showed that the most stable gene during growth in keratin was *act*, followed by *gapdh* and *rpb2* (Table 3).

Identification of the optimal reference genes under drug exposure

The expression stability of these candidate reference genes were analyzed in *T. rubrum* drug response assays, one of the most studied biological processes for pathogenic fungi [28,29]. In this case, we tested the suitability of these genes for data normalization in MEB cultures (commonly used as control) and ACR or TRB antifungals exposures. geNorm analysis showed that the *rpb2* gene had the lowest *M* value and the combination of *rpb2* and *act* genes provided reliable data normalization (Fig. 2G). Pairwise variation V_n/V_{n+1} showed that the use of two reference genes was reliable for accurate normalization ($V_{2/3} = 0.127$), although the use of three reference genes provided the best normalization ($V_{3/4} = 0.107$) (Fig. 2H). The analysis by NormFinder provided the same results as those obtained with geNorm (Table 3).

Identification of the optimal reference genes under heat shock stress

The stability analysis with the geNorm program showed that the genes *act* and *gapdh* were the most stable under heat shock stress (Fig. 2I). Pairwise variation (V_n/V_{n+1}) demonstrated that the use of two reference genes was reliable for accurate normalization ($V_{2/3} = 0.117$), although the use of three genes provided the best normalization ($V_{3/4} = 0.071$) (Fig. 2J). However, analysis with NormFinder program revealed that the genes *act* and *rpb2* were the most stable under heat shock stress with their combination providing the best normalization data (Table 3).

Validation of *rpb2* as a suitable reference gene

Given that *rpb2* gene presented the most stable expression level in all analyses conducted in this study (Fig. 2A and Table 3), we validated *rpb2* as a suitable reference gene by evaluating its expression level in three *T. rubrum* strains, CBS118892, H6, and *pacC*-1, grown in bovine keratin and MEB. The *pacC*-1 strain was chosen because the transcription factor PacC modulates in *T. rubrum* the expression of several genes involved in different cellular responses, such as the pH signaling, membrane remodeling, cellular

Fig. 2 Gene expression stability and pairwise variation of the candidate reference genes analyzed by geNorm. Candidate reference genes with M values ≤ 1.5 are appropriate for data normalization, and lower M values correspond to the most stable genes. Pairwise variation (v) was evaluated to determine the optimal number of reference genes for accurate normalization of gene expression. Average pairwise variations V_n/V_{n+1} are calculated between the factors NF_n and NF_{n+1} to indicate whether the inclusion of extra reference genes adds stability to the normalization factor. Independent analyses were carried out using five groups of samples: (A and B) all 11 experimental conditions tested; (C and D) interaction with human skin and nail; (E and F) keratin growth; (G and H) drug exposure, and (I and J) heat stress.

Table 3 Ranking of candidate reference genes ordered by their expression stability, determined by Normfinder.

Rank	All conditions analyzed		Interaction with human skin and nail		Keratin growth		Drug exposure		Heat shock stress	
	Gene	Variability	Gene	Variability	Gene	SD ^a	Gene	Variability	Gene	Variability
1	<i>rpb2</i>	0.920	<i>act</i>	0.203	<i>act</i>	0.041	<i>rpb2</i>	0.142	<i>act</i>	0.466
2	<i>chs1</i>	1.058	<i>rpb2</i>	0.362	<i>gapdh</i>	0.043	<i>act</i>	0.173	<i>rpb2</i>	0.556
3	β - <i>tub</i>	1.062	<i>top2</i>	0.366	<i>rpb2</i>	0.155	<i>top2</i>	0.299	<i>gapdh</i>	0.635
4	<i>atpD</i>	1.195	<i>gapdh</i>	0.429	<i>18S rRNA</i>	0.268	<i>atpD</i>	0.352	β - <i>tub</i>	0.832
5	<i>gapdh</i>	1.233	<i>chs1</i>	0.433	<i>top2</i>	0.273	<i>gapdh</i>	0.412	<i>chs1</i>	0.839
6	<i>act</i>	1.241	<i>atpD</i>	0.450	<i>atpD</i>	0.368	<i>chs1</i>	0.413	<i>atpD</i>	0.941
7	<i>top2</i>	1.597	β - <i>tub</i>	0.556	β - <i>tub</i>	0.488	β - <i>tub</i>	0.430	<i>top2</i>	1.448
8	<i>18S rRNA</i>	1.941	<i>18S rRNA</i>	0.719	<i>chs1</i>	0.618	<i>18S rRNA</i>	0.611	<i>18S rRNA</i>	1.495
Best combination	<i>rpb2</i> and <i>chs1</i>	0.485	<i>act</i> and <i>rpb2</i>	0.175	^b		<i>rpb2</i> and <i>act</i>	0.137	<i>act</i> and <i>rpb2</i>	0.274

^aStandard deviation; ^bThe NormFinder software do not provide an optimum pair of reference genes (best combination) when the samples analyzed belong to the same biological condition.

transport, virulence, and nutrient availability [18,30]. We performed growth kinetics of the H6 and *pacC*-1 strains in KM, and the analyses were performed by combining the results of the different growth periods for both strains. We then compared the data of *rpb2* expression with those obtained for CBS 119892 strain grown in MEB, which was used in the stability evaluation. The slight difference in the mean C_q values found (Fig. 3) revealed no significant expression variation of this gene under the experimental conditions tested ($p = 0.88$, ANOVA). Thus, our results confirmed the stability of *rpb2* gene expression even when different *T. rubrum* strains were compared, suggesting that this gene is reliable for qRT-PCR data normalization in this dermatophyte.

Discussion

To the best of our knowledge this is the first report on the selection of reference genes for qRT-PCR data normalization in dermatophytes, which allows further analysis of gene expression with improved accuracy and reliability. Taking into consideration all the experimental conditions encompassed in our study, similar results were obtained with geNorm and NormFinder analyses. Both programs indicated that the *rpb2* and *chs1* genes were proper options for qRT-PCR data normalization, suggesting that these genes are the best combination for reliable and accurate data normalization in *T. rubrum* gene expression analysis when several biological conditions were compared. However, when gene expression analysis was based on specific experimental conditions, such as interaction with nail and skin, keratin, drug response or heat shock stress, the *act* gene presented a stable expression level, and if used in combination with the *rpb2* gene or the *gapdh* gene (for heat shock stress), it could render reliable results. Although the choice for proper reference genes depends on the organism

and the experimental conditions under study, *act* gene is one of the most used reference gene for qRT-PCR data normalization. In *Aspergillus niger* or in *C. albicans*, *act* gene was considered as the best reference gene from the set of candidate genes analyzed under the conditions employed [31,32]. On the other hand, in *Saccharomyces cerevisiae* its expression was shown to be unstable in some experimental conditions [33]. In our analysis, when different conditions were evaluated together, *act* gene presented unstable expression levels among the samples tested (Fig. 2A).

We also show that neither geNorm nor NormFinder identified the *18S rRNA* as the most appropriate reference gene for any experimental condition assayed. This provides additional evidence that ribosomal genes are not proper internal controls for general gene expression analysis as previously reported [17,34]. However, we cannot exclude the use of *18S rRNA* under specific conditions where its stability has been validated. These results reinforce the concept that an initial study of gene expression stability is essential for choosing reliable and appropriate reference

Fig. 3 Stability of *rpb2* gene expression. *rpb2* expression was evaluated in three *T. rubrum* strains cultivated in MEB (CBS) and bovine keratin medium (H6 and *pacC*-1). *rpb2* gene expression level was not significantly different among the tested conditions ($p = 0.88$, ANOVA).

genes for qRT-PCR data normalization, and their combination depends on the condition to be processed.

Our findings will allow further analysis of *T. rubrum* gene expression under various experimental conditions, with improved accuracy and reliability, which will serve as a guideline for research in other groups of fungi, especially dermatophytes, to delineate gene expression assays by qRT-PCR.

Acknowledgements

We acknowledge financial support by 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) and, Fundação de Apoio ao Ensino Pesquisa e Assistência (FAEPA).

Declaration of interest: The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

References

- Peres NTA, Sanches PR, Falcão JP, et al. Transcriptional profiling reveals the expression of novel genes in response to various stimuli in the human dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *BMC Microbiol* 2010; **10**: 39.
- Liu T, Zhang Q, Wang L, et al. The use of global transcriptional analysis to reveal the biological and cellular events involved in distinct development phases of *Trichophyton rubrum* conidial germination. *BMC Genomics* 2007; **8**: 100.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009; **55**: 611–622.
- Fleige S, Pfaffl MW. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Asp Med* 2006; **27**: 126–139.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002; **3**: Research0034. 0031–0034.0011.
- Mallona I, Lischewski S, Weiss J, Hause B, Egea-Cortines M. Validation of reference genes for quantitative real-time PCR during leaf and flower development in *Petunia hybrida*. *BMC Plant Biol* 2010; **10**: 4.
- Monaco E, Bionaz M, de Lima AS, et al. Selection and reliability of internal reference genes for quantitative PCR verification of transcriptomics during the differentiation process of porcine adult mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* 2010; **1**: 7.
- Wan H, Zhao Z, Qian C, et al. Selection of appropriate reference genes for gene expression studies by quantitative real-time polymerase chain reaction in cucumber. *Analytic Biochem* 2010; **399**: 257–261.
- Yu L, Zhang W, Liu T, et al. Global gene expression of *Trichophyton rubrum* in response to PH11B, a novel fatty acid synthase inhibitor. *J Appl Microbiol* 2007; **103**: 2346–2352.
- Diao Y, Zhao R, Deng X, et al. Transcriptional profiles of *Trichophyton rubrum* in response to itraconazole. *Med Mycol* 2009; **47**: 237–247.
- Mamarabadi M, Jensen B, Jensen DF, Lubeck M. Real-time RT-PCR expression analysis of chitinase and endoglucanase genes in the three-way interaction between the biocontrol strain *Clonostachys rosea* IK726, *Botrytis cinerea* and strawberry. *FEMS Microbiol Lett* 2008; **285**: 101–110.
- Leng W, Liu T, Wang J, Li R, Jin Q. Expression dynamics of secreted protease genes in *Trichophyton rubrum* induced by key host's proteinaceous components. *Med Mycol* 2009; **47**: 759–765.
- Boava LP, Laia ML, Jacob TR, et al. Selection of endogenous genes for gene expression studies in *Eucalyptus* under biotic (*Puccinia psidii*) and abiotic (acibenzolar-S-methyl) stresses using RT-qPCR. *BMC Res Notes* 2010; **3**: 43–52.
- Dheda K, Huggett JF, Chang JS, et al. The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization. *Analytic Biochem* 2005; **344**: 141–143.
- Gutierrez L, Mauriat M, Pelloux J, Bellini C, Van Wuytswinkel O. Towards a systematic validation of references in real-time rt-PCR. *Plant Cell* 2008; **20**: 1734–1735.
- Maroufi A, Van Bockstaele E, De Loose M. Validation of reference genes for gene expression analysis in chicory (*Cichorium intybus*) using quantitative real-time PCR. *BMC Mol Biol* 2010; **11**: 15.
- Jacob TR, Laia ML, Ferro JA, Ferro MI. Selection and validation of reference genes for gene expression studies by reverse transcription quantitative PCR in *Xanthomonas citri* subsp. *citri* during infection of *Citrus sinensis*. *Biotechnol Lett* 2011; **33**: 1177–1184.
- Ferreira-Nozawa MS, Silveira HCS, Ono CJ, et al. The pH signaling transcription factor PacC mediates the growth of *Trichophyton rubrum* on human nail in vitro. *Med Mycol* 2006; **44**: 641–645.
- Cove DJ. The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochim Biophys Acta* 1966; **113**: 51–56.
- Duek L, Kaufman G, Ulman Y, Berdicevsky I. The pathogenesis of dermatophyte infections in human skin sections. *J Infection* 2004; **48**: 175–180.
- Zhang W, Yu L, Leng W, et al. cDNA microarray analysis of the expression profiles of *Trichophyton rubrum* in response to novel synthetic fatty acid synthase inhibitor PHS11A. *Fungal Genet Biol* 2007; **44**: 1252–1261.
- Zhao R, Bin W, Diao Y, et al. Global transcriptional profiles of *Trichophyton rubrum* in response to Flucytosine. *Sci China C Life Sci* 2009; **52**: 1173–1185.
- Kofla G, Turner V, Schulz B, et al. Doxorubicin induces drug efflux pumps in *Candida albicans*. *Med Mycol* 2011; **49**: 132–142.
- Cleary IA, Mulabagal P, Reinhard SM, et al. Pseudohyphal regulation by the transcription factor Rfg1p in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 2010; **9**: 1363–1373.
- Xie Z, Feng P, Zhang J, et al. Molecular cloning, characterization and differential expression of *Cdc42* in *Fonsecaea monophora*. *Mol Biol Rep* 2011.
- Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 2004; **64**: 5245–5250.
- Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* 2004; **26**: 509–515.
- Paão FG, Segato F, Cursino-Santos JR, Peres NT, Martinez-Rossi NM. Analysis of *Trichophyton rubrum* gene expression in response to cytotoxic drugs. *FEMS Microbiol Lett* 2007; **271**: 180–186.
- Segato F, Nozawa SR, Rossi A, Martinez-Rossi NM. 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* 2008; **46**: 135–139.
- 30 Silveira HCS, Gras DE, Cazzaniga RA, *et al*. Transcriptional profiling reveals genes in the human pathogen *Trichophyton rubrum* that are expressed in response to pH signaling. *Microb Pathog* 2010; **48**: 91–96.
- 31 Nailis H, Coenye T, Van Nieuwerburgh F, Deforce D, Nelis HJ. Development and evaluation of different normalization strategies for gene expression studies in *Candida albicans* biofilms by real-time PCR. *BMC Mol Biol* 2006; **7**: 25.
- 32 Bohle K, Jungebloud A, Gocke Y, *et al*. Selection of reference genes for normalisation of specific gene quantification data of *Aspergillus niger*. *J Biotechnol* 2007; **132**: 353–358.
- 33 Teste MA, Duquenne M, Francois JM, Parrou JL. Validation of reference genes for quantitative expression analysis by real-time RT-PCR in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Mol Biol* 2009; **10**: 99.
- 34 Tang R, Dodd A, Lai D, McNabb WC, Love DR. Validation of zebrafish (*Danio rerio*) reference genes for quantitative real-time RT-PCR normalization. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2007; **39**: 384–390.

This paper was first published online on Early Online on 29 September 2011.