Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

**Expressão comparativa de genes em dermatófitos
durante o processo de interação com moléculas do
hospedeiro e em resposta a agentes antifúngicos**

Maíra Pompeu Martins

Ribeirão Preto - SP
2015

Maíra Pompeu Martins

**Expressão comparativa de genes em dermatófitos
durante o processo de interação com moléculas do
hospedeiro e em resposta a agentes antifúngicos**

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

Área de concentração: Genética

Orientadora: Prof^ª Dra. Nilce M. Martinez Rossi
Co-orientador: Prof. Dr. Antonio Rossi Filho

**Ribeirão Preto - SP
2015**

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

Ficha Catalográfica

Martins, Maíra Pompeu

Expressão comparativa de genes em dermatófitos durante o processo de interação com moléculas do hospedeiro e em resposta a agentes antifúngicos. Ribeirão Preto, 2015.

157 p. : il. ; 30cm

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

Orientadora: Prof^a. Dra. Nilce M. Martinez-Rossi

Co-orientador: Prof. Dr. Antonio Rossi Filho

1. Dermatófitos. 2. Genômica comparativa. 3. Interação patógeno-hospedeiro 4. Resistência a antifúngicos. 5. pH

Nome: MARTINS, Máira Pompeu

Título: Expressão comparativa de genes em dermatófitos durante o processo de interação com moléculas do hospedeiro e em resposta a agentes antifúngicos.

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

Área de concentração: Genética

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Apoio e Suporte Financeiro

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

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES

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

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:

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.

Família: alicerce, porto seguro.

Dedico

Agradecimentos

À Professora Dra. Nilce Maria Martinez Rossi pela confiança ao me aceitar em seu laboratório, pela orientação e exemplo de pessoa e pesquisadora.

Ao Professor Dr. Antonio Rossi Filho pela orientação, pelos questionamentos nos seminários ☺ e pela generosidade em compartilhar o conhecimento.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade em avaliar e discutir o presente trabalho.

Aos professores, colegas e funcionários do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

À CAPES, CNPq, FAPESP e FAEPA pelo suporte financeiro.

“Tudo posso n'Aquele que me fortalece”

Filipenses 4:13

Resumo

MARTINS, M. P. **Expressão comparativa de genes em dermatófitos durante o processo de interação com moléculas do hospedeiro e em resposta a agentes antifúngicos.** 2015. 157 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP, 2015.

Dermatófitos são um grupo de fungos intimamente relacionados, que tem a capacidade de invadir tecidos queratinizados como pele, cabelos e unhas de homens e outros animais causando dermatofitoses. Os agentes envolvidos nessas infecções pertencem aos gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* ou *Epidermophyton* e, de acordo com seu habitat natural, são classificados em espécies geofílicas, zoofílicas ou antropofílicas. A maior incidência de dermatofitoses é causada pelo gênero *Trichophyton*, sendo *T. rubrum* a espécie mais prevalente em infecções de pele e unhas em humanos. Devido à severidade e longevidade destas infecções, e à resistência ao tratamento, o estudo de fatores envolvidos na interação patógeno-hospedeiro, na resistência dos dermatófitos a agentes antifúngicos e na manutenção do processo infeccioso são de grande relevância. Por análises morfológicas, fisiológicas e de expressão gênica, comparamos cinco dermatófitos cujos genomas foram sequenciados por iniciativa do Broad Institute, *Microsporum canis*, *Trichophyton equinum*, *Trichophyton interdigitale*, *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton tonsurans*. Cultivos em queratina, mimetizando o processo infeccioso, foram utilizados para analisar o envolvimento dos dermatófitos na interação patógeno-hospedeiro e manutenção do processo infeccioso. Também expusemos as espécies a concentrações subinibitórias de agentes terapêuticos, de modo a verificar a resposta destes fungos a diferentes drogas. Observamos que o acúmulo de transcritos dos genes relacionados à virulência em dermatófitos avaliados durante o crescimento em queratina sugere que a maquinaria metabólica com atividade de formação da parede celular do fungo, metabolização do substrato e adesão ao hospedeiro ativa nos períodos iniciais de infecção. Contudo, um padrão de expressão correlacionado à similaridade das sequências genômicas não foi observado nas condições testadas. Também não se observa correlação direta entre o nicho preferencial dos dermatófitos e os níveis transcricionais em resposta à queratina de origem animal. Analisamos três genes envolvidos na resistência a múltiplas drogas (MDR) durante crescimento na presença de drogas com atividade antifúngica. Nossos dados sugerem que os genes MDR atuam sinergicamente em dermatófitos, e podem atuar de forma compensatória quando em presença de drogas antifúngicas, o que pode ser uma importante causa de falhas no tratamento. Nossos resultados fornecem evidências de que a expressão dos genes analisados não se correlaciona com as relações filogenéticas entre estes dermatófitos, visto que apesar da íntima relação entre o conteúdo genético e organização do genoma, os níveis transcricionais destes genes são diferentes entre as espécies. Assim, diferenças na adaptação a nichos específicos e a progressão da doença entre os dermatófitos podem ser explicadas por diferentes perfis de transcrição do gene.

Palavras-chave: Dermatófitos, Genômica comparativa, Interação patógeno-hospedeiro, Resistência a antifúngicos, pH

Abstract

MARTINS, M. P. **Comparative expression of genes in dermatophytes during interaction with the host environment and in response to antifungal agents.** 2015. 157 p. PhD (Thesis) – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Dermatophytes are a group of closely related fungi, which have the ability to invade keratinized tissues, such as skin, hair, and nails of both human and animal hosts causing dermatophytosis. The agents involved in these infections belong to the genera *Trichophyton*, *Microsporum* or *Epidermophyton* and, according to their natural habitat, are classified as geophilic, zoophilic or anthropophilic species. The higher incidence of dermatophytosis is caused by the genera *Trichophyton*, being the specie *T. rubrum* the most prevalent causative of human skin and nail infections. Because of the severity and longevity of these infections and their resistance to treatment, the study of the factors involved in host-pathogen interaction, in resistance of dermatophytes to antifungal agents, and in maintenance of the infection is relevant. Through morphological, physiological and gene expression analysis we compared five dermatophytes, whose genomes were sequenced by initiative of the Broad Institute: *Microsporum canis*, *Trichophyton equinum*, *Trichophyton interdigitale*, *T. rubrum* and *Trichophyton tonsurans*. Growth in keratin, which mimetize the infectious process, was used to analyze the involvement of dermatophytes in host-pathogen interaction and maintenance of the infectious process. We also exposed the species to subinibitory concentrations of therapeutic agents to verify the response of these fungi to different drugs. We observed that the accumulation of transcripts of genes related to virulence in dermatophytes evaluated during growth in keratin, suggest that the metabolic machinery with activity on fungal cell wall formation, substrate metabolization, and host adhesion is activated in early stages of infection. However, an expression pattern correlating to genomic sequence similarity was not observed in the conditions tested. We also did not observe a direct correlation between the preferential niche of these dermatophytes and the transcriptional levels in response to the keratin from animal origin. We analyze three genes involved in multidrug resistance (MDR) during growth in the presence of drugs with antifungal activity. Our data suggest that MDR genes act synergistically in dermatophytes, and they may compensate for one another when challenged with antifungal drugs, which can be an important cause of therapeutic failure. We provide evidence that the expression of the analyzed genes does not correlate with the phylogeny of these dermatophytes since, in spite of the different species being highly related in gene content and genome organization, the transcription level of these genes is different among these species. Thus, differences in adaptation to a specific niche and disease progression among dermatophytes would be explained by different gene transcription profiles.

Keywords: Dermatophytes, Comparative genomics, Host–pathogen interaction, Antifungal resistance, pH

Lista de ilustrações

Figura 1. Relação filogenética entre dermatófitos com base em dados de sequências ITS. Para a construção da árvore, o modelo Kimura 2-parâmetros e o método Neighbour Joining foram utilizados. <i>Keratinomyces ceretanicus</i> foi utilizado como grupo externo. Espécies antropofílicas estão identificadas em preto, em vermelho, espécies zoofílicas e em verde, espécies geofílicas (Graser <i>et al.</i> , 2008).	24
Figura 2. Aspecto da colônia de <i>M. canis</i> cultivado em meio Extrato de Malte-Ágar (MEA): A. Anverso da colônia. B. Reverso da colônia.	27
Figura 3. Aspecto da colônia de <i>T. equinum</i> cultivado em meio MEA: A. Anverso da colônia. B. Reverso da colônia.	28
Figura 4. Aspecto da colônia de <i>T. interdigitale</i> cultivado em meio MEA: A. Anverso da colônia. B. Reverso da colônia.	29
Figura 5. Aspecto da colônia de <i>T. rubrum</i> cultivado em meio MEA: A. Anverso da colônia. B. Reverso da colônia.	30
Figura 6. Aspecto da colônia de <i>T. tonsurans</i> cultivado em meio MEA: A. Anverso da colônia. B. Reverso da colônia.	31
Figura 7. Via de biossíntese do ergosterol e classes de medicamentos comumente usados: alilaminas, azóis e morfolinos. CoA, coenzima A.	35
Figura 8. Estrutura química da anfotericina B.	36
Figura 9. Estrutura química do itraconazol.	36
Figura 10. Estrutura química da terbinafina.	37
Figura 11. Estrutura química da griseofulvina.	37
Figura 12. Relação de germinação de conídios entre espécies de dermatófitos. Resultados representativos da média entre três placas, em três experimentos independentes. Barras de erro indicam desvio padrão.	58
Figura 13. Progressão de desenvolvimento radial dos dermatófitos em meio MEA. Resultados representativos da média entre três placas, em três experimentos independentes. Barras de erro indicam desvio padrão.	58
Figura 14. Progressão de desenvolvimento radial dos dermatófitos em meio mínimo contendo queratina como fonte de carbono. Resultados representativos da média entre três placas, em três experimentos independentes. Barras de erro indicam desvio padrão.	59
Figura 15. Fotomicrografias de <i>M. canis</i> em diferentes substratos queratinizados por períodos de 24 a 96 horas. Substratos indicados com asteriscos e os fungos, com setas (x40).	60
Figura 16. Fotomicrografias de <i>T. equinum</i> e <i>T. interdigitale</i> cultivados em diferentes substratos queratinizados por períodos de 24 a 96 horas. Substratos indicados com asteriscos e os fungos, com setas (x40).	61
Figura 17. Fotomicrografias de <i>T. rubrum</i> e <i>T. tonsurans</i> cultivados em diferentes substratos queratinizados por períodos de 24 a 96 horas. Substratos indicados com asteriscos e os fungos, com setas (x40).	62

Figura 18. Fotomicrografias dos controles do experimento: cabelo, unhas humanas e fragmentos de casco bovino, em sequência (x10).	63
Figura 19. Alteração do pH extracelular em relação aos tempos de cultivo em meio contendo queratina. Dados representativos da média entre três experimentos independentes. Barras de erro indicam desvio padrão.	64
Figura 20. Representação esquemática do gene que codifica para o fator de transcrição PacC em dermatófitos. Éxons indicados nas regiões preenchidas, com seus respectivos números de nucleotídeos indicados em azul. Regiões intrônicas nos intervalos, com seus respectivos tamanhos indicados em vermelho. A escala corresponde a 100 bases. Espécies identificadas pelas siglas, seguido do número de identificação do gene nos genomas.....	67
Figura 21. Valores relativos de acúmulo de transcritos (por RT-qPCR) do gene <i>pacC</i> obtidos a partir de cultivos em meio contendo água e queratina bovina como fonte nutricional. As análises foram realizadas em comparação a <i>M. canis</i> no tempo de 24 horas de cultivo. Significância estatística determinada utilizando teste de Bonferroni <i>ad hoc</i> e indicada por asteriscos: * indicando $p < 0.05$; ** indicando $p < 0.01$; *** indicando $p < 0.001$. As análises estatísticas apresentadas abaixo dos gráficos indicam as relações de significância em relação ao tempo de 24 horas por espécie.	68
Figura 22. Representação esquemática do gene que codifica para uma proteína da família GEL em dermatófitos. Éxons indicados nas regiões preenchidas, com seus respectivos números de nucleotídeos indicados em azul. Regiões intrônicas nos intervalos, com seus respectivos tamanhos indicados em vermelho. A escala corresponde a 100 bases. Espécies identificadas pelas siglas, seguido do número de identificação do gene nos genomas.....	70
Figura 23. Valores relativos de acúmulo de transcritos (por RT-qPCR) do gene <i>gell</i> obtidos a partir de cultivos em meio contendo água e queratina bovina como fonte nutricional. As análises estatísticas foram realizadas em comparação a <i>M. canis</i> no tempo de 24 horas de cultivo. Significância estatística determinada utilizando teste de Bonferroni <i>ad hoc</i> e indicadas por asteriscos: * indicando $p < 0.05$; ** indicando $p < 0.01$; *** indicando $p < 0.001$. As análises estatísticas apresentadas abaixo dos gráficos indicam as relações de significância em relação ao tempo de 24 horas por espécie.....	71
Figura 24. Representação esquemática do gene que codifica para uma proteína acessória UreD em dermatófitos. Éxons indicados nas regiões preenchidas e regiões intrônicas nos intervalos. A escala corresponde a 100 bases. Espécies identificadas pelas siglas seguido do número de identificação do gene no genoma.	74
Figura 25. Valores relativos de acúmulo de transcritos (por RT-qPCR) do gene que codifica para uma proteína acessória UreD obtidos a partir de cultivos em meio contendo água e queratina bovina como fonte nutricional. As análises estatísticas foram realizadas em comparação a <i>M. canis</i> no tempo de 24 horas de cultivo. Significância estatística determinada utilizando teste de Bonferroni <i>ad hoc</i> e indicadas por asteriscos: * indicando $p < 0.05$; ** indicando $p < 0.01$; *** indicando $p < 0.001$. As análises estatísticas apresentadas abaixo dos gráficos indicam as relações de significância em relação ao tempo de 24 horas por espécie.	75

Figura 26. Sequências consenso com resíduos mais conservados identificados (sublinhados) para o fator de transcrição APSES (StuA) por alinhamento entre os dermatófitos e StuA de <i>A. nidulans</i>	77
Figura 27. Representação esquemática do gene <i>stuA</i> em dermatófitos. Éxons indicados nas regiões preenchidas, com seus respectivos números de nucleotídeos indicados em azul. Regiões intrônicas nos intervalos, com seus respectivos tamanhos indicados em vermelho. A escala corresponde a 100 bases. Espécies identificadas pelas siglas, seguido do número de identificação do gene nos genomas.	78
Figura 28. Valores relativos de acúmulo de transcritos (por RT-qPCR) do gene <i>stuA</i> obtidos a partir de cultivos em meio contendo água e queratina bovina como fonte nutricional. As análises estatísticas foram realizadas em comparação a <i>M. canis</i> no tempo de 24 horas de cultivo. Significância estatística determinada utilizando teste de Bonferroni <i>ad hoc</i> e indicadas por asteriscos: * indicando $p < 0.05$; ** indicando $p < 0.01$; *** indicando $p < 0.001$. As análises estatísticas apresentadas abaixo dos gráficos indicam as relações de significância em relação ao tempo de 24 horas por espécie.....	79
Figura 29. Representação esquemática do gene que codifica para uma Sub3 em dermatófitos. Éxons indicados nas regiões preenchidas, com seus respectivos números de nucleotídeos indicados em azul. Regiões intrônicas nos intervalos, com seus respectivos tamanhos indicados em vermelho. A escala corresponde a 100 bases. Espécies identificadas pelas siglas, seguido do número de identificação do gene nos genomas.....	82
Figura 30. Valores relativos de acúmulo de transcritos (por RT-qPCR) do gene <i>sub3</i> obtidos a partir de cultivos em meio contendo água e queratina bovina como fonte nutricional. As análises estatísticas foram realizadas em comparação a <i>M. canis</i> no tempo de 24 horas de cultivo. Significância estatística determinada utilizando teste de Bonferroni <i>ad hoc</i> e indicadas por asteriscos: * indicando $p < 0.05$; ** indicando $p < 0.01$; *** indicando $p < 0.001$. As análises estatísticas apresentadas abaixo dos gráficos indicam as relações de significância em relação ao tempo de 24 horas por espécie.....	83
Figura 31. Representação esquemática do gene <i>lpl</i> em dermatófitos. Éxons indicados nas regiões preenchidas, com seus respectivos números de nucleotídeos indicados em azul. Regiões intrônicas nos intervalos, com seus respectivos tamanhos indicados em vermelho. A escala corresponde a 100 bases. Espécies identificadas pelas siglas, seguido do número de identificação do gene nos genomas.	85
Figura 32. Valores relativos de acúmulo de transcritos (por RT-qPCR) do gene que codifica para uma lisofosfolipase obtidos a partir de cultivos em meio contendo água e queratina bovina como fonte nutricional. As análises estatísticas foram realizadas em comparação a <i>M. canis</i> no tempo de 24 horas de cultivo. Significância estatística determinada utilizando teste de Bonferroni <i>ad hoc</i> e indicadas por asteriscos: * indicando $p < 0.05$; ** indicando $p < 0.01$; *** indicando $p < 0.001$. As análises estatísticas apresentadas abaixo dos gráficos indicam as relações de significância em relação ao tempo de 24 horas por espécie.....	86
Figura 33. Representação esquemática do gene <i>eglC</i> em dermatófitos. Éxons indicados nas regiões preenchidas, com seus respectivos números de nucleotídeos indicados em azul. Regiões intrônicas	

nos intervalos, com seus respectivos tamanhos indicados em vermelho. A escala corresponde a 100 bases. Espécies identificadas pelas siglas, seguido do número de identificação do gene nos genomas.	89
Figura 34. Valores relativos de acúmulo de transcritos (por RT-qPCR) do gene <i>eglC</i> obtidos a partir de cultivos em meio contendo água e queratina bovina como fonte nutricional. As análises estatísticas foram realizadas em comparação a <i>M. canis</i> no tempo de 24 horas de cultivo. Significância estatística determinada utilizando teste de Bonferroni <i>ad hoc</i> e indicadas por asteriscos: * indicando $p < 0.05$; ** indicando $p < 0.01$; *** indicando $p < 0.001$. As análises estatísticas apresentadas abaixo dos gráficos indicam as relações de significância em relação ao tempo de 24 horas por espécie.....	90
Figura 35. Representação esquemática do gene <i>chiB1</i> em dermatófitos. Éxons indicados nas regiões preenchidas, com seus respectivos números de nucleotídeos indicados em azul. Regiões intrônicas nos intervalos, com seus respectivos tamanhos indicados em vermelho. A escala corresponde a 100 bases. Espécies identificadas pelas siglas, seguido do número de identificação do gene nos genomas.	92
Figura 36. Valores relativos de acúmulo de transcritos (por RT-qPCR) do gene <i>chiB1</i> , obtidos a partir de cultivos em meio contendo água e queratina bovina como fonte nutricional. As análises estatísticas foram realizadas em comparação a <i>M. canis</i> no tempo de 24 horas de cultivo. Significância estatística determinada utilizando teste de Bonferroni <i>ad hoc</i> e indicadas por asteriscos: * indicando $p < 0.05$; ** indicando $p < 0.01$; *** indicando $p < 0.001$. As análises estatísticas apresentadas abaixo dos gráficos indicam as relações de significância em relação ao tempo de 24 horas por espécie.....	92
Figura 37. Representação esquemática do gene <i>ocpB</i> em dermatófitos. Éxons indicados nas regiões preenchidas, com seus respectivos números de nucleotídeos indicados em azul. Regiões intrônicas nos intervalos, com seus respectivos tamanhos indicados em vermelho. A escala corresponde a 100 bases. Espécies identificadas pelas siglas, seguido do número de identificação do gene nos genomas.	94
Figura 38. Valores relativos de acúmulo de transcritos (por RT-qPCR) do gene que codifica para uma carboxipeptidase, obtidos a partir de cultivos em meio contendo água e queratina bovina como fonte nutricional. As análises estatísticas foram realizadas em comparação a <i>M. canis</i> no tempo de 24 horas de cultivo. Significância estatística determinada utilizando teste de Bonferroni <i>ad hoc</i> e indicadas por asteriscos: * indicando $p < 0.05$; ** indicando $p < 0.01$; *** indicando $p < 0.001$. As análises estatísticas apresentadas abaixo dos gráficos indicam as relações de significância em relação ao tempo de 24 horas por espécie.....	95
Figura 39. Representação esquemática do gene que codifica para uma cisteína dioxigenase em dermatófitos. Éxons indicados nas regiões preenchidas, com seus respectivos números de nucleotídeos indicados em azul. Regiões intrônicas nos intervalos, com seus respectivos tamanhos indicados em vermelho. A escala corresponde a 100 bases. Espécies identificadas pelas siglas, seguido do número de identificação do gene nos genomas.....	98

- Figura 40. Valores relativos de acúmulo de transcritos (por RT-qPCR) do gene *cdo1* obtidos a partir de cultivos em meio água contendo queratina bovina como fonte nutricional. As análises estatísticas foram realizadas em comparação a *M. canis* no tempo de 24 horas de cultivo. Significância estatística determinada utilizando teste de Bonferroni *ad hoc* e indicadas por asteriscos: * indicando $p < 0.05$; ** indicando $p < 0.01$; *** indicando $p < 0.001$. As análises estatísticas apresentadas abaixo dos gráficos indicam as relações de significância em relação ao tempo de 24 horas por espécie..... 99
- Figura 41. Representação esquemática do gene que codifica para uma bomba de efluxo de sulfito em dermatófitos. Éxons indicados nas regiões preenchidas, com seus respectivos números de nucleotídeos indicados em azul. Regiões intrônicas nos intervalos, com seus respectivos tamanhos indicados em vermelho. A escala corresponde a 100 bases. Espécies identificadas pelas siglas, seguido do número de identificação do gene nos genomas..... 100
- Figura 42. Valores relativos de acúmulo de transcritos (por RT-qPCR) do gene *ssu1* obtidos a partir de cultivos em meio contendo água e queratina bovina como fonte nutricional. As análises estatísticas foram realizadas em comparação a *M. canis* no tempo de 24 horas de cultivo. Significância estatística determinada utilizando teste de Bonferroni *ad hoc* e indicadas por asteriscos: * indicando $p < 0.05$; ** indicando $p < 0.01$; *** indicando $p < 0.001$. As análises estatísticas apresentadas abaixo dos gráficos indicam as relações de significância em relação ao tempo de 24 horas por espécie..... 101
- Figura 43. Representação esquemática do gene que codifica para uma proteína MDR1 em dermatófitos. Éxons indicados nas regiões preenchidas, com seus respectivos números de nucleotídeos indicados em azul. Regiões intrônicas nos intervalos, com seus respectivos tamanhos indicados em vermelho. A escala corresponde a 100 bases. Espécies identificadas pelas siglas, seguido do número de identificação do gene nos genomas..... 106
- Figura 44. Representação esquemática do gene que codifica para uma proteína MDR2 em dermatófitos. Éxons indicados nas regiões preenchidas, com seus respectivos números de nucleotídeos indicados em azul. Regiões intrônicas nos intervalos, com seus respectivos tamanhos indicados em vermelho. A escala corresponde a 100 bases. Espécies identificadas pelas siglas, seguido do número de identificação do gene nos genomas..... 107
- Figura 45. Representação esquemática do gene que codifica para uma proteína MDR4 em dermatófitos. Éxons indicados nas regiões preenchidas, com seus respectivos números de nucleotídeos indicados em azul. Regiões intrônicas nos intervalos, com seus respectivos tamanhos indicados em vermelho. A escala corresponde a 100 bases. Espécies identificadas pelas siglas, seguido do número de identificação do gene nos genomas..... 108
- Figura 46. Parte do alinhamento dos ortólogos da proteína MDR4 indicando, sublinhadas, regiões transmembrana. *T. tonsurans* (TESG_00713) apresenta um gap em região conservada, sugerindo falha no sequenciamento. *T. interdigitale* (H101_05743), *T. equinum* (TEQG_08364), *T. rubrum* (TERG_07801) e *M. canis* (MCYG_01685). 109
- Figura 47. Parte do alinhamento dos ortólogos da proteína MDR2 indicando, sublinhadas, regiões transmembrana. *T. equinum* (TEQG_03450) apresenta um gap em região conservada, sugerindo

falha no sequenciamento. *T. interdigitale* (H101_02705), *T. tonsurans* (TESG_00664), *T. rubrum* (TERG_08613) e *M. canis* (MCYG_01745). Com asteriscos, regiões consenso nos genomas..... 109

Figura 48. Níveis de acúmulo de transcritos do gene *mdr1* por RT-qPCR. Acúmulo de mRNA avaliado após exposição a meio RPMI (controle) ou meio RPMI contendo concentrações subinibitórias de anfotericina B (AMB), griseofulvina (GRS), itraconazol (ITRA) ou terbinafina (TRB), por 15 ou 60 minutos de exposição. Níveis de acúmulo de transcritos representado por *fold change* em relação ao experimento controle (sem droga) de *T. interdigitale*. Barras nas colunas representam o desvio padrão de três experimentos independentes. A significância estatística foi avaliada pelo teste Bonferroni *ad hoc* e indicadas por asteriscos: * indica $p < 0,05$; ** indica $p < 0,01$; *** indica $p < 0,001$. Análises estatísticas indicadas acima das colunas correlacionam o experimento controle de *T. interdigitale* em comparação às demais condições experimentais. Análises estatísticas indicadas abaixo dos gráficos correlacionam cada fungo com seu próprio experimento controle..... 110

Figura 49. Níveis de acúmulo de transcritos do gene *mdr2* por RT-qPCR. Acúmulo de mRNA avaliado após exposição a meio RPMI (controle) ou meio RPMI contendo concentrações subinibitórias de anfotericina B (AMB), griseofulvina (GRS), itraconazol (ITRA) ou terbinafina (TRB), por 15 ou 60 minutos de exposição. Níveis de acúmulo de transcritos representado por *fold change* em relação ao experimento controle (sem droga) de *T. interdigitale*. Barras nas colunas representam o desvio padrão de três experimentos independentes. A significância estatística foi avaliada pelo teste Bonferroni *ad hoc* e indicadas por asteriscos: * indica $p < 0,05$; ** indica $p < 0,01$; *** indica $p < 0,001$. Análises estatísticas indicadas acima das colunas correlacionam o experimento controle de *T. interdigitale* em comparação às demais condições experimentais. Análises estatísticas indicadas abaixo dos gráficos correlacionam cada fungo com seu próprio experimento controle..... 112

Figura 50. Níveis de acúmulo de transcritos do gene *mdr4* por RT-qPCR. Acúmulo de mRNA avaliado após exposição a meio RPMI (controle) ou meio RPMI contendo concentrações subinibitórias de anfotericina B (AMB), griseofulvina (GRS), itraconazol (ITRA) ou terbinafina (TRB), por 15 ou 60 minutos de exposição. Níveis de acúmulo de transcritos representado por *fold change* em relação ao experimento controle (sem droga) de *T. interdigitale*. Barras nas colunas representam o desvio padrão de três experimentos independentes. A significância estatística foi avaliada pelo teste Bonferroni *ad hoc* e indicadas por asteriscos: * indica $p < 0,05$; ** indica $p < 0,01$; *** indica $p < 0,001$. Análises estatísticas indicadas acima das colunas correlacionam o experimento controle de *T. interdigitale* em comparação às demais condições experimentais. Análises estatísticas indicadas abaixo dos gráficos correlacionam cada fungo com seu próprio experimento controle..... 113

Figura 51. Níveis de acúmulo de transcritos dos genes *mdr2* e *mdr4*, apresentados em sequência, verificados por RT-qPCR. *T. equinum* e *T. rubrum* em meio SDB foram cultivados por 96 horas. *T. equinum*, *T. interdigitale* e *T. rubrum* em meio RPMI foram cultivados igualmente em meio SDB por 96 horas, e o micélio resultante foi lavado assepticamente, transferido para meio RPMI, e cultivados durante 3 horas adicionais. Os níveis de acúmulo de transcritos do gene estão representados em relação à amostra controle de *T. interdigitale*. Barras nas colunas representam o desvio padrão dos dados obtidos a partir de três experiências independentes. A significância

estatística foi avaliada pelo teste de Bonferroni *ad hoc* e indicada por asteriscos: * indica $p < 0,05$;

** Indica $p < 0,01$; *** Indica $p < 0,001$ 114

Figura 52. Níveis de acúmulo de transcritos dos genes *mdr1* (acima) e *mdr4* (abaixo) por RT-qPCR na espécie *T. interdigitale* e em seu mutante $\Delta mdr2$. Acúmulo de mRNA avaliado após exposição a meio RPMI (controle) ou meio RPMI contendo concentrações subinibitórias de anfotericina B (AMB), griseofulvina (GRS), itraconazol (ITRA) ou terbinafina (TRB), por 15 ou 60 minutos de exposição. Níveis de acúmulo de transcritos representado por *fold change* em relação ao experimento controle (sem droga) de *T. interdigitale*. Barras nas colunas representam o desvio padrão de três experimentos independentes. A significância estatística foi avaliada pelo teste Bonferroni *ad hoc* e indicadas por asteriscos: * indica $p < 0,05$; ** indica $p < 0,01$; *** indica $p < 0,001$. Análises estatísticas indicadas acima das colunas correlacionam o experimento controle de *T. interdigitale* em comparação às demais condições experimentais. Análises estatísticas indicadas abaixo dos gráficos correlacionam cada linhagem com seu próprio experimento controle. 115

Figura 53. Efeitos da deleção do gene *mdr2* sobre o crescimento de *T. interdigitale* (wild-type) na presença de drogas: AMB (0,07 ug / ml, correspondente a 70% da MIC), GRS (0,04 ug / ml, 1% da MIC) ITRA (0,002 ug / ml, 50 % de MIC), e TRB (0,008 ug / mL, 1% de MIC). As células foram pingadas sobre placas contendo meio MEA, em diluições seriadas (1×10^7 células na primeira posição, até 1×10^3 células). As células foram cultivadas a 28 ° C durante 48 h (A) e 72 horas (B).

..... 116

Lista de tabelas

Tabela 1. Componentes do meio RPMI-1640.	44
Tabela 2. Susceptibilidade <i>in vitro</i> a agentes antifúngicos e valores de concentração subinibitória para <i>T. equinum</i> , <i>T. interdigitale</i> , <i>T. rubrum</i> e <i>T. tonsurans</i>	48
Tabela 3. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de RT-qPCR	52
Tabela 4. Número de éxons e íntrons, tamanho do gene e proteína predita e identificações de famílias para o gene <i>pacC</i>	67
Tabela 5. Número de éxons e íntrons, tamanho do gene e proteína predita e identificações de famílias para <i>gell</i>	70
Tabela 6. Número de éxons e íntrons, tamanho do gene e proteína predita, e identificações de famílias para o gene <i>ureD</i>	74
Tabela 7. Número de éxons e íntrons, tamanho do gene e proteína predita, e identificações de famílias para o gene <i>stuA</i>	78
Tabela 8. Número de éxons e íntrons, tamanho do gene e proteína predita, e identificações de famílias do gene <i>sub3</i>	82
Tabela 9. Número de éxons e íntrons, tamanho do gene e proteína predita, e identificações de famílias para o gene <i>lpl</i>	85
Tabela 10. Número de éxons e íntrons, tamanho do gene e proteína predita, e identificações de famílias para o gene <i>eglC</i>	88
Tabela 11. Número de éxons e íntrons, tamanho do gene e proteína predita, e identificações de famílias para o gene <i>chiB1</i>	91
Tabela 12. Número de éxons e íntrons, tamanho do gene e proteína predita, e identificações de famílias para o gene <i>ocpB</i>	94
Tabela 13. Número de éxons e íntrons, tamanho do gene e proteína predita, e identificações de famílias para o gene <i>cdol</i>	97
Tabela 14. Número de éxons e íntrons, tamanho do gene e proteína predita e identificações de famílias para o gene <i>ssu1</i>	99
Tabela 15. Número de éxons e íntrons, tamanho do gene e proteína predita e identificações de famílias para o gene <i>mdr1</i>	105
Tabela 16. Número de éxons e íntrons, tamanho do gene e da proteína predita e identificações de famílias para o gene <i>mdr2</i>	106
Tabela 17. Número de éxons e íntrons, tamanho do gene e da proteína predita e identificações de famílias para o gene <i>mdr4</i>	107

SUMÁRIO

I.	INTRODUÇÃO.....	20
II.	REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1	DERMATÓFITOS	23
2.1.1	<i>Microsporum canis</i>	26
2.1.2	<i>Trichophyton equinum</i>	27
2.1.3	<i>Trichophyton interdigitale</i>	28
2.1.4	<i>Trichophyton rubrum</i>	29
2.1.5	<i>Trichophyton tonsurans</i>	30
2.2	ANÁLISE COMPARATIVA DE EXPRESSÃO GÊNICA EM DERMATÓFITOS DURANTE O PROCESSO DE INTERAÇÃO COM MOLÉCULAS DO HOSPEDEIRO	31
2.2.1	<i>Regulação da expressão gênica pelo pH ambiente e o fator de transcrição PacC</i>	33
2.3	ANÁLISE COMPARATIVA DE EXPRESSÃO GÊNICA EM DERMATÓFITOS EM RESPOSTA A AGENTES ANTIFÚNGICOS.....	34
2.3.1	<i>Resistência a múltiplas drogas</i>	38
2.3.2	<i>Transportadores do tipo ABC e atividade de extrusão de toxicantes em dermatófitos</i>	39
III.	HIPÓTESE	40
IV.	OBJETIVOS.....	41
V.	MATERIAIS E MÉTODOS	43
5.1	LINHAGENS	43
5.2	MEIOS DE CULTURA	43
5.2.1	<i>Meio Extrato de Malte-Ágar (MEA)</i>	43
5.2.2	<i>Meio Sabouraud Dextrose Broth - SDB</i>	44
5.2.3	<i>Meio RPMI-1640</i>	44
5.2.4	<i>Meio com queratina</i>	45
5.2.5	<i>Meio mínimo</i>	45
5.2.6	<i>Meios com substratos queratinizados</i>	46
5.3	SOLUÇÕES.....	46
5.3.1	<i>Soluções de agentes inibidores</i>	46
5.3.2	<i>Soluções para RNA</i>	47
5.3.3	<i>Outras soluções</i>	47
5.4	CONDIÇÕES INICIAIS DE CULTIVO DAS LINHAGENS	47
5.5	PREPARO DA SUSPENSÃO DE CONÍDIOS	48
5.6	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM).....	48
5.7	CONDIÇÕES DE CULTIVO	49

5.7.1	<i>Cultivo em meio ágar para análises comparativas</i>	49
5.7.2	<i>Cultivo em queratina</i>	49
5.7.3	<i>Cultivo em meio com drogas</i>	49
5.8	EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL	50
5.8.1	<i>Cultivo em queratina</i>	50
5.8.2	<i>Cultivo em presença de agentes antifúngicos</i>	50
5.9	ESTUDO DO PERFIL TRANSCRICIONAL COMPARATIVO POR PCR EM TEMPO REAL	51
5.9.1	<i>Síntese de cDNA</i>	51
5.9.2	<i>Construção de oligonucleotídeos</i>	51
5.9.3	<i>Análise dos genes diferencialmente expressos</i>	55
5.10	ANÁLISE COMPARATIVA DA DISPOSIÇÃO DE ÉXONS E ÍNTRONS	55
5.11	ANÁLISE DE RELAÇÕES FILOGENÉTICAS	56
5.12	BUSCA POR MOTIVOS DE LIGAÇÃO AO DNA NAS REGIÕES PROMOTORAS	56
5.13	ANÁLISE DE DOMÍNIOS TRANSMEMBRANA DOS GENES DA FAMÍLIA MDR	56
VI.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
6.1	ANÁLISE COMPARATIVA DE EXPRESSÃO GÊNICA EM DERMATÓFITOS DURANTE O PROCESSO DE INTERAÇÃO COM MOLÉCULAS DO HOSPEDEIRO	63
6.2	ANÁLISE COMPARATIVA DE EXPRESSÃO GÊNICA EM DERMATÓFITOS EM RESPOSTA A AGENTES ANTIFÚNGICOS	103
VII.	CONCLUSÕES	118
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120
	ANEXOS	133
A.	RELAÇÃO FILOGENÉTICA ENTRE AS SEQUÊNCIAS DOS GENES ANALISADOS POR RT-QPCR	133
B.	ARTIGO SUBMETIDO	137

I. Introdução

Estudos de genômica comparativa estiveram, até recentemente, limitados pelo pequeno número de sequências disponíveis impedindo, assim, a geração de hipóteses sobre temas relevantes, como a patogenicidade de fungos (Burmester *et al.*, 2011). Com o acesso a um crescente número de genomas, tem sido possível a realização de estudos comparativos entre espécies, próximas ou não filogeneticamente, visando explorar semelhanças, diferenças, e estabelecer relações interespecíficas, tal como as relações que fungos patógenos humanos estabelecem com seus hospedeiros.

A disponibilidade dos genomas de fungos patogênicos torna possível estudos em nível genético-molecular, elucidando as diferenças evolutivas, fisiológicas e adaptativas das espécies, cumprindo com a necessidade de ampliar o entendimento sobre os mecanismos de infecção, desenvolvimento e perpetuação da doença em hospedeiros humanos (Giddey *et al.*, 2007).

Por iniciativa do Broad Institute (MIT Harvard), foram sequenciados os genomas de diferentes espécies de dermatófitos, que inclui as mais prevalentes em infecções humanas (Martinez *et al.*, 2012), comparando-as a duas espécies previamente sequenciadas (Burmester *et al.*, 2011). Os dados gerados permitiram a identificação de categorias funcionais específicas comuns a todos os genomas de dermatófitos. Além disso, eventos recentes de ganhos e perda de genes entre estes fungos sugeriram candidatos responsáveis por funções de infecção e escolha de hospedeiros, o que poderia ajudar a orientar o desenvolvimento de novas terapias. Estas adaptações específicas das espécies podem ser importantes na interação com o sistema imune do hospedeiro, ou para a sobrevivência no ambiente da infecção (Martinez *et al.*, 2012).

Análises comparativas entre os genomas dos dermatófitos indicam que estas espécies apresentam poucas diferenças com relação ao conteúdo gênico e à organização de seus genomas, mas, apesar do significativo grau de conservação entre as sequências genômicas, cada espécie está adaptada a um hospedeiro específico e a substratos preferenciais. Esta especificidade de nichos pode estar relacionada com a regulação da expressão gênica de fatores de virulência e patogenicidade, atuando de forma específica nas diferentes espécies.

A fim de sobreviver no corpo humano, os dermatófitos, grupo especializado de fungos filamentosos que infectam estruturas queratinizadas, devem ser capazes de se adaptar aos nutrientes disponíveis e a estresses ambientais. Por isso, a regulação da expressão de genes associados à virulência ou relacionados com o processo de adaptação ao ambiente do hospedeiro apresenta grande importância. Os dermatófitos causam algumas das infecções fúngicas mais comuns no mundo, endêmicas em todos os continentes, exceto na Antártida (Martinez *et al.*, 2012), sobre as quais pouco se sabe a respeito, apesar da elevada prevalência da doença (Grumbt *et al.*, 2011). Estudar os mecanismos envolvidos na regulação da expressão gênica, em sua maioria ainda não totalmente esclarecidos, pode direcionar o entendimento a respeito da patologia e tratamento das dermatofitoses.

Alterações no padrão de expressão gênica dos microrganismos levam a uma resposta adaptativa, resultando na síntese e eventual exportação de moléculas que podem modificar o ambiente do hospedeiro. Em dermatófitos, a capacidade de invasão e instalação depende de fatores diversos, sendo a secreção de enzimas hidrolíticas um dos mais importantes para a patogenicidade, possivelmente modulado pelo pH ambiente que se altera em função de fatores ambientais como, por exemplo, o contato do fungo com o tecido hospedeiro (Martinez-Rossi *et al.*, 2004).

Sendo a adaptação ao pH ácido da pele uma condição necessária para os dermatófitos se instalarem, e que o pH do meio externo alcaliniza progressivamente em função do desenvolvimento dos dermatófitos (Ferreira-Nozawa *et al.*, 2006; Silveira *et al.*, 2010), destacamos a importância de se estudar a modulação da expressão gênica pelos fungos durante a interação com moléculas do ambiente hospedeiro, avaliando transcricionalmente genes relacionados à variação de pH e outros fatores associados à virulência destes dermatófitos. Para tanto, diferentes espécies de dermatófitos foram cultivadas em condições que mimetizam o ambiente do hospedeiro, permitindo analisar comparativamente as respostas destes organismos em nível de expressão gênica.

Além disto, foram feitas análises transcricionais de genes supostamente regulados durante a exposição dos patógenos a agentes inibidores, tendo como objetivo verificar possíveis mecanismos de adaptação ao estresse provocado, bem como mecanismos de resistência a drogas. Para tanto, cultivos de diferentes espécies de dermatófitos foram feitos em presença de drogas, com o intuito de avaliar comparativamente a expressão gênica diferencial em resposta aos agentes inibidores.

O somatório dos dados de sequenciamento dos genomas e dos estudos comparativos concernentes à expressão de genes potencialmente envolvidos na patogenicidade, ou relacionados aos mecanismos de defesa contra agentes antifúngicos possibilitarão compreender os elementos que tornam os dermatófitos capazes de se evadir dos mecanismos de defesa inatos e infectar diferentes hospedeiros.

Tendo em vista que os dermatófitos apresentam genomas relativamente compactos (22,5 - 24,1 Mb), conteúdo gênico altamente conservado, com poucos genes específicos para cada espécie e alta colinearidade entre eles, mas com grande diversidade de hospedeiros e nichos preferenciais (Cervelatti *et al.*, 2004; Martinez *et al.*, 2012; Coelho *et al.*, 2013), o presente trabalho visa analisar a expressão de alguns genes associados à patogenicidade e virulência, buscando verificar os mecanismos moleculares envolvidos no estabelecimento e perpetuação da infecção, entre diferentes espécies.

II. Revisão da literatura

Fungos são organismos eucariontes, heterotróficos uni ou pluricelulares que constituem um grupo diversificado em seus caracteres morfológicos e fisiológicos, abundantes na natureza, com capacidade de desenvolvimento em uma grande variedade de habitats, incluindo a microbiota de homens e animais. Embora amplamente distribuídos, apenas algumas espécies são consideradas patógenos animais e/ou humanas. A maioria destes agentes patogênicos causa infecções nas camadas superficiais do tegumento e poucos dão origem a infecções sistêmicas.

Dentre os muitos casos de infecções fúngicas em seres humanos e animais, grande parte é provocada por dermatófitos, um grupo especializado de fungos filamentosos que infectam estruturas queratinizadas. Os dermatófitos causam algumas das infecções fúngicas mais comuns no mundo, endêmicas em todos os continentes, exceto na Antártida (Martinez *et al.*, 2012). Apesar da elevada prevalência da doença, os mecanismos envolvidos na regulação da expressão gênica nestes organismos não estão ainda totalmente esclarecidos (Grumbt *et al.*, 2011). Estudos nesta área podem direcionar o entendimento a respeito da patologia e tratamento das dermatofitoses.

2.1 Dermatófitos

Fungos ascomicetos da família *Arthrodermataceae*, ordem *Onygenales*, os dermatófitos estão relacionados filogeneticamente a fungos do gênero *Coccidioides*, patógenos causadores de infecções pulmonares em humanos. São classificados em três gêneros: *Trichophyton*, *Microsporum* ou *Epidermophyton*, sendo que ao menos 40 das espécies de dermatófitos são conhecidamente agentes patogênicos humanos (White *et al.*, 2008; Martinez *et al.*, 2012).

Embora subdivididos em três gêneros, as relações filogenéticas entre as espécies de dermatófitos não suportam três divisões distintas (Figura 1), sugerindo que esses gêneros não são monofiléticos (Graser *et al.*, 2008; White *et al.*, 2008).

Figura 1. Relação filogenética entre dermatófitos com base em dados de sequências ITS. Para a construção da árvore, o modelo Kimura 2-parâmetros e o método Neighbour Joining foram utilizados. *Keratinomyces ceretanicus* foi utilizado como grupo externo. Espécies antropofílicas estão identificadas em preto, em vermelho, espécies zoofílicas e em verde, espécies geofílicas (Graser *et al.*, 2008).

As espécies de dermatófitos são caracterizadas em geofílicas, zoofílicas e antropofílicas com base em seu nicho ambiental: espécies geofílicas são comumente encontradas no solo e só raramente causam infecções em humanos. As espécies zoofílicas colonizam animais e, ocasionalmente, podem ser transmitidas aos seres humanos. Estas espécies são responsáveis por cerca de 30% das dermatofitoses humanas e geralmente causam inflamação aguda sobre a infecção. As espécies antropofílicas infectam seres humanos e são responsáveis pela maior parte (70%) da ocorrência de dermatofitoses neste hospedeiro. Estas

espécies causam doenças crônicas que progridem lentamente, sugerindo que os fungos passam por um período de adaptação ao ambiente colonizado (White *et al.*, 2008).

Os dermatófitos partilham a capacidade de invadir e se desenvolver em estruturas queratinizadas do hospedeiro tais como estrato córneo, cabelos e unhas. As lesões decorrentes da infecção por dermatófitos são circulares, eritematosas e pruriginosas, comumente denominadas pela palavra "*tinea*", seguida por um termo que se refere ao local infectado do corpo, por exemplo, *tinea pedis* (pé), *tinea capitis* (couro cabeludo ou cabeça), *tinea corporis* (corpo ou tronco) e *tinea ungueal* (unhas), também denominada onicomicose (Degreef, 2008). A utilização da queratina como fonte de carbono e nitrogênio é relacionada à atividade proteolítica extracelular, resultante da atuação de um grande número de proteases já identificadas em diferentes espécies de dermatófitos e associadas à virulência nestes fungos (Monod, 2008).

As infecções por dermatófitos vêm se tornando um importante problema de saúde pública uma vez que afetam 10-20% da população mundial, resultando em impactos socioeconômicos para diversos países (White *et al.*, 2008; Grumbt *et al.*, 2011). Embora estas infecções raramente causem morte, são difíceis de tratar e contribuem para a morbidade, dor e sofrimento, especialmente em populações em envelhecimento (Martinez *et al.*, 2012). Relatos recentes associam o aumento na incidência destas infecções em humanos à utilização frequente de antibióticos, uso de drogas imunossupressoras e várias condições como transplantes de órgãos, linfomas, leucemias e infecções pelo vírus da imunodeficiência humana (Kannan *et al.*, 2006).

Dentre os causadores de dermatofitoses, *Trichophyton rubrum* é o fungo mais comumente isolado em humanos mundialmente, sendo responsável por 90% das infecções crônicas e aproximadamente 80% dos casos de onicomicoses, seguido de *Trichophyton interdigitale* (Nenoff *et al.*, 2007; Nenoff *et al.*, 2013).

Apesar da grande disseminação destes fungos mundialmente, pouco se sabe sobre o processo infeccioso das dermatofitoses (Staib *et al.*, 2010). Estudos sobre interação fungo-hospedeiro são cada vez mais frequentes, refletindo a necessidade de se compreender as respostas dos patógenos ao ambiente colonizado, na tentativa de se estabelecer novas estratégias terapêuticas e promover avanços nas pesquisas sobre dermatofitoses (Achterman *et al.*, 2011).

Pelo projeto genoma comparativo de dermatófitos, do Broad Institute of Harvard and MIT, foram sequenciados, até o momento, genomas de 17 espécies de dermatófitos, incluindo

T. rubrum (Martinez *et al.*, 2012) e *T. interdigitale*. Outras duas espécies de dermatófitos, *Arthroderma benhamiae* e *Trichophyton verrucosum* foram também sequenciadas por uma iniciativa independente (Burmester *et al.*, 2011). A diversidade de hospedeiros, nichos preferenciais e relações filogenéticas entre as espécies foram determinantes na escolha dos dermatófitos para sequenciamento de seus genomas.

Cinco das espécies cujo genoma está disponibilizado foram utilizadas no presente trabalho: *T. rubrum* e *T. interdigitale*, além de *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton equinum* e *Microsporum canis*. Todos os genomas são bastante semelhantes em tamanho e conteúdo gênico (Martinez *et al.*, 2012). Os genomas de *T. tonsurans* e *T. equinum* são significativamente similares, com 90% de colinearidade entre genes. A similaridade entre estes genomas possibilita uma oportunidade única para investigar os eventos evolutivos que os levou às diferentes escolhas de hospedeiro preferencial (Achterman *et al.*, 2011; Martinez *et al.*, 2012).

Todas as características de similaridade entre os genomas dos dermatófitos indicam que a especiação ocorreu em um curto espaço de tempo em relação a um ancestral comum, o que não foi determinante no processo de adaptação destes fungos a diferentes ambientes. Cada fungo se adaptou a nichos específicos, em diferentes hospedeiros, dando preferência a diferentes substratos proteicos (cabelo e pele humanos, pelos ou casco de animais). Estas adaptações poderiam, tal como proposto por Martinez *et al.* (2012), ocorrer em nível de regulação diferencial de genes que codificam enzimas envolvidas nestes processos.

2.1.1 *Microsporum canis*

Microsporum canis é o zoófilo mais comumente observado em infecções em humanos (White *et al.*, 2008), responsável pela maior parte dos casos de *tinea capitis* em crianças e *tinea corporis* em indivíduos adultos (Dobrowolska *et al.*, 2011). Geralmente não invade unhas, sendo os casos de onicomicoses causadas por este dermatófito, associados à alteração do estado imune do paciente (Skerlev *et al.*, 2010).

Esta espécie é responsável por casos de dermatomicoses em todo o mundo, especialmente na Europa, incluindo a Europa Central e Mediterrâneo, e em partes da Ásia, África e América do Sul. O número de casos de *tinea capitis* decorrentes de infecções pelo

dermatófito *M. canis* em países da Europa indica ser este o maior causador de dermatofitoses em humanos, em relação a dermatófitos antropofílicos, nesta região (Ginter-Hanselmayer *et al.*, 2007; Grunwald *et al.*, 2014).

O hospedeiro natural principal são gatos domésticos, havendo relatos de ocorrência em outros mamíferos, incluindo cães domésticos. As infecções nestes animais persistem ao longo da vida do hospedeiro e parecem estar em constante evolução. Sem seus reservatórios animais, *M. canis* é incapaz de se disseminar amplamente entre as populações humanas, parecendo perder a virulência após cerca de quatro transmissões de humano para humano. A infecção é restabelecida após novo contato com um portador animal (Ginter-Hanselmayer *et al.*, 2007; Nenoff *et al.*, 2013; Grunwald *et al.*, 2014).

As colônias de *M. canis* apresentam textura cotonosa com discreto relevo radial e tonalidade branca. O reverso da colônia pode variar de amarelo a marrom (Figura 2). Possui macroconídios abundantes, grandes, fusiformes e com numerosas septações e poucos microconídios, pequenos e piriformes (Crissey *et al.*, 1995).

Figura 2. Aspecto da colônia de *M. canis* cultivado em meio Extrato de Malte-Ágar (MEA): A. Anverso da colônia. B. Reverso da colônia.

2.1.2 *Trichophyton equinum*

Trichophyton equinum, espécie zoofílica cujo hospedeiro preferencial é o cavalo, possui a capacidade de infectar também animais domésticos e humanos, porém, com menor incidência (Chermette *et al.*, 2008; Nenoff *et al.*, 2013). Esta espécie é associada

principalmente à ocorrência de onicomicoses e *tinea capitis* em hospedeiros humanos (Huovinen *et al.*, 1998).

Casos de dermatofitoses em humanos causadas por este patógeno são raros, e não se sabe ao certo quão difundida esta espécie está entre humanos, em virtude do pequeno número de casos reportados (Huovinen *et al.*, 1998). O tratamento da *tinea* causada por *T. equinum* responde a drogas comumente utilizados no tratamento das demais dermatofitoses como terbinafina, cetoconazol e griseofulvina (Brasch *et al.*, 2009), sendo a terbinafina melhor tolerada quando comparada à griseofulvina durante o tratamento prolongado de onicomicoses, (Huovinen *et al.*, 1998).

Este dermatófito tem crescimento rápido em meio de cultivo sólido e suas colônias apresentam aspecto pulverulento, com desenvolvimento rasteiro e coloração branca. O reverso das colônias é amarelo e, com o envelhecimento, progridem para coloração castanha ou marrom (Figura 3). Macroconídios são poucos em número, clavados, e os microconídios abundantes e de formas variáveis (esféricos, piriformes ou clavados) (Kwon-Chung *et al.*, 1992).

Figura 3. Aspecto da colônia de *T. equinum* cultivado em meio MEA: A. Anverso da colônia. B. Reverso da colônia.

2.1.3 *Trichophyton interdigitale*

Trichophyton interdigitale é uma espécie de dermatófitos cuja classificação taxonômica vem, atualmente, sofrendo alterações, resultado de estudos moleculares mais

refinados. As reclassificações indicam, para esta espécie, ambiguidade quanto à classificação de habitat preferencial, podendo ser identificados como antropofílicas ou zoofílicas (Nenoff *et al.*, 2007; Nenoff *et al.*, 2013). É o segundo dermatófito mais comumente encontrado em infecções em humanos, e tendem a causar *tinea ungueal*, *tinea pedis*, e, menos frequentemente, *tinea corporis*, sendo associados à ocorrência de dermatofitose crônica (Wagner *et al.*, 1995; Nenoff *et al.*, 2007; Nenoff *et al.*, 2013).

A espécie *T. interdigitale* H6, utilizada neste trabalho, identificada previamente como *T. rubrum*, foi reclassificada como consequência das análises de similaridade entre os diferentes genomas sequenciados pelo Broad Institute.

Apresenta crescimento rápido em meio de cultivo sólido e suas colônias são brancas, com aspecto cotonoso. O reverso da colônia apresenta leve pigmentação amarelada e os conídios são claviformes e abundantes (Figura 4).

Figura 4. Aspecto da colônia de *T. interdigitale* cultivado em meio MEA: A. Anverso da colônia. B. Reverso da colônia.

2.1.4 *Trichophyton rubrum*

Espécie antropofílica, *T. rubrum* é o principal causador de dermatofitoses mundialmente, estando associado a infecções em unhas, em menor número a casos de *tinea corporis* e *tinea pedis*, e raramente a infecções em animais (Wang *et al.*, 2006; Vena *et al.*, 2012; Nenoff *et al.*, 2013). Embora as infecções causadas por *T. rubrum* sejam geralmente restritas às regiões superficiais da epiderme, existem relatos de infecção invasiva e

disseminada em pacientes imunocomprometidos (Rodwell *et al.*, 2008; Matsuzaki *et al.*, 2012).

Infecções causadas por *T. rubrum* são comumente associadas a frequentes recidivas após a interrupção do tratamento com antifúngicos (Jackson *et al.*, 1999), ocorrência principalmente associada aos casos de onicomicoses (Tamura *et al.*, 2014). Exibe um elevado grau de variabilidade fenotípica, apresentando diferenças na ramificação das hifas, textura da superfície da colônia, pigmentação do reverso da colônia, na capacidade de formação de micro e macroconídios e suscetibilidade a agentes antimicóticos (Hryniewicz-Gwozdz *et al.*, 2011b).

Apresenta colônias com desenvolvimento lento, textura cotonosa ou aveludada, coloração branca e o reverso da colônia apresenta pigmentação avermelhada (Figura 5). Macroconídios são raros, apresentando número moderado de microconídios pequenos e piriformes, formados por septações laterais das hifas.

Figura 5. Aspecto da colônia de *T. rubrum* cultivado em meio MEA: A. Anverso da colônia. B. Reverso da colônia.

2.1.5 *Trichophyton tonsurans*

T. tonsurans é uma espécie antropofílica e apresenta casos descritos por todo o mundo. Embora esteja principalmente associada a casos de *tinea capitis* (é a principal causa de infecções no couro cabeludo em crianças nos Estados Unidos, Canadá e América Latina), também pode ser a causa de *tinea corporis* e *tinea ungueal*. O curso da infecção é, em regra,

apenas ligeiramente sintomático podendo, em alguns casos, apresentar lesões cutâneas atípicas e reações inflamatórias (Hryniewicz-Gwozdz *et al.*, 2011a; Nenoff *et al.*, 2013).

Altamente contagioso, esta espécie é capaz de permanecer no hospedeiro humano em estados subclínicos, contribuindo para sua persistência e propagação eficaz na população (Abdel-Rahman *et al.*, 2006). Por similaridade de sequências, está intimamente relacionado filogeneticamente ao dermatófito *T. equinum*, apesar dos seus nichos ecológicos distintos (Martinez *et al.*, 2012; Nenoff *et al.*, 2013).

As colônias de *T. tonsurans* são planas apresentando elevação central, por vezes são pregueadas radialmente, e seu crescimento é relativamente lento. A textura da colônia varia de granular a algodonosa (camurça) e a cor varia de branco a amarelo claro. O reverso da colônia é amarelo, podendo apresentar coloração vermelho-acastanhada (Figura 6). Apresenta hifas septadas, microconídios de variadas formas (sobretudo piriformes ou em forma de lágrima) e poucos macroconídios com aspecto irregular (Crissey *et al.*, 1995).

Figura 6. Aspecto da colônia de *T. tonsurans* cultivado em meio MEA: A. Anverso da colônia. B. Reverso da colônia.

2.2 Análise comparativa de expressão gênica em dermatófitos durante o processo de interação com moléculas do hospedeiro

A sobrevivência no ambiente hostil do hospedeiro está diretamente ligada à adaptação às variações de temperatura, exposição constante à luz ultravioleta, presença da microbiota normal, pH levemente ácido, e resistência à descamação epitelial realizada pelos

queratinócitos. Em dermatófitos, o processo infeccioso tem início com a adesão à superfície do hospedeiro por meio da germinação dos artroconídios no estrato córneo, com consequente disseminação das hifas pelas estruturas queratinizadas (Ogawa *et al.*, 1998; Ferreira-Nozawa *et al.*, 2003; Baldo *et al.*, 2011; Tainwala *et al.*, 2011).

Posteriormente à adesão, os dermatófitos precisam obter nutrientes para seu desenvolvimento e sobrevivência. Para tal, utilizam as moléculas presentes no tecido hospedeiro como fonte de carbono, nitrogênio e enxofre, o que pode ser considerado seu principal fator associado à virulência. O contato com o ambiente hospedeiro direciona a expressão de genes específicos envolvidos na adaptação ao ambiente e degradação de queratina, proteína fibrosa que contém uma matriz rica em cisteína e pontes dissulfeto (Maranhão *et al.*, 2007a; Maranhão *et al.*, 2009; Grumbt *et al.*, 2013).

Um dos fatores mais importantes neste processo é a secreção de uma ampla variedade de endoproteases e exoproteases pelos dermatófitos, possivelmente modulada pelo pH ambiente, atuando como fator determinante na invasão, utilização e subsequente disseminação do fungo pelo extrato córneo do hospedeiro (Martinez-Rossi *et al.*, 2004; Baldo *et al.*, 2011).

Nos estágios iniciais da infecção, em resposta ao pH ácido da pele, os dermatófitos expressam proteases inespecíficas e queratinases que atuam com atividade ótima em meio ácido. Estas proteases agem sobre substratos queratinosos ou não, liberando pequenos peptídeos e aminoácidos, permitindo sua utilização pelo fungo como fonte de carbono, nitrogênio e enxofre (Monod, 2008). A metabolização de alguns aminoácidos, como a glicina, resulta na liberação de amônia, um composto básico, elevando o pH do meio, tornando-o adequado para ação das queratinases com atividade ótima em pH alcalino, o que possibilita a manutenção da infecção. Esta maquinaria metabólica permite que os dermatófitos utilizem proteínas para captação de nutrientes em um amplo espectro de pH, possibilitando a completa instalação, desenvolvimento e permanência do dermatófito no tecido hospedeiro (Martinez-Rossi *et al.*, 2004; Peres *et al.*, 2010; Baldo *et al.*, 2011).

A capacidade do fungo de modular o pH durante o desenvolvimento, regulando a expressão de genes de acordo com as condições do microambiente do hospedeiro mediante mecanismos ainda não totalmente esclarecidos, parece ser fator determinante para o sucesso do processo infeccioso (Arst *et al.*, 2003; Ferreira-Nozawa *et al.*, 2003; Martinez-Rossi *et al.*, 2004). Foi demonstrado que *T. interdigitale* é capaz de responder rapidamente a mudanças no pH ambiente, alcalinizando o meio de cultura e modelando seu perfil de expressão gênica

(Ferreira-Nozawa *et al.*, 2003; Ferreira-Nozawa *et al.*, 2006; Maranhão *et al.*, 2007b; Silveira *et al.*, 2010).

O estudo da transcrição de genes associados à virulência em dermatófitos, tais como os relacionados ao processo de adesão ao hospedeiro (Esquenazi *et al.*, 2004; Baldo *et al.*, 2010), degradação da queratina (Monod, 2008; Maranhão *et al.*, 2009), redução das pontes dissulfeto de cistina (Lechenne *et al.*, 2007; Grumbt *et al.*, 2013), além da resposta adaptativa ao pH ambiente e a outros estresses (Peres *et al.*, 2010; Martinez-Rossi *et al.*, 2011) geraram, individualmente, informações valiosas sobre infecção e perpetuação do patógeno no ambiente hospedeiro. Verificar a modulação destes genes de forma comparativa em situação que mimetiza o processo de infecção, com dermatófitos provenientes de diferentes nichos, permitirá melhor compreensão das estratégias utilizadas por cada uma das espécies avaliadas durante o processo de infecção.

2.2.1 Regulação da expressão gênica pelo pH ambiente e o fator de transcrição PacC

As variações de pH no ambiente desempenham importante papel no controle transcricional de muitos genes, pois os micro-organismos precisam de um mecanismo regulador para garantir a atividade de diversos processos celulares (Nahas *et al.*, 1982; Freitas *et al.*, 2007). Em *A. nidulans*, a regulação da expressão gênica pelo pH é mediada por pelo menos sete genes. Foi proposto que o gene *pacC* codifica para um fator de transcrição do tipo Zn-finger, PacC, cuja forma íntegra seria inativa em resposta ao pH ácido. Quando induzido em pH alcalino, esse fator de transcrição sofreria processamento proteolítico e a forma proteolizada atuaria como um ativador da expressão de genes alcalinos (que se expressam preferencialmente em meio alcalino) e inibidor da expressão de genes ácidos (que se expressam preferencialmente em meio ácido). Os genes *pal* (*A*, *B*, *C*, *F*, *H* e *I*) participam desta cascata sinalizadora em pH alcalino, promovendo duas clivagens proteolíticas para a ativação da proteína PacC.

No entanto, trabalhos recentes revelam que o fator de transcrição PacC é funcional tanto em pH ácido como em alcalino, e modulado em resposta a variações nutricionais e ambientais, sendo capaz de regular diversos eventos celulares em fungos. Os mecanismos

envolvidos nos processos de regulação gênica em *A. nidulans* são, também, dependentes das condições nutricionais nas quais o fungo se encontra (Silva *et al.*, 2008; Freitas *et al.*, 2011; Martinez-Rossi *et al.*, 2011; Trevisan *et al.*, 2011; Rossi *et al.*, 2013).

Vários genes ou atividades metabólicas são regulados pelo pH, como a secreção de enzimas, permeases e enzimas intracelulares envolvidas na síntese e secreção de metabólitos. Em *A. nidulans* e *T. interdigitale* foi demonstrado que o sistema de regulação pelo pH via PacC também controla outras atividades, como modificações pós traducionais de enzimas secretadas e a síntese de enzimas responsáveis pela produção de energia (Nozawa *et al.*, 2003; Mendes *et al.*, 2012).

Em *T. interdigitale*, pela inativação gênica de uma proteína homóloga ao fator de transcrição PacC, foi observado seu envolvimento na regulação do processo de desenvolvimento e degradação de substrato queratinolítico, interferindo na secreção e/ou atividade de proteases que apresentam atividade ótima em pH alcalino, atuando de forma relevante nos processos de instauração e perpetuação da infecção por dermatófitos (Ferreira-Nozawa *et al.*, 2006; Peres *et al.*, 2010).

2.3 Análise comparativa de expressão gênica em dermatófitos em resposta a agentes antifúngicos

O tratamento das dermatofitoses é baseado na utilização de agentes antimicóticos de uso tópico e sistêmico. Entre os diferentes medicamentos disponíveis, os de uso tópicos são menos eficientes na obtenção dos efeitos clínicos desejados, em comparação com aqueles obtidos com os medicamentos sistêmicos, como griseofulvina, terbinafina e itraconazol (Smith, 2000; Cervelatti *et al.*, 2006). Independentemente da disponibilidade e eficácia destas drogas, um problema crucial em relação ao tratamento de infecções fúngicas é a ocorrência de resistência, que torna os fungos capazes de continuar a infecção independente da presença da droga (Martinez-Rossi *et al.*, 2008; Morschhauser, 2010).

Dentre as drogas de uso clínico, as do tipo azóis, alilaminas, e a griseofulvina são os mais frequentemente utilizados no tratamento de infecções por dermatófitos. Além destas drogas, dentre os demais antifúngicos disponíveis comercialmente, a anfotericina B, droga do tipo polieno não comercialmente indicada para o tratamento de infecções por dermatófitos,

tem demonstrado ser muito ativa contra *T. rubrum* em estudos *in vitro* (Fernandez-Torres *et al.*, 2001; Coelho *et al.*, 2008). A maioria das terapias para o tratamento de infecções fúngicas tem como alvo a via de biossíntese do ergosterol ou seu produto final, o esterol, componente da membrana celular exclusivo de fungos (Figura 7) (Onyewu *et al.*, 2003).

Figura 7. Via de biossíntese do ergosterol e classes de medicamentos comumente usados: alilaminas, azóis e morfolinas. CoA, coenzima A.

Anfotericina B é um antibiótico macrolídeo polieno anfótero (Figura 8) isolado da bactéria *Streptomyces nodosus*, que apresenta sítios ativos tanto hidrofílicos quanto hidrofóbicos. A droga possui a capacidade de ligação ao ergosterol, componente principal da membrana celular fúngica, alterando a permeabilidade da célula, formando poros através dos quais os componentes celulares, em especial íons de potássio, extravasam, inibindo a glicólise fúngica e promovendo efluxo de Mg^{2+} causando acidificação no interior da célula, precipitação do citoplasma e consequente morte celular (Hamill, 2013).

O uso desta droga é limitado pela sua toxicidade, especialmente nefrotoxicidade. Tal fato levou ao desenvolvimento de formulações lipídicas da anfotericina B, onde a droga é administrada em um envoltório lipídico, diminuindo a ocorrência de ligações não específicas às membranas celulares de humanos, reduzindo os níveis de toxicidade sem redução na sua eficácia (Moen *et al.*, 2009; Hamill, 2013).

Figura 8. Estrutura química da anfotericina B

Os fármacos do tipo azóis são sintéticos e classificados em imidazóis e triazóis, de acordo com o número de átomos de nitrogênio no anel azólico (dois ou três átomos de nitrogênio em suas estruturas moleculares, respectivamente). Os compostos triazólicos apresentam maior grau de especificidade em relação aos imidazóis, incorrendo em maior interação alvo-droga, com menor ocorrência de efeitos adversos.

O triazol itraconazol (Figura 9) é um fármaco fungistático cuja atividade se deve à redução da síntese do ergosterol através da inibição de enzimas fúngicas do citocromo P-450. Direcionado contra a enzima lanosterol 14- α -desmetilase, codificada pelo gene *erg11*, atua no bloqueio da conversão de lanosterol em ergosterol, levando a uma alteração na permeabilidade da membrana das células fúngicas (Sanglard, 2002; Ghelardi *et al.*, 2014).

Figura 9. Estrutura química do itraconazol.

A terbinafina (Figura 10), agente antimicótico sintético com ação fungicida da classe das alilaminas, atua através do bloqueio da biossíntese de ergosterol por inibição da enzima esqualeno epoxidase (Erg1), envolvida na conversão do esqualeno a epóxido de esqualeno, um precursor na biossíntese do ergosterol, não interagindo com o sistema de enzimas ligadas ao sistema citocromo P-450 (Mukherjee *et al.*, 2003; Ghelardi *et al.*, 2014). O tratamento com

terbinafina é eficaz e bem tolerado contra uma vasta gama de infecções superficiais por dermatófitos.

Figura 10. Estrutura química da terbinafina

A griseofulvina (Figura 11) é um agente fungistático produzido por *Penicillium griseofulvum*, eficaz principalmente contra dermatófitos. Embora o seu mecanismo de ação, especialmente em nível molecular, não esteja completamente elucidado, acredita-se que a droga atue por interação com os microtúbulos desfazendo o fuso mitótico, inibindo, por fim, a mitose fúngica (Zomorodian *et al.*, 2007).

Figura 11. Estrutura química da griseofulvina

As drogas eficazes contra uma espécie de dermatófito são, geralmente, eficazes também contra as demais espécies (Gupta *et al.*, 2008). Algumas infecções respondem bem à terapia antifúngica tópica, ao passo que outras, como *tinea capitis*, *tinea ungueal*, e em casos de infecções severas, há necessidade de terapia sistêmica. De forma ocasional, sobretudo em casos de onicomicoses, mais dificilmente tratáveis, ocorrem recidivas da doença devido a

interrupção precoce do tratamento ou devido a falhas na terapia pela ocorrência de resistência aos agentes antifúngicos (Jackson *et al.*, 1999; Esteban *et al.*, 2005).

2.3.1 Resistência a múltiplas drogas

Os antifúngicos com atividade contra dermatófitos disponíveis são poucos e apresentam limitações quanto à eficácia e toxicidade (Paião *et al.*, 2007); ademais, com frequência, observa-se a ocorrência de infecções refratárias ao tratamento devido à resistência fúngica (Martinez-Rossi *et al.*, 2008; Morton *et al.*, 2014).

Os organismos, de bactérias ao homem, desenvolveram mecanismos versáteis para resistir a agentes citotóxicos. Exemplos disso são a degradação enzimática ou inativação de drogas e a alteração conformacional de alvos de drogas. Além disso, todas as células possuem proteínas de membrana que realizam o transporte transmembranar de moléculas, incluindo as drogas e, portanto, ativam mecanismos capazes de reduzir a concentração citoplasmática de fármacos (Van Veen *et al.*, 1998; Cannon *et al.*, 2009).

Em fungos, duas grandes classes de bombas de efluxo, localizada na membrana citoplasmática, estão envolvidas na resistência a drogas: a família de transportadores do tipo ABC (*ATP-Binding Cassette*), transportadores primários que utilizam a energia da hidrólise do ATP, e a família de transportadores do tipo MFS, bombas de transporte secundário que utilizam gradiente eletroquímico para translocar substratos através da membrana (Del Sorbo *et al.*, 2000; Morschhauser, 2010).

Os transportadores do tipo ABC codificam para proteínas com habilidade de transportar uma grande variedade de compostos contra o gradiente de concentração, como drogas antifúngicas e outras substâncias tóxicas, diminuindo as concentrações intracelulares, tornando estes xenobióticos insuficientes para inibição dos alvos celulares (Higgins, 1992; Stergiopoulos *et al.*, 2003; Martinez-Rossi *et al.*, 2008; Maranhão *et al.*, 2009; Morschhauser, 2010).

Em fungos, a atuação destes transportadores no efluxo de substâncias tóxicas naturais e sintéticas é bem conhecido. Atuam como fatores de virulência ao contribuir para a resistência a uma grande variedade de compostos tóxicos não relacionados estruturalmente ou funcionalmente (Maranhão *et al.*, 2009; Morschhauser, 2010; Prasad *et al.*, 2011).

A análise do perfil de expressão de genes que codificam para transportadores, cuja atuação não está ainda inteiramente elucidada, vem contribuindo para o entendimento dos mecanismos de resistência de fungos a drogas podendo, posteriormente, ser utilizados como alvos para novos fármacos com ação antifúngica (Gulshan *et al.*, 2007; Morschhauser, 2010). O estudo da modulação da expressão de genes que codificam proteínas do tipo ABC nos cinco dermatófitos utilizados neste estudo, em resposta à exposição a drogas de uso clínico no tratamento de dermatofitoses, permitirá avaliar, de forma comparativa, o papel destes genes no processo de resistência a antifúngicos, sobrevivência e permanência no hospedeiro.

2.3.2 Transportadores do tipo ABC e atividade de extrusão de toxicantes em dermatófitos

A família dos transportadores do tipo ABC em dermatófitos pode atuar de maneira tempo-dependente e de forma sinérgica, como observado em resultados obtidos com *T. rubrum* por RNA-seq, cultivado em presença de acriflavina (Persinoti *et al.*, 2014).

Utilizando a linhagem H6 de *T. interdigitale*, em nosso grupo foram isolados e caracterizados dois genes que codificam transportadores do tipo ABC: *mdr1* apresentou elevados níveis de expressão em resposta à exposição a drogas, algumas de uso clínico, incluindo griseofulvina e itraconazol, após 30 minutos de exposição, sugerindo a participação deste gene no efluxo de drogas neste dermatófito. O tratamento com drogas como terbinafina ou tioconazol não afetaram os níveis transcricionais deste gene indicando especificidade na atuação do gene na atividade de extrusão de compostos do interior da célula, nas condições analisadas (Cervelatti *et al.*, 2006).

O gene *mdr2* de *T. interdigitale* apresenta aumentos nos níveis transcricionais quando da exposição do micélio a agentes citotóxicos como griseofulvina, fluconazol e itraconazol. A disrupção do gene *mdr2* resultou em um mutante mais sensível à terbinafina, 4-nitroquinolina N-óxido (4NQO) e brometo de etídio, sugerindo que este transportador desempenhe papel na modulação da suscetibilidade a drogas (Fachin *et al.*, 2006).

III. Hipótese

As espécies de dermatófitos se distinguem por diferenças sutis no conteúdo gênico e organização do genoma. O elevado grau de colinearidade e o restrito número de genes espécie-específicos indicam que a especiação ocorreu em um curto espaço de tempo. Apesar desta proximidade a um ancestral comum, cada fungo se adaptou a nichos diferentes, apresentando uma variedade de hospedeiros e preferência por diferentes substratos proteicos. Em decorrência das características de conservação genômica e diferenças fenotípicas e de habitat dentre as espécies em estudo, foi levantada a hipótese que possíveis diferenças entre estes dermatófitos estejam relacionadas a padrões de expressão gênica.

IV. Objetivos

Avaliar a expressão de genes potencialmente envolvidos na interação patógeno-hospedeiro, na manutenção do processo infeccioso e na resistência a múltiplas drogas, comuns entre cinco espécies de dermatófitos, por meio da análise transcricional comparativa por PCR em tempo real. Avaliar também a inter-relação funcional entre três genes que codificam transportadores ABC numa das espécies de dermatófitos.

Estratégias

- Comparar o genoma dos dermatófitos *M. canis*, *T. equinum*, *T. interdigitale*, *T. rubrum* e *T. tonsurans* a fim de identificar genes já descritos na literatura como envolvidos na patogenicidade e/ou resistência a múltiplas drogas, e que sejam comuns entre eles.
- Avaliar fatores como conidiação e desenvolvimento destes fungos utilizando diferentes fontes de queratina como única fonte nutricional, de forma comparativa, para avaliação dos melhores ambientes para desenvolvimento dos estudos *in vitro*.
- Avaliar o perfil transcricional comparativo por PCR em tempo real de genes relacionados à virulência comparando-os entre diferentes espécies de dermatófitos com o objetivo de revelar estratégias moleculares comuns a estes fungos durante a utilização de substrato presente no tecido hospedeiro.
- Comparar o perfil da expressão gênica entre as espécies de dermatófitos e uma linhagem nocauteada em um gene que codifica o fator de transcrição PacC em substrato presente no tecido hospedeiro, e o possível papel de PacC na regulação destes genes.
- Avaliar o perfil transcricional comparativo por PCR em tempo real de genes que codificam para transportadores do tipo ABC frente a agentes antifúngicos em concentrações subinibitórias com o intuito de compreender os mecanismos de adaptação ao estresse provocado, além dos mecanismos de resistência a essas drogas.

- Avaliar a resposta transcricional de uma linhagem nocauteada em um gene que codifica um transportador ABC submetida a diferentes antifúngicos, com relação a outros genes envolvidos neste tipo de transporte, com o objetivo de revelar possíveis mecanismos compensatórios entre eles.

V. Materiais e métodos

5.1 Linhagens

As espécies *T. rubrum* (CBS118892), *T. tonsurans* (CBS112818), *T. equinum* (CBS127.97) e *M. canis* (CBS113480) utilizadas neste trabalho foram cedidas pelo *Centraalbureau voor Schimmelcultures* (CBS - Holanda). *T. interdigitale* H6 (ATCC MYA 3108) é um isolado clínico de paciente do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. As espécies possuem genoma sequenciado e disponibilizado no site do Broad Institute: http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/dermatophyte_comparative/GenomesIndex.html.

Além das linhagens selvagens, duas linhagens mutantes foram utilizadas, $\Delta pacC$, que possui o gene eu codifica para uma proteína PacC, de *T. interdigitale* H6, interrompido, com o gene que confere resistência à higromicina (Ferreira-Nozawa *et al.*, 2006), e a linhagem $\Delta mdr2$, que apresenta o gene que codifica para uma proteína do tipo ABC de *T. interdigitale* H6 interrompido, igualmente com o gene que confere resistência à higromicina (Fachin *et al.*, 2006).

Utilizaremos a identificação conferida pelo Broad Institute para cada uma das espécies: *T. rubrum* (TERG), *T. tonsurans* (TESG), *T. equinum* (TEQG), *T. interdigitale* H6 (H101) e *M. canis* (MCYG).

5.2 Meios de cultura

5.2.1 Meio Extrato de Malte-Ágar (MEA)

Glicose	2% (m/v)
Extrato de malte	2% (m/v)
Peptona	0,1% (m/v)
Ágar	2% (m/v)
Água destilada (q.s.p.)	1000 mL

pH final do meio ajustado em 5,7. Autoclavado a 1 atm de pressão e 120 °C por 20 minutos.

5.2.2 Meio Sabouraud Dextrose Broth - SDB (Atlas, 1993)

Glicose	2% (m/v)
Peptona	1% (m/v)
Água destilada (q.s.p.)	1000 mL

pH final do meio ajustado para 5,7. Autoclavado a 1 atm de pressão e 120 °C por 20 minutos.

5.2.3 Meio RPMI-1640

Foram dissolvidos 10,4 g de meio RPMI-1640 (Gibco, Co, CA, USA, cat.#31800-002) (Tabela 1) em 900 mL de água destilada. O meio foi tamponado com MOPS (ácido 3-N-morfolino propanosulfônico) em concentração final de 0,165 mol/L. O pH da solução foi ajustado em 7,0 a 25 °C e o volume final completado para 1 litro com água destilada. O meio foi esterilizado por filtração com membrana de náilon de 0.22 µm e estocado a 4 °C.

Tabela 1. Componentes do meio RPMI-1640.

Componentes	Peso molecular	Concentração (mg/L)	mM
Aminoácidos			
Glicina	75	10	0.133
L-Arginina	174	200	1.15
L-Asparagina	132	50	0.379
L-Ácido aspártico	133	20	0.15
L-Cisteína 2HCl	313	65	0.208
L- Ácido Glutâmico	147	20	0.136
L-Glutamina	146	300	2.05
L-Histidina	155	15	0.0968
L-Hidroxiprolina	131	20	0.153
L-Isoleucina	131	50	0.382
L-Leucina	131	50	0.382
L-Lisina HCl	183	40	0.219
L-Metionina	149	15	0.101
L-Fenilalanina	165	15	0.0909
L-Prolina	115	20	0.174
L-Serina	105	30	0.286
L-Treonina	119	20	0.168
L-Triptofano	204	5	0.0245
L-Tirosina 2Na	261	29	0.111
L-Valina	117	20	0.171
Vitaminas			
Biotina	244	0.2	0.00082
Cloreto de colina	140	3	0.0214
D-pantotenato de cálcio	477	0.25	0.000524

Ácido fólico	441	1	0.00227
Niacinamida	122	1	0.0082
Ácido para-aminobenzoico	137	1	0.0073
Piridoxina HCl	206	1	0.00485
Riboflavina	376	0.2	0.000532
Tiamina HCl	337	1	0.00297
Vitamina B12	1355	0.005	0.0000037
i-Inositol	180	35	0.194
Sais Inorgânicos			
Nitrato de cálcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	236	100	0.424
Sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	246	48.84	0.199
Cloreto de potássio (KCl)	75	400	5.33
Cloreto de sódio (NaCl)	58	6000	103.45
Fosfato de sódio dibásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	268	800	2.99
Outros componentes			
D-Glicose (Dextrose)	180	2000	11.11
Glutathiona (reduzida)	307	1	0.00326
Vermelho de fenol	376.4	5	0.0133

5.2.4 Meio com queratina

A queratina utilizada provém de cascos de bois raspados com auxílio de esmerilhadeira até formar um pó fino. Foram autoclavados 0,2 g de queratina (0,4% (m/v) final) a 1 atm de pressão e 120 °C por 15 minutos. Foi adicionado 50 mL de água destilada estéril por frasco de cultivo e o pH individualmente ajustado em 5 (± 0.1).

5.2.5 Meio mínimo

Solução de sais*	2%
Ágar	2% (m/v)
Água destilada (q.s.p.)	1000 mL

O meio foi suplementado com queratina de cascos de bois 0,4% (m/v) e nitrato de sódio (70 mM), e o pH ajustado em 5,0. Autoclavado a 1 atm de pressão e 120 °C por 15 minutos.

*Solução de sais (Cove, 1966)

Fosfato de potássio monobásico	76 g
Cloreto de potássio	26 g
Sulfato de magnésio heptahidratado	26 g
Solução de elementos-traço**	50 mL
Água destilada esterilizada (q.s.p.)	1000 mL

**Solução de elementos-traço

Borato de sódio decahidratado	40 mg
Sulfato de cobre pentahidratado	400 mg
Sulfato de ferro heptahidratado	532 mg
Sulfato de manganês monohidratado	292 mg
Molibdato de sódio dihidratado	800 mg
Sulfato de zinco heptahidratado	2 mg
Água destilada esterilizada (q.s.p.)	250 mL

5.2.6 Meios com substratos queratinizados

Foram autoclavados a 1 atm de pressão e 120 °C por 15 minutos 0,2 g (0,4% (m/v) final) de fragmentos de unha humana, ou cabelos, ou cascos bovinos em pequenos fragmentos. Adicionou-se 50 mL de água destilada e o pH foi ajustado em 5 (± 0.1).

5.3 Soluções**5.3.1 Soluções de agentes inibidores****Solução de Anfotericina B**

Anfotericina B (Bristol-Myers Squibb Company) foi utilizada em solução a 5 mg/mL utilizando dimetilsofoxido (DMSO) como solvente e meio RPMI-1640 (Gibco, Co) como diluente. Solução estoque armazenada a -80 °C e soluções de uso armazenadas a -20 °C.

Solução de Griseofulvina

Griseofulvina (Sigma Chemical CO., USA, cat.#G4753) foi utilizada em solução a 10 mg/mL utilizando DMSO como solvente e meio RPMI-1640 (Gibco, Co) como diluente. Solução estoque armazenada a -80 °C e soluções de uso armazenadas a -20 °C.

Solução de Itraconazol

Itraconazol (Janssen Pharmaceuticals) foi utilizado em solução a 10 mg/mL utilizando DMSO como solvente e meio RPMI-1640 (Gibco, Co) como diluente. Solução estoque armazenada a -80 °C e soluções de uso armazenadas a -20 °C.

Solução de Terbinafina

Terbinafina (Sigma Chemical CO., USA, cat.#T8826) foi diluída em solução a 10mg/mL utilizando DMSO como solvente e meio RPMI-1640 (Gibco, Co) como diluente. Solução estoque armazenada a -80 °C e soluções de uso armazenadas a -20 °C.

5.3.2 Soluções para RNA

Água livre de RNase (Sambrook J, 1989)

A água utilizada durante extração e preparo de soluções para RNA foi tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) 0,1% (v/v) a 37 °C por 18-20 h, tendo sido posteriormente autoclavada por 30 min a 1 atm de pressão e 120 °C.

Tampão de Migração MOPS 5X

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

O tampão foi preparado com água livre de RNases e mantido em frasco âmbar à temperatura ambiente.

5.3.3 Outras soluções

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

Tris-base	242 g
Ácido acético glacial	57,1 mL
EDTA 0,5M	100 mL
Água destilada (q.s.p)	1000 mL

pH final do meio ajustado em 8.0. Solução autoclavada a 1 atm de pressão e 120 °C por 20 min.

5.4 Condições iniciais de cultivo das linhagens

Os cultivos iniciais foram feitos em placas de Petri contendo meio Extrato de Malte-Ágar (MEA) a 28 °C por 15 a 17 dias para as espécies do gênero *Trichophyton*, e por 13 a 15 dias para o gênero *Microsporum*. As linhagens estão estocadas em meio Extrato de Malte-Ágar (MEA), mantidas em temperatura ambiente.

5.5 Preparo da suspensão de conídios

Para cada linhagem, após período de crescimento em meio sólido, a massa micelial foi coletada com o auxílio de espátula estéril e adicionada em 10 mL de solução salina 0,9% (m/v) esterilizada. Em seguida, a mistura foi agitada vigorosamente com auxílio de vórtex para desagregar os conídios, filtrada em funil com lã de vidro esterilizado para remover as hifas e centrifugada a 4.000 x g por 10 minutos. O sedimento foi ressuspendido em 2 mL de solução salina (0,9%). A concentração de conídios foi estimada em hematímetro (câmara de Neubauer).

5.6 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM foi determinada por Coelho et al. (2008), conforme o documento M38-A, proposto pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Para todas as linhagens os valores de CIM são iguais, variando de acordo com a droga escolhida, tal como indicado na Tabela 2, abaixo. Cada droga foi utilizada nos cultivos em meio RPMI em concentração subinibitória referente a 70% do valor da CIM.

Tabela 2. Susceptibilidade *in vitro* a agentes antifúngicos e valores de concentração subinibitória para *T. equinum*, *T. interdigitale*, *T. rubrum* e *T. tonsurans*.

Droga	CIM (mg/L)	70% da CIM (mg/L)
Anfotericina B	0,1	0,07
Griseofulvina	4	2,8
Itraconazol	0,8	0,56
Terbinafina	0,2	0,14

5.7 Condições de cultivo

5.7.1 Cultivo em meio ágar para análises comparativas

Inoculou-se aproximadamente 1×10^6 conídios de cada uma das espécies em meio MEA para avaliação comparativa da conidiação, e em meio MEA ou meio mínimo suplementado com queratina para observação do crescimento radial. Os cultivos permaneceram a 28 °C por 17 dias para os experimentos de conidiação, ou até que completamente tomassem a área da placa de Petri para observação do crescimento radial. Os experimentos foram realizados em triplicata técnica e biológica.

A quantidade final de conídios germinados foi estimada considerando a região central da placa, local onde foram inoculados inicialmente os conídios. O micélio germinado em área correspondente a 2,7 cm de diâmetro foi submetido a um vórtex em solução salina 0,9% (m/v) e filtrado em funil com lã de vidro. A concentração de conídios foi estimada em hematómetro.

5.7.2 Cultivo em queratina

Para cada linhagem, aproximadamente 1×10^6 conídios foram inoculados em 50 mL de meio contendo H₂O acrescido de queratina bovina 0,4% (m/v) e mantidos sob agitação (100 rpm) a 28 °C. Os conídios foram incubados por 24, 48, 72 e 96 horas. Após cada um destes períodos, o micélio obtido foi filtrado, seco em papel de filtro, congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80 °C até a extração de RNA.

Após cada tempo de cultivo foi feita a verificação do pH do meio de cultura em pHmetro. Os experimentos foram realizados em triplicata.

5.7.3 Cultivo em meio com drogas

Para cada linhagem, aproximadamente 1×10^6 conídios foram inoculados em 50 mL de meio SDB e mantidos sob agitação (100 rpm) por 96 horas a 28 °C. Após este período os micélios obtidos foram, de forma asséptica, filtrados, lavados com água destilada estéril e transferidos para novos frascos contendo 50 mL de meio RPMI-1640 (Gibco, Co), permanecendo sob agitação por três horas, período de adaptação do micélio ao novo meio de cultivo. Após o período de adaptação, o micélio de um dos frascos, utilizado como controle

do experimento foi filtrado, seco em papel de filtro, congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80 °C até a extração de RNA. A outros frascos foi acrescida quantidade referente a 70% da concentração inibitória mínima de Anfotericina B (AMB) ou Griseofulvina (GRS) ou Itraconazol (ITRA) ou Terbinafina (TRB), permanecendo sob agitação (100 rpm) a 28 °C por períodos de 15 ou 60 minutos. Os micélios obtidos foram então filtrados, secos em papel de filtro, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C até a extração do RNA. Os experimentos foram realizados em triplicata.

5.8 Extração de RNA total

5.8.1 Cultivo em queratina

O RNA total foi extraído utilizando 1 mL de TRI Reagent® (Sigma-Aldrich, Inc., St Louis, MO, USA, cat.#T9424) adicionado a aproximadamente 20 mg da massa micelial seca obtida. As amostras foram maceradas e mantidas à temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente acrescentou-se 0,3 mL de clorofórmio a cada amostra e então estas foram misturadas com auxílio de um vórtex por 10 segundos, seguindo de incubação por 10 minutos à temperatura ambiente. Centrifugaram-se, então, as amostras a 12000 x g por 15 minutos a 4 °C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e foi submetida novamente à etapa de clorofórmio. O RNA foi então precipitado com 0,25 mL de isopropanol por 10 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 12000 x g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o RNA sedimentado foi lavado com 1 mL de etanol 75% (v/v), e centrifugado novamente a 8000 x g por 5 minutos, 4 °C. Descartado o sobrenadante, o RNA foi ressuspenso em 40 µL de água deionizada livre de RNase e incubado por 5 minutos a 65 °C. A integridade do RNA foi verificada em gel de agarose 1,5% (m/v) em condição desnaturante e a concentração foi determinada através da leitura de absorbância a 260 nm. As amostras foram congeladas a -80 °C até sua utilização.

5.8.2 Cultivo em presença de agentes antifúngicos

O RNA total foi extraído utilizando kit *illustra™ RNAspin Mini RNA Isolation* (GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, Inglaterra, cat.#25-0500) conforme instruções do

fabricante. Aproximadamente 20 mg de micélio foram utilizados em cada extração. A integridade do RNA foi verificada em gel de agarose 1,5% (m/v) em condição desnaturante e a concentração foi determinada através da leitura de absorbância a 260 nm. As amostras foram congeladas a -80 °C até sua utilização.

5.9 Estudo do perfil transcricional comparativo por PCR em tempo real

5.9.1 Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA, 1 µg do RNA total de cada uma das condições em análise foi tratado com 1 U de enzima Deoxyribonuclease I (DNase I), RNase-free (*Thermo Scientific, CA, USA, cat.#EN0521*), e então convertido em cDNA fita simples utilizando o *Kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA, cat.# 4368814)* de acordo com protocolo do fabricante. Estas foram estocadas a -20 °C. As amostras foram verificadas por PCR quanto à presença de contaminação com DNA genômico.

5.9.2 Construção de oligonucleotídeos

Onze genes descritos na literatura como relacionados à patogenicidade em fungos foram analisados quanto ao acúmulo de transcritos após cultivo em queratina (*pacC*, *gell*, *ureD*, *stuA*, *sub3*, *lpl*, *eglC*, *chiB1*, *ocpB*, *cdol* e *ssu1*), e três genes verificados após cultivo em meio contendo agentes com atividade antifúngica (*mdr1*, *mdr2* e *mdr4*) (Tabela 3).

Os oligonucleotídeos utilizados nas análises do perfil transcricional por PCR em tempo real foram desenhados a partir da sequência do genoma de *T. rubrum*. A confirmação de genes ortólogos foi feita através da ferramenta *Blast* nos genomas de *M. canis*, *T. equinum*, *T. interdigitale* e *T. tonsurans* disponibilizados pelo Broad Institute. Foi utilizado *software Primer3* (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_web.cgi) para o desenho dos oligonucleotídeos.

Tabela 3. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de RT-qPCR

Nome do produto gênico/gene*	ID	Oligonucleotídeos (5' - 3')	Produto (pb)	Eficiência (%)	Concentração (nM)
pH-response transcription factor <i>pacC</i> /RIM101 (<i>pacC</i>)	MCYG_01012	F: CCAAAGCTGACCTGATGAAC R: GTAGACGGTGGACTGCATCT	59	93.4	300
	TEQG_01042				
	H101_07360				
	TERG_00838				
	TESG_04572				
hypothetical protein (<i>gell</i>)	MCYG_00190	F: GCCTTTTTCTCTGGAAACGA R: AGCTACGGATGTCACGGGTA	91	96.4	400
	TEQG_02584				
	H101_02422				
	TERG_00625				
	TESG_02145				
hypothetical protein (<i>ureI</i>)	MCYG_07995	F: TTCGAGTCCCTTGCTGACTT R: CTCGACGACCAATTCTGACC	102	99.9	500
	TEQG_04793				
	H101_00618				
	TERG_02330				
	TESG_02963				
hypothetical protein (<i>apses</i>)	MCYG_00288	F: CCAACCTTACTCGTCCCAGA R: CAGAGGCTGCCTTCATCTT	143	102.1	300
	TEQG_02678				
	H101_07923				
	TERG_00714				
	TESG_02237				
subtilisin-like protease 3 (<i>sub3</i>)	MCYG_04040	F: CCAGGAAGCTGGTATCTTC R: TTCTGGTCATCAATGGTGGA	123	98.6	800
	TEQG_06704				
	H101_01018				
	TERG_03815				
	TESG_03300				
hypothetical protein (<i>lpl</i>)	MCYG_02652	F: GGGCTTCATGCTTCAGGTAA R: AGTGTGACCATTGCCGCTAC	50	91.9	800
	TEQG_06949				
	H101_07838				
	TERG_05522				
	TESG_01690				
hypothetical protein (<i>eglC</i>)	MCYG_01527	F: AAAGGCTGGCACCAAGAAC R: TCGAAGGCCTCGAAGTAGAA	96	94.4	600
	TEQG_02229				

	H101_07920				
	TERG_07959				
	TESG_05666				
hypothetical protein (<i>chiB1</i>)	MCYG_00676	F: TCGACAACGGTCTAGGAGGT R: CCTCGACGAAGGTAGCAATC	105	94.6	700
	TEQG_05542				
	H101_04759				
	TERG_00216				
	TESG_05705				
hypothetical protein (<i>ocpB</i>)	MCYG_02825	F: CCTGAACCCTCATTCTTGGA R: AGATTCCTGGTGAAGTTGGC	105	103.8	500
	TEQG_04191				
	H101_05478				
	TERG_08557				
	TESG_01852				
hypothetical protein (<i>cdo1</i>)	MCYG_00905	F: GCAGATGAGTCCAGAGCCTA R: TAGCATGGTCGTGGATTGGA	115	92.5	400
	TEQG_01460				
	H101_08051				
	TERG_00456				
	TESG_02360				
sulfite efflux pump SSU1 (<i>ssu1</i>)	MCYG_08415	F: CTCAGATGGGCAAGGAGTTC R: AGCTCCTTGGTGCATGACTT	127	99.3	500
	TEQG_01770				
	H101_04808				
	TERG_02694				
	TESG_02066				
hypothetical protein (<i>mdr1</i>)	MCYG_08227	F: CCTAATGCCCTTCCTGGATT R: AAATTGCCAGCTCGTTCTGT	130	106.9	600
	TEQG_01571				
	H101_00538				
	TERG_02508				
	TESG_01875				
hypothetical protein (<i>mdr2</i>)	MCYG_01745	F: TGA CTCTGAATCCGAAAAGG R: GTCGGTGAGCAACAGCAATA	83	95.6	500
	TEQG_03450				
	H101_02705				
	TERG_08613				
	TESG_00664				
ABC multidrug transporter Mdr4 (<i>mdr4</i>)	MCYG_01685	F: GGAAATTGAGCTTCGAGACG	113	94.2	600

	TEQG_08364	R: TTCCAACGATAGCAGTGTGC			
	H101_05743				
	TERG_07801				
	TESG_00713				
Actin	MCYG_05457	F: TGTGGTGATGAGGCACAGT R: CCATGTCATCCCAGTTTGTG	89	101.6	300
	TEQG_07086				
	H101_07683				
	TERG_06637				
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (<i>gapdh</i>)	TESG_07815	F: GCGTGACCCAGCCAACA R: TTGGCACCTCCCTTCAAGT	114	102.6	400
	MCYG_02017				
	TEQG_06150				
	H101_06863				
	TERG_04402				
	TESG_06829				

^(*) Denominação do produto gênico no genoma de *T. rubrum* disponibilizado pelo Broad Institute

5.9.3 Análise dos genes diferencialmente expressos

A análise da expressão dos genes estudados neste trabalho foi feita por meio da técnica de RT-qPCR com metodologia de detecção por *SYBR® Green* (Applied Biosystems, Cambridge, UK, cat.#4367659), de acordo com protocolo do fabricante, utilizando o equipamento *StepOnePlus Real Time PCR* (Applied Biosystems). Três amostras de RNA provenientes de experimentos independentes foram utilizadas para cada um dos pontos analisados e as reações foram realizadas em triplicata técnica. Cada reação, realizada com volume final de 12,5 µL, conteve 6,25 µL de *SYBR® Green* (PCR mix) e as quantidades de primers indicadas na Tabela 3.

As condições de ciclagem foram 95 °C por 10 minutos, 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 especificidade dos oligonucleotídeos utilizados. Todos os procedimentos e metodologias adotadas para a realização de RT-qPCR foram baseados em estudos prévios (Bustin *et al.*, 2004; Dheda *et al.*, 2005; Huggett *et al.*, 2005; Nolan *et al.*, 2006; Bustin *et al.*, 2009).

Foi utilizada quantificação relativa dos genes de interesse normalizando os dados com dois controles endógenos, *gapdh* e *actina* (Jacob *et al.*, 2012). As análises de expressão gênica foram realizadas pelo método de quantificação relativa $2^{-\Delta\Delta C_q}$ (Livak *et al.*, 2001), e os gráficos de acúmulo de transcritos gerados com auxílio do programa *GraphPad Prism v5* (www.graphpad.com/prism/Prism.htm). Os resultados foram submetidos à análise de Variância (one-way ANOVA, com $P < 0,05$) seguido do teste de Bonferroni *ad hoc* com nível de significância $p < 0,05$.

5.10 Análise comparativa da disposição de éxons e íntrons

As imagens comparativas da disposição dos éxons e íntrons entre os genes analisados foram feitas com auxílio da ferramenta Exon-Intron Graphic Maker, disponível em <http://wormweb.org/exonintron>.

5.11 *Análise de relações filogenéticas*

A identificação de genes e proteínas ortólogas foi feita por meio da ferramenta *BLASTP* (Altschul *et al.*, 1990). As sequências foram editadas no software *Bioedit* (<http://jwbrown.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) e os alinhamentos obtidos utilizando o programa *ClustalW* (Thompson *et al.*, 1994). As análises de distância foram feitas utilizando o algoritmo máxima verossimilhança e como modelo, método de substituição de aminoácidos LG (Le *et al.*, 2008), considerando bootstrap calculado com base em 1000 replicatas por meio do programa *Mega 6.0* (Tamura *et al.*, 2013). Como grupos externos foram escolhidos, para cada gene, ortólogos dos fungos *Coccidioides immitis* e *Coccidioides posadasii*.

5.12 *Busca por motivos de ligação ao DNA nas regiões promotoras*

As buscas por motivos de ligação ao DNA foram feitos com auxílio das ferramentas online Motif search, disponível em <http://www.genome.jp/tools/motif/> ou ela ferramenta Yeastract, disponível em <http://www.yeastract.com/formtfsbindingsites.php>.

5.13 *Análise de domínios transmembrana dos genes da família MDR*

Os domínios transmembrana foram preditos com auxílio dos programas TM finder (Deber *et al.*, 2001) e HHMMTOP (Tusnady *et al.*, 2001).

VI. Resultados e discussão

As espécies de dermatófitos utilizadas neste estudo foram selecionadas pela disponibilidade do genoma sequenciado, ocorrência em infecções em humanos, diversidade de hospedeiros e grau de conidiação. Estes genomas são semelhantes em tamanho, variando de 22,5 Mb para *T. rubrum*, 23 Mb para *T. tonsurans*, 24,1 Mb para *T. equinum*, 24,9 Mb para *M. canis*, e 22,05 Mb para *T. interdigitale* H6 (Cervelatti *et al.*, 2004; Martinez *et al.*, 2012; Coelho *et al.*, 2013). Todos os genomas são menores em tamanho em relação a outros *Onygenales* já sequenciados (Cuomo *et al.*, 2010).

Os genomas apresentam elevado grau de colinearidade interrompido por um pequeno número de inversões, alto percentual de identidade de aminoácidos e alta similaridade no conteúdo gênico. Dentre 6.168 grupos ortólogos comuns entre sete dos dermatófitos sequenciados, *T. rubrum*, *T. tonsurans*, *T. equinum*, *M. canis*, *M. gypseum*, *A. benhamiae* e *T. verrucosum*, 308 genes não apresentam domínios reconhecidos no InterPro, sendo provavelmente únicos entre os dermatófitos (Burmester *et al.*, 2011; Martinez *et al.*, 2012).

Aspectos de crescimento e conidiação das espécies foram analisados de forma comparativa tanto em meio sólido quanto em meio líquido. Após repiques de fragmentos de micélio de todas as espécies em estudo observamos crescimento lento em meio MEA, atingindo desenvolvimento micelial e esporulação expressiva entre 15 a 20 dias, a 28°C.

Buscando relacionar a conidiação entre as linhagens, inoculamos em meio MEA, por 17 dias, aproximadamente 10^6 conídios de cada uma das espécies, em três experimentos independentes, com triplicata técnica. Os conídios germinados foram estimados em hematímetro (Figura 12).

Foi observada quantidade significativamente maior de conídios em *T. equinum*, em relação às demais espécies, nas condições analisadas. A conidiação observada entre *T. rubrum* e *T. interdigitale* é relativamente semelhante, e *T. tonsurans* apresenta quantidade de conídios aproximadamente 100 vezes menor em relação a *T. equinum*. Resultados de verificação de conidiação obtidos por Achterman *et al.* (2001), utilizando as mesmas espécies, com metodologia diferente, já indicaram maior conidiação para *T. equinum* em relação às demais espécies ensaiadas (*M. canis*, *T. rubrum* e *T. tonsurans*).

Figura 12. Relação de germinação de conídios entre espécies de dermatófitos. Resultados representativos da média entre três placas, em três experimentos independentes. Barras de erro indicam desvio padrão.

Também o desenvolvimento radial dos dermatófitos foi observado tanto em meio MEA (figura 13) quanto em meio mínimo suplementado com queratina (figura 14). Aproximadamente 10^6 conídios de cada uma das espécies foram inoculados em placas de Petri, em três experimentos independentes, com triplicata técnica. O crescimento foi observado diariamente e mensurado em centímetros até atingirem o diâmetro total da placa (9 cm), exceto para *T. tonsurans* na condição de crescimento em queratina.

Figura 13. Progressão de desenvolvimento radial dos dermatófitos em meio MEA. Resultados representativos da média entre três placas, em três experimentos independentes. Barras de erro indicam desvio padrão.

Verificou-se que em meio de cultivo MEA a espécie *T. equinum* apresenta rápida progressão radial, completando no vigésimo dia o diâmetro total da placa, diferindo

significativamente de *T. tonsurans*, espécie intimamente relacionada filogeneticamente e que completou o diâmetro da placa no trigésimo dia. Observou-se uma relação direta entre a capacidade de conidiação das espécies e a taxa de germinação nas condições avaliadas.

Em meio mínimo contendo queratina de origem bovina como fonte de carbono as espécies apresentaram padrão de crescimento radial diferente em relação ao meio MEA (figura 14). *T. interdigitale* apresenta maior taxa de germinação e desenvolvimento radial em relação às demais espécies, seguido de *T. rubrum*, duas espécies antropofílicas, demonstrando não haver relação entre o fato da fonte de carbono ser de origem animal e o nicho ecológico original destes dermatófitos, nas condições de cultivo analisadas. *T. equinum* é o terceiro dermatófito com melhor desenvolvimento no meio de queratina bovina seguido de *M. canis*, as duas espécies zoofílicas analisadas.

Figura 14. Progressão de desenvolvimento radial dos dermatófitos em meio mínimo contendo queratina como fonte de carbono. Resultados representativos da média entre três placas, em três experimentos independentes. Barras de erro indicam desvio padrão.

Interessante ressaltar que, em estudo anterior, foi avaliado o crescimento de uma espécie de *M. canis* em meio de sais contendo diferentes pelos de animais, tendo sido observado que o crescimento desta espécie ocorreu de forma mais lenta em presença de pelos de gatos ou cães, hospedeiros naturais deste dermatófito, quando comparado com o crescimento em pelos de raposas, indicando ausência de predileção pelos substratos considerados preferenciais neste dermatófito, *in vitro* (Wawrzekiewicz *et al.*, 1997).

T. tonsurans não apresentou completo desenvolvimento radial nas condições analisadas em 30 dias de observação do crescimento. Tal comportamento não decorre da

preferência de determinada fonte de carbono, uma vez que a linhagem apresenta crescimento significativo em meio líquido contendo a mesma queratina, de origem bovina, como única fonte de nutrientes (em 96 horas de crescimento). Além disso, o fungo ainda poderia utilizar o ágar como fonte de carbono suplementar. A restrição de outros nutrientes (não avaliados) no meio de cultura sólido, contendo meio mínimo e queratina, pode ter limitado o desenvolvimento de *T. tonsurans* nestas condições experimentais.

Ainda com o intuito de avaliar comparativamente o desenvolvimento dos fungos, realizamos ensaios em presença de diferentes substratos queratinizados nos períodos de 24, 48, 72 ou 96 horas de crescimento. Aproximadamente 1×10^6 conídios foram inoculados em 50 mL de água contendo 0,2% (m/v) de fragmentos de unha humana ou cabelos ou cascos bovinos em pequenos fragmentos. Os resultados apresentados (figuras de 15 a 18) são representativos de três experimentos independentes.

<i>M. canis</i>			
	Cabelo	Unha	Queratina
24 horas			
48 horas			
72 horas			
96 horas			

Figura 15. Fotomicrografias de *M. canis* em diferentes substratos queratinizados por períodos de 24 a 96 horas. Substratos indicados com asteriscos e os fungos, com setas (x40).

Figura 16. Fotomicrografias de *T. equinum* e *T. interdigitale* cultivados em diferentes substratos queratinizados por períodos de 24 a 96 horas. Substratos indicados com asteriscos e os fungos, com setas (x40).

Figura 17. Fotomicrografias de *T. rubrum* e *T. tonsurans* cultivados em diferentes substratos queratinizados por períodos de 24 a 96 horas. Substratos indicados com asteriscos e os fungos, com setas (x40).

Figura 18. Fotomicrografias dos controles do experimento: cabelo, unhas humanas e fragmentos de casco bovino, em sequência (x10).

M. canis apresentou crescimento significativamente maior em cabelos, comparado às demais linhagens (Figura 16). O desenvolvimento de *M. canis* já havia sido observado em cabelos humanos por Wawrzkievicz *et al.* (1997). No referido trabalho, após três dias de cultivo foi observado algum desenvolvimento de *M. canis*, mas apenas após 30 dias de cultivo foi possível registrar alterações microscópicas da decomposição do substrato, indicando ser este substrato relativamente resistente à ação de *M. canis*.

Para todas as espécies de fungos analisados no presente trabalho já houve relato sobre a capacidade deles colonizarem e utilizarem como fonte nutricional *in vitro* cabelos humanos, porém, são sempre necessários períodos muito longos de cultivo para que se possa observar microscopicamente a degradação e invasão ao substrato (Wawrzkievicz *et al.*, 1997; Błyskal, 2009). Nossas análises foram feitas em tempos curtos de exposição aos diferentes substratos, acompanhando os períodos escolhidos para os experimentos de expressão gênica. Nos cultivos para os experimentos de expressão gênica foi utilizada apenas queratina de origem bovina devido à maior facilidade de obtenção do substrato e melhor desenvolvimento dos fungos em cultura.

6.1 Análise comparativa de expressão gênica em dermatófitos durante o processo de interação com moléculas do hospedeiro

Foram escolhidos 11 genes descritos na literatura como relacionados à patogenicidade em fungos para terem seus níveis de acúmulo de transcritos verificados nas condições de cultivo propostas neste trabalho. As análises foram feitas utilizando a técnica de PCR quantitativa em tempo real a partir de transcrição reversa (RT-qPCR), técnica altamente sensível, reprodutível e de custos moderados para análises de expressão gênica (Bustin *et al.*, 2009).

Todos os genes foram analisados quanto à similaridade de sequências entre os genomas dos cinco dermatófitos. A disposição e número de éxons e íntrons para cada um destes genes foi verificada de forma comparativa, assim como o tamanho dos genes e das proteínas preditas. Todos os dados foram obtidos pelas ferramentas disponíveis no site do Broad Institute.

Partindo de meio de cultivo contendo queratina bovina como única fonte de nutrientes e pH inicial ácido, em condição que mimetiza o processo de infecção, três cultivos independentes foram feitos com cada uma das linhagens em estudo, para análises de expressão gênica por PCR em tempo real. Em cada tempo de cultivo foi verificada a variação de pH do meio de cultura (Figura 19). O pH inicial de crescimento para todas as linhagens foi individualmente ajustado em 5 (± 0.1).

Figura 19. Alteração do pH extracelular em relação aos tempos de cultivo em meio contendo queratina. Dados representativos da média entre três experimentos independentes. Barras de erro indicam desvio padrão.

O início do processo de infecção por dermatófitos depende do pH ácido da pele, e a instalação e manutenção da infecção dependem da alcalinização do ambiente (Ferreira-Nozawa *et al.*, 2003; Martinez-Rossi *et al.*, 2004). Foi possível observar a progressiva alcalinização do meio de cultivo durante crescimento das cinco espécies utilizadas, indicando a transição do período inicial, de adaptação dos fungos ao substrato, até a instalação do processo infeccioso *in vitro*. A resposta adaptativa ao pH ambiente apresenta-se como um fenômeno universal já descrito para outros micro-organismos que possuem a capacidade de

modular o pH ambiente durante o seu desenvolvimento, regulando a expressão de seus genes de acordo com as condições do microambiente em que estão, por meio de mecanismos ainda não totalmente esclarecidos (Ferreira-Nozawa *et al.*, 2003; Martinez-Rossi *et al.*, 2011).

Pela alcalinização dos meios de cultivo, o pH atinge aproximadamente 8 para as espécies *M. canis*, *T. equinum*, *T. rubrum* e *T. tonsurans*, ultrapassando 8 apenas para *T. interdigitale* ao final do tempo analisado neste estudo. Os resultados de alcalinização desta última espécie estão de acordo com dados já publicados pelo grupo (Silveira *et al.*, 2010). Esse processo decorre da liberação de aminoácidos tais como glicina, cujo metabolismo leva à secreção de amônia, responsável pela alcalinização do pH extracelular, em virtude da hidrólise das proteínas do substrato queratinolítico (Martinez-Rossi *et al.*, 2011; Mendes *et al.*, 2012). Do crescimento de *T. interdigitale* por 96 horas é possível perceber a volatilização da amônia liberada no meio extracelular resultante da degradação da queratina disponível no meio de cultivo, um indício de virulência aumentada neste dermatófito em comparação às demais espécies em análise, nas condições de cultivo propostas. A dosagem da quantidade de amônia liberada no meio não foi realizada.

No tempo de 72 horas de cultivo há relevante aumento no valor do pH do meio para a espécie *M. canis*, indicando mais rápida adaptação deste dermatófito, zoofílico, ao substrato disponível, promovendo maior celeridade na atuação das enzimas com atividade ótima em pH alcalino. A alcalinização gradual do meio de cultivo pelos dermatófitos estudados indica adaptação dos fungos para a síntese e secreção de enzimas proteolíticas que apresentam atividade ótima em pH básico, evento necessário para a perpetuação da infecção destas espécies no hospedeiro (Martinez-Rossi *et al.*, 2004; Martinez-Rossi *et al.*, 2011).

Ao final das 96 horas de cultivo foi observada reduzida quantidade de queratina não metabolizada e grande massa micelial nos frascos de cultivo das espécies *T. rubrum* e *T. interdigitale*, o que indica adaptação e pleno desenvolvimento dos conídios, com agregação à queratina pelos fungos. Para as espécies *M. canis* e *T. tonsurans*, maior quantidade de queratina livre estava visível nos frascos ao fim do tempo 96 horas de cultivo, mas o crescimento micelial foi considerável, da mesma forma que para *T. rubrum* e *T. interdigitale*, indicando que uma menor agregação do fungo ao substrato não comprometeu seu desenvolvimento. A espécie *T. equinum*, por outro lado, forma aglomerados miceliais mais dispersos no frasco de cultivo, sendo que uma grande quantidade visível de queratina não degradada permanece livre ao final das 96 horas, sugerindo uma menor agregação ao substrato por este dermatófito.

Os poucos registros de casos clínicos indicando infecções causadas por *T. equinum* em humanos e em outros organismos além de equinos indicam que, possivelmente, esta espécie de fungos apresenta grande predileção pelo hospedeiro original, embora haja grande similaridade na composição geral das queratinas.

Comparação entre os homólogos *pacC*

O desenvolvimento dos micro-organismos em diferentes nichos decorre de sua adaptabilidade e capacidade de modulação frente a diferentes sinais externos. A capacidade de coordenar o sensoramento ambiental e de nutrientes, com o controle de respostas a sinais moleculares é crucial para o crescimento e proliferação da maioria dos organismos vivos, incluindo fungos. A incapacidade de regular tais respostas, como a modulação em resposta ao pH do ambiente, teria impactos negativos significativos sobre a competitividade de um organismo (Rossi *et al.*, 2013). Em dermatófitos, o controle das repostas genéticas frente a sinais moleculares são cruciais para o sucesso da colonização e invasão ao hospedeiro (Martinez-Rossi *et al.*, 2011).

A cascata de regulação via *pacC* medeia em *T. interdigitale*, e possivelmente em outros dermatófitos, diferentes eventos metabólicos envolvidos na secreção de uma série de enzimas hidrolíticas, adesão, transporte celular, crescimento, desenvolvimento, absorção de ferro, defesa e virulência em ambos pHs, ácido ou alcalino (Silveira *et al.*, 2010; Martinez-Rossi *et al.*, 2011). Isto indica que, em *T. interdigitale*, *pacC* apresenta grande diversidade de funções metabólicas em resposta a pHs extracelulares ácidos e alcalinos, como já foi relatado em *A. nidulans* (Silva *et al.*, 2008; Freitas *et al.*, 2011) e *N. crassa* (Leal *et al.*, 2009; Squina *et al.*, 2010).

Tanto o gene *pacC* quanto a proteína predita apresentam similaridade nos tamanhos das sequências entre as espécies do gênero *Trichophyton*, sendo menor para *M. canis* (Tabela 4). Eles apresentam o mesmo número de íntrons e éxons, e tem similar disposição no gene, em cada espécie. O éxon central apresenta uma região conservada com mesmo número de nucleotídeos (313 nt) nas cinco espécies, sendo que as diferenças de tamanho estão nos éxons 1 e 3, e nos dois íntrons (Figura 20).

Tabela 4. Número de éxons e íntrons, tamanho do gene e proteína predita e identificações de famílias para o gene *pacC*.

Espécie	<i>M. canis</i>	<i>T. equinum</i>	<i>T. interdigitale</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. tonsurans</i>
Locus*	MCYG_01012	TEQG_01042	H101_07360	TERG_00838	TESG_04572
Nome	zinc finger transcription factor pacC	pH-response transcription factor pacC/RIM101	pH-response transcription factor pacC/RIM101	pH-response transcription factor pacC/RIM101	zinc finger transcription factor pacC
Família	pH-response transcription factor pacC/RIM101				
Tamanho do gene	2405 nt	2622 nt	2623 nt	2623 nt	2600 nt
Tamanho da proteína	767 aa	825 aa	829 aa	816 aa	825 aa
Número de éxons	3	3	3	3	3
Número de íntrons	2	2	2	2	2
Família pelo Pfam**	Zinc finger, C2H2 type				

*ID disponível em www.broadinstitute.org/annotation/genome/dermatophyte_comparative**disponível em <http://pfam.xfam.org/family>

Figura 20. Representação esquemática do gene que codifica para o fator de transcrição PacC em dermatófitos. Éxons indicados nas regiões preenchidas, com seus respectivos números de nucleotídeos indicados em azul. Regiões intrônicas nos intervalos, com seus respectivos tamanhos indicados em vermelho. A escala corresponde a 100 bases. Espécies identificadas pelas siglas, seguido do número de identificação do gene nos genomas.

O nível de acúmulo de transcritos do gene *pacC* foi analisado por RT-qPCR de forma comparativa entre os cinco fungos em estudo (Figura 21). Em relação a *T. rubrum* no tempo de 24 horas, utilizado como controle do experimento, o acúmulo de mRNA acontece de forma não dependente do pH ambiente. O maior acúmulo de mRNA em cada espécie ocorre em diferentes pHs: *M. canis*, *T. interdigitale*, *T. rubrum* e *T. tonsurans* apresentam maior acúmulo de transcritos do gene *pacC* em 72 horas de cultivo, momento em que o pH está em torno de 8 para *M. canis* e 7 para *T. interdigitale*, *T. rubrum* e *T. tonsurans*, com significativa diminuição da quantidade relativa de mRNA no tempo seguinte, de 96 horas. Para *T. equinum* o momento observado de maior acúmulo está em 24 horas, em ambiente com pH ácido.

Figura 21. Valores relativos de acúmulo de transcritos (por RT-qPCR) do gene *pacC* obtidos a partir de cultivos em meio contendo água e queratina bovina como fonte nutricional. As análises foram realizadas em comparação a *M. canis* no tempo de 24 horas de cultivo. Significância estatística determinada utilizando teste de Bonferroni *ad hoc* e indicada por asteriscos: * indicando $p < 0.05$; ** indicando $p < 0.01$; *** indicando $p < 0.001$. As análises estatísticas apresentadas abaixo dos gráficos indicam as relações de significância em relação ao tempo de 24 horas por espécie.

Em número de transcritos, o acúmulo de *pacC* é maior entre as espécies zoofílicas, *M. canis* e *T. equinum*, comparado às espécies antropofílicas *T. rubrum*, *T. interdigitale* e *T. tonsurans*. No tempo de 72 horas de cultivo, para todas as espécies ocorre visível diminuição da queratina disponível, não observada nos tempos iniciais, de 24 e 48 horas. Sendo responsivo às condições nutricionais do ambiente, a diminuição da quantidade de substrato disponível pode ter provocado o aumento significativo na quantidade de mRNA de *pacC* em *M. canis* e *T. tonsurans* e *T. interdigitale*, resultado do sensoramento da depleção da fonte nutricional do meio de cultivo.

Este acúmulo de transcritos no momento da diminuição da disponibilidade de queratina *in vitro* pode ainda ser uma forma de garantir a perpetuação da infecção por estes fungos mesmo em situações de reduzida disponibilidade nutricional, em virtude da relevância de *pacC* para a virulência em dermatófitos. A disrupção do gene *pacC* em *T. interdigitale* H6 diminuiu a secreção de proteases com atividade queratinolítica bem como a capacidade de desenvolvimento desta linhagem mutante utilizando fragmentos de unhas como única fonte nutricional (Ferreira-Nozawa *et al.*, 2006).

A identificação e a inativação do gene *pacC* no dermatófito *T. interdigitale* revelou que o desenvolvimento e a consequente degradação da queratina pelo fungo estão de alguma maneira sob influência do produto de *pacC*, atuando na secreção e/ou atividade de proteases que apresentam atividade ótima em pH alcalino. Além disso, embora o gene *pacC* participe da regulação da atividade de enzimas importantes para a virulência fúngica, ele não está envolvido na alcalinização do meio de cultivo (Ferreira-Nozawa *et al.*, 2006; Silveira *et al.*, 2010). A alcalinização do meio de cultivo nos cinco dermatófitos utilizados neste estudo, sem o correspondente acúmulo de transcritos do gene *pacC* corrobora com os dados da literatura, indicando que a modulação do pH do meio ocorre de forma independente do gene *pacC* em *T. interdigitale* (Silveira *et al.*, 2010).

Comparação entre os homólogos *gelI*

Fungos são capazes de modular a expressão de genes de acordo com o pH ambiente de modo a manter a integridade da parede celular, primeira interface entre os micro-organismos e o ambiente, e promover a viabilidade sob condições diversas. Famílias homólogas de genes descritas em *Candida albicans* (família *phr*), *Saccharomyces cerevisiae* (família *ggp/gas*), e em *Aspergillus fumigatus* e *Neurospora crassa* (família *gel*) expressam proteínas beta-(1,3)-glicosiltransferases ancoradas à monocamada externa da bicamada lipídica da membrana plasmática, que atuam na biossíntese da parede celular em fungos, sendo importantes na modulação desta estrutura em função de variações ambientais (Rolli *et al.*, 2009; Kamei *et al.*, 2013).

Estas enzimas catalisam dois passos da reação de β -(1,3)-glicosiltransferase: uma ligação glicosídica interna de uma cadeia de β -(1,3)-glicana doadora é clivada e a porção redutora liberada é transferida para a extremidade não redutora de outra molécula de β -(1,3)-glicana, receptora, resultando no alongamento da cadeia, criando múltiplos sítios de ancoragem para manoproteínas, quitina ou para galactomananas (Kamei *et al.*, 2013).

Em *C. albicans* a expressão de genes pertencentes à família *phr* é regulada em função do pH ambiente, via Rim101/PacC, sendo que *phr1* apresenta maior acúmulo de transcritos em pH alcalino e *phr2* apresenta maior acúmulo de transcrição em pH ácido, ambos regulados via *pacC* (Ragni *et al.*, 2011).

Foi observado em *A. fumigatus* que dois genes da família *gel*, *gel1* e *gel2*, são constitutivamente expressos, independente do pH do meio de cultivo da mesma forma que acontece em *S. cerevisiae*. Em *A. fumigatus* não foi observado motivo de ligação a *pacC* nas

regiões promotoras de *gel1* e *gel2*, indicando ausência de regulação direta via PacC, e dados de deleção destes dois genes sugerem a participação de ambos na morfogênese e virulência do fungo (Mouyna *et al.*, 2005).

Um gene pertencente a esta família, aqui identificado como *gel1*, foi avaliado quanto ao número de éxons e íntrons, bem como o tamanho do gene e proteínas preditas entre os dermatófitos analisados no presente trabalho (Figura 22). Observa-se grande similaridade no número de nucleotídeos e aminoácidos (Tabela 5). Pela verificação da região promotora de *gel1* entre os dermatófitos, observamos que não possuem o motivo de ligação a *pacC*, sugerindo ausência de regulação direta via PacC e, por conseguinte, ausência da regulação via pH, como observado em *A. fumigatus*.

Tabela 5. Número de éxons e íntrons, tamanho do gene e proteína predita e identificações de famílias para *gel1*.

Espécie	<i>M. canis</i>	<i>T. equinum</i>	<i>T. interdigitale</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. tonsurans</i>
Locus*	MCYG_00190	TEQG_02584	H101_02422	TERG_00625	TESG_02145
Nome	GEL1 protein	glycolipid anchored surface protein (GAS1)	hypothetical protein	hypothetical protein	hypothetical protein
Família	hypothetical protein				
Tamanho do gene	1623 nt	1163 nt	1163 nt	1674 nt	1163 nt
Tamanho da proteína	445 aa	447 aa	447 aa	448 aa	447 aa
Número de éxons	6	6	6	6 [†]	6
Número de íntrons	5	5	5	5 [†]	5
Família pelo Pfam**	Glyco_hydro_72 – Glucanosyltransferase				

*ID disponível em www.broadinstitute.org/annotation/genome/dermatophyte_comparative

**disponível em <http://pfam.xfam.org/family>

[†]é possível observar 3 diferentes isoformas putativas para o referido gene em www.broadinstitute.org/annotation/genome/dermatophyte_comparative/GeneDetails.html. Indicada a isoforma apresentando maior número de íntrons e éxons.

Figura 22. Representação esquemática do gene que codifica para uma proteína da família GEL em dermatófitos. Éxons indicados nas regiões preenchidas, com seus respectivos números de nucleotídeos indicados em azul. Regiões intrônicas nos intervalos, com seus respectivos tamanhos indicados em vermelho. A escala corresponde a 100 bases. Espécies identificadas pelas siglas, seguido do número de identificação do gene nos genomas.

O acúmulo de transcritos de *gel1* foi analisado por RT-qPCR de forma comparativa entre as cinco espécies em estudo, além da linhagem mutante $\Delta pacC$, utilizando como controle *T. rubrum* no tempo de cultivo de 24 horas (Figura 23).

Figura 23. Valores relativos de acúmulo de transcritos (por RT-qPCR) do gene *gel1* obtidos a partir de cultivos em meio contendo água e queratina bovina como fonte nutricional. As análises estatísticas foram realizadas em comparação a *M. canis* no tempo de 24 horas de cultivo. Significância estatística determinada utilizando teste de Bonferroni *ad hoc* e indicadas por asteriscos: * indicando $p < 0.05$; ** indicando $p < 0.01$; *** indicando $p < 0.001$. As análises estatísticas apresentadas abaixo dos gráficos indicam as relações de significância em relação ao tempo de 24 horas por espécie.

Os níveis de acúmulo de transcritos permanecem elevados em *M. canis* durante todo o tempo de cultivo analisado, em relação ao controle do experimento. Os resultados sugerem necessidade aumentada na atividade de modulação ou síntese de parede celular em *M. canis*.

Níveis menores de acúmulo são observados para *T. rubrum*, *T. equinum* e *T. tonsurans*, com exceção do tempo de 48 horas. É no tempo de 48 horas que se observa aumento no acúmulo de transcritos para todas as espécies. Ao sinal do início da alcalinização do meio e frente à instabilidade do pH no ambiente de cultivo, os dermatófitos pode ter aumentado os níveis transcricionais deste gene com o intuito de garantir disponibilidade da proteína codificada até o estabelecimento final do pH do ambiente externo, e possível atividade de modulação da formação da parede celular.

A espécie *T. interdigitale* apresenta reduzida quantidade de transcritos acumulados em 24 e 96 horas, com um aumento de mais de 20 vezes a quantidade relativa de mRNA em 48

horas, e um aumento ainda mais expressivo em 72 horas de cultivo, em relação ao controle do experimento. Tal fato pode ser uma resposta à atividade de morfogênese induzida pela presença da amônia extracelular, cuja volatilização é sentida no cultivo desta espécie no curso do tempo. Alterações morfogênicas decorrentes da variação de pH induzida pela secreção de amônia já foram observadas em *C. albicans* (Vylkova *et al.*, 2011).

Na região promotora do gene *gell* de *T. interdigitale* foi identificado um sítio de reconhecimento para uma CTCK_1 (*C-terminal cystine knot signature*), cujo consenso de ligação ao DNA predito é 5' - C-C-x(13)-C-x(2)-[GN]-x(12)-C-x-C-x(2,4)-C - 3', não tendo sido encontrado nos outros quatro dermatófitos em análise. Este é um consenso estrutural presente em animais, plantas e fungos, determinante na estabilidade e conformação das proteínas, estabilizando a molécula por meio de três pontes dissulfeto internas às cisteínas que o compõe, atuando como ligantes para uma gama diversificada de receptores. Desempenha um papel importante na sinalização extracelular (Vitt *et al.*, 2001; Iyer *et al.*, 2011).

Ainda pouco estudado, CTCK_1 pode estar relacionado ao sistema de defesa de plantas contra patógenos, associado à atividade de toxinas ou atuando como bloqueadores da função de receptores de proteínas como canais de íons ou proteases (Pallaghy *et al.*, 1994; Craik *et al.*, 1999; Iyer e Acharya, 2011). A regulação via CTCK_1 pode estar influenciando o perfil transcricional diferenciado de *T. interdigitale* quando em comparação com os demais dermatófitos em estudo.

O significativo decaimento no número de transcritos acumulados de *gell* no tempo de 72 horas na linhagem $\Delta pacC$ indica que PacC regule a transcrição deste gene, e que tem um significativo papel na regulação da morfogênese e remodelação da parede celular em *T. interdigitale*.

Por alinhamento das sequências dos genes *phr* de *C. albicans* no genoma de *T. rubrum* foram identificados outros quatro membros da família *gel*, além do gene aqui analisado, todos apresentando ortólogos em todos os dermatófitos em estudo.

O perfil transcricional destes cinco genes foi avaliado em *T. equinum* nas condições de cultivo em queratina (resultados não mostrados), não tendo sido observada regulação pH dependente, como acontece em *C. albicans*. Estes genes se comportam nos dermatófitos da mesma forma que em *N. crassa* e *A. nidulans*, possivelmente relacionados a eventos de morfogênese e remodelação da parede celular, indicando ser espécie dependente esta característica de modulação em relação ao pH. O acúmulo de transcritos dos outros quatro genes nos demais dermatófitos não foi verificado por RT-qPCR.

Nestes outros quatro genes pertencentes à família *gell* em dermatófitos não foi encontrado o motivo de ligação ao DNA para o fator de transcrição PacC na região promotora. Estes resultados corroboram com os dados de expressão gênica, que indicaram não serem estes genes dependentes da modulação pelo pH extracelular. A busca foi feita utilizando a sequência consenso 5' -GCCAR(A/G)- 3' de *A. nidulans* (Tilburn *et al.*, 1995).

Comparação entre os homólogos *ureD*

A alcalinização observada no meio de cultura, resultante do desenvolvimento dos dermatófitos, pode ser justificada pela produção de amônia decorrente da hidrólise de uréia. Vários micro-organismos patogênicos são capazes de utilizar uréia como fonte de nitrogênio promovendo sua conversão em amônia e carbamato. Pela hidrólise espontânea deste carbamato em ácido carbônico, é gerada uma segunda molécula de amônia. Sob condições fisiológicas, o próton do ácido carbônico dissocia e as moléculas de amônia ficam protonadas formando amônio, responsável pelo aumento no pH do ambiente (Rutherford, 2014).

Ureases (uréia amidohidrolases; EC 3.5.1.5) são enzimas dependentes de níquel que catalisam a reação de hidrólise da uréia (Park *et al.*, 1994). Estudos desenvolvidos com dois fungos evolutivamente diversos, *Cryptococcus neoformans* (um basidiomiceto) e *Coccidioides posadasii* (um ascomiceto) sugerem que ureases atuem promovendo a instauração da infecção pelo efeito tóxico às células do hospedeiro, promovido pela liberação da amônia. Este efeito incorre no processo de evasão do sistema imune do hospedeiro, atuando como fatores associados à virulência em fungos (Rutherford, 2014).

A inativação do gene da urease de *C. posadasii* resultou na redução acentuada da quantidade de amônia secretada *in vitro* pelas células fúngicas, e atenuação da virulência (Mirbod-Donovan *et al.*, 2006).

Estas enzimas apresentam ampla distribuição em plantas, bactérias e fungos, não sendo sintetizadas por animais, podendo ser utilizadas como possíveis alvos para o desenvolvimento de antifúngicos (Rutherford, 2014). Seus componentes estruturais divergem em número entre bactérias, fungos e plantas. Poucos estudos estão relacionados à estrutura e atuação de ureases em fungos. Em *C. neoformans*, foi descrito que para ativar o sítio catalítico da urease, codificado por *ure1*, a apourease adquire íons Ni^{2+} através de proteínas acessórias Ure4, Ure6 e Ure7, homólogos dos genes *ured*, *uref*, e *ureg* de bactérias (Singh *et al.*, 2013).

Foi descrito em *Kiebsiella aerogenes* que a proteína acessória UreD apresenta atividade de chaperona, necessária para a translocação dos íons Ni^{2+} até o sitio ativo, atuando

também na ativação da apoproteína (Park *et al.*, 1994; Carter *et al.*, 2010). Devido à sua relevância na virulência, o gene que codifica para *ureD*, identificado previamente em nosso laboratório (Peres *et al.*, 2010), foi avaliado comparativamente entre os dermatófitos (Tabela 6).

Tabela 6. Número de éxons e íntrons, tamanho do gene e proteína predita, e identificações de famílias para o gene *ureD*.

Espécie	<i>M. canis</i>	<i>T. equinum</i>	<i>T. interdigitale</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. tonsurans</i>
Locus*	MCYG_07995	TEQG_04793	H101_00618	TERG_02330	TESG_02963
Nome	urease accessory protein UreD	urease accessory protein UreD	hypothetical protein	hypothetical protein	urease accessory protein UreD
Família	urease accessory protein UreD				
Tamanho do gene	1167 nt	1270 nt	1206 nt	1206 nt	1206 nt
Tamanho da proteína	389 aa	339 aa	402 aa	402 aa	402 aa
Número de éxons	1	2	1	1	1
Número de íntrons	0	1	0	0	0
Família pelo Pfam**	UreD urease accessory protein				

*ID disponível em www.broadinstitute.org/annotation/genome/dermatophyte_comparative

**disponível em <http://pfam.xfam.org/family>

A sequência disponibilizada para o gene *ureD* em *T. equinum* apresenta um íntron não observado nos demais dermatófitos. A sequência disponibilizada para este íntron possui grande região de baixa qualidade, o que sugere uma possível falha no sequenciamento, que pode estar refletida no tamanho putativo da proteína predita (Figura 24).

Figura 24. Representação esquemática do gene que codifica para uma proteína acessória UreD em dermatófitos. Éxons indicados nas regiões preenchidas e regiões intrônicas nos intervalos. A escala corresponde a 100 bases. Espécies identificadas pelas siglas seguido do número de identificação do gene no genoma.

O acúmulo de transcritos foi também avaliado de forma comparativa entre os dermatófitos por RT-qPCR (Figura 25). Em relação aos resultados obtidos em 24 horas de cultivo de *M. canis*, podemos observar um maior acúmulo de mRNA de *ureD* em *T. interdigitale* nos tempos de cultivo analisados, estando os níveis transcricionais aumentados em, no mínimo, 23 vezes. Esta linhagem apresenta sensível produção de amônia, fato que decorre, provavelmente, da atividade das enzimas ureolíticas nesta espécie, corroborado pelos níveis transcricionais do gene que codifica para a proteína responsável pela ativação do complexo da enzima urease.

Figura 25. Valores relativos de acúmulo de transcritos (por RT-qPCR) do gene que codifica para uma proteína acessória UreD obtidos a partir de cultivos em meio contendo água e queratina bovina como fonte nutricional. As análises estatísticas foram realizadas em comparação a *M. canis* no tempo de 24 horas de cultivo. Significância estatística determinada utilizando teste de Bonferroni *ad hoc* e indicadas por asteriscos: * indicando $p < 0.05$; ** indicando $p < 0.01$; *** indicando $p < 0.001$. As análises estatísticas apresentadas abaixo dos gráficos indicam as relações de significância em relação ao tempo de 24 horas por espécie.

O acúmulo de transcritos de *ureD* é ainda maior na linhagem mutante para o fator de transcrição PacC, sugerindo que o fator de transcrição PacC regule negativamente a transcrição de *ureD* na linhagem *T. interdigitale*.

As ureases atuam modulando o pH do ambiente hospedeiro de forma a promover a perpetuação da infecção. As diferenças nas quantidades de mRNA das espécies analisadas sugerem maior necessidade de transcritos de *ureD* acumulados para as espécies do gênero *Trichophyton* em relação a *M. canis* nas condições ensaiadas. É possível que o papel de *ureD*

Não há clara relação entre a menor atividade de acúmulo de transcritos de *ureD* em *M. canis* e uma menor atividade infectante nesta espécie em relação às demais analisadas. Atingindo a alcalinização do microambiente em tempo inferior (72 horas) em relação às outras espécies estudadas do gênero *Trichophyton*, *M. canis* torna o sítio de infecção propício à invasão e instauração da infecção mais rapidamente, incorrendo em aumentada capacidade de causar danos ao tecido do hospedeiro. É relevante ressaltar que o menor nível de transcritos acumulados por *M. canis* não reflete a atividade da proteína. Somente pela verificação do perfil proteico e atividade enzimática tal correlação poderá ser feita.

Este grupo de proteínas recebeu esta denominação levando em consideração as iniciais de seus membros originais (Asm1p, Phd1p, Sok2p, Efg1p, e StuAp), identificados em vários fungos e pertencentes a uma família de fatores de transcrição que compartilham um motivo comum de ligação ao DNA (Doedt *et al.*, 2004). As proteínas apresentam um motivo de ligação de aproximadamente 100 aminoácidos, com porções altamente conservadas, cujo domínio central predito forma uma estrutura tipo hélice-volta-hélice (bHLH-like) (Lysoe *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2014). A Figura 26 mostra as sequências consenso de APSES identificadas por alinhamento nos genomas dos dermatófitos em estudo, e StuA de *A. nidulans* (Garcia-Pedrajas *et al.*, 2010). Sublinhados, os resíduos mais conservados de acordo com Ramirez-Zavala *et al.*, 2008.

[illegible]

	230	240	250
	....		
<i>M. canis</i>	ERALDFANKEKITDQLYPLFVHAIGS		
<i>T. equinum</i>	ERALDFANKEKITDQLYPLFVHAIGS		
<i>T. interdigitale</i>	ERALDFANKEKITDQLYPLFVHAIGS		
<i>T. rubrum</i>	ERALDFANKEKITDQLYPLFVHAIGS		
<i>T. tonsurans</i>	ERALDFANKEKITDQLYPLFVHAIGS		
<i>A. nidulans</i> StuA	DRALEFANKEKITDQLYPLFVQHISN		

Figura 26. Sequências consenso com resíduos mais conservados identificados (sublinhados) para o fator de transcrição APSES (StuA) por alinhamento entre os dermatófitos e StuA de *A. nidulans*.

O papel da família APSES como fatores relacionados à virulência ainda não está bem elucidado. Em *Glomerella cingulata* o gene GcSTUA é necessário para a infecção e penetração deste fungo em frutos de macieiras e cebola, influenciando na pressão de turgor necessária para a penetração do apressório (Tong *et al.*, 2007). Em *C. albicans*, Efg1 atua na regulação do gene relacionado à virulência Sap5, promovendo o processo infeccioso (Staib *et al.*, 2002).

Através de microarranjos de DNA desenvolvidos em nosso laboratório com *T. interdigitale* H6 em comparação à linhagem mutante para o gene que codifica para o fator de transcrição PacC, verificou-se diferencial de expressão para um gene apresentando o domínio APSES, denominado *stuA*. No referido trabalho, foi observado aumento crescente no acúmulo de transcritos do gene ao longo do tempo de cultivo, indicando um possível papel deste no processo de desenvolvimento *in vitro* do dermatófito (Cazzaniga, 2011).

Por serem genes exclusivamente presentes em fungos, tornam-se alvos potenciais para o desenvolvimento de agentes antifúngicos, uma vez que estas drogas atuam em vias não presentes no hospedeiro, evitando efeitos prejudiciais em pacientes humanos (Lysoe *et al.*, 2011).

O gene *stuA*, identificado no genoma de *T. interdigitale*, foi analisado quanto ao tamanho de sua sequência e da proteína predita, em relação ao número de éxons e íntrons (Tabela 7) de forma comparativa entre os dermatófitos em estudo.

StuA está identificado nos genomas de *T. equinum* e *T. tonsurans* como *cell pattern formation-associated protein*, e a família à qual pertencem também possui a mesma denominação. StuA é requerido para a formação do correto padrão celular em *A. nidulans* em associação com o produto de quatro outros genes: *abaA*, *brlA*, *medA* e *wetA* (Miller *et al.*, 1992). Tal referência pode ter direcionado a identificação do gene no genoma dos dermatófitos em estudo, que não está diretamente descrito como membro da família APSES.

Tabela 7. Número de éxons e íntrons, tamanho do gene e proteína predita, e identificações de famílias para o gene *stuA*.

Espécie	<i>M. canis</i>	<i>T. equinum</i>	<i>T. interdigitale</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. tonsurans</i>
Locus*	MCYG_00288	TEQG_02678	H101_07923	TERG_00714	TESG_02237
Nome	hypothetical protein	cell pattern formation-associated protein	hypothetical protein	hypothetical protein	cell pattern formation-associated protein
Família	cell pattern formation-associated protein				
Tamanho do gene	2111 nt	2038 nt	1424 nt	2071 nt	2080 nt
Tamanho da proteína	618 aa	620 aa	455 aa	621 aa	620 aa
Número de éxons	5	4	2	4	4
Número de íntrons	4	3	1	3	3
Família pelo Pfam**	KilA-N domain				

*ID disponível em www.broadinstitute.org/annotation/genome/dermatophyte_comparative**disponível em <http://pfam.xfam.org/family>

Os tamanhos dos éxons entre *T. equinum*, *T. rubrum* e *T. tonsurans* são conservados, com pequenas diferenças nos tamanhos dos íntrons (Figura 27). O íntron extra na sequência de *M. canis* indica uma interrupção no éxon maior, dividindo em duas porções menores a região codante. O resequenciamento da região poderá confirmar a real existência de um éxon extra.

Figura 27. Representação esquemática do gene *stuA* em dermatófitos. Éxons indicados nas regiões preenchidas, com seus respectivos números de nucleotídeos indicados em azul. Regiões intrônicas nos intervalos, com seus respectivos tamanhos indicados em vermelho. A escala corresponde a 100 bases. Espécies identificadas pelas siglas, seguido do número de identificação do gene nos genomas.

A sequência atribuída a *stuA* de *T. interdigitale* não está, aparentemente, completa nos arquivos do genoma disponibilizado pelo Broad Institute. Há uma grande região de *gap* na porção 3', o que justifica o menor número de íntrons em relação aos outros dermatófitos, bem

como o tamanho menor do gene e da proteína predita. *M. canis* apresenta gene e proteína maiores que os demais dermatófitos.

A análise do perfil transcricional comparativo de *stuA* entre os cinco dermatófitos em estudo revelou que comparado ao tempo de 24 horas de *M. canis*, o acúmulo de transcritos entre as espécies do gênero *Trichophyton* apresenta níveis menores, exceto para um ligeiro aumento no tempo de 24 horas de *T. equinum* (Figura 28). O acúmulo de transcritos de *stuA* é menos significativo entre as espécies do gênero *Trichophyton* avaliadas, em comparação ao controle experimental, sugerindo que a atividade de acúmulo é mais necessária entre a espécie do gênero *Microsporum*, nas condições ensaiadas. Para *M. canis*, em 48 e 96 horas de cultivo, é observada atividade de acúmulo de mRNA menos expressiva em relação aos tempos de 24 e 72 horas, sugerindo que o acúmulo de transcritos ocorra de forma cíclica neste dermatófito.

Figura 28. Valores relativos de acúmulo de transcritos (por RT-qPCR) do gene *stuA* obtidos a partir de cultivos em meio contendo água e queratina bovina como fonte nutricional. As análises estatísticas foram realizadas em comparação a *M. canis* no tempo de 24 horas de cultivo. Significância estatística determinada utilizando teste de Bonferroni *ad hoc* e indicadas por asteriscos: * indicando $p < 0.05$; ** indicando $p < 0.01$; *** indicando $p < 0.001$. As análises estatísticas apresentadas abaixo dos gráficos indicam as relações de significância em relação ao tempo de 24 horas por espécie.

Da mesma forma como observado nos experimentos desenvolvidos por Cazzaniga (2011), o acúmulo de transcritos de *stuA* em *T. interdigitale* selvagem e no mutante $\Delta pacC$ segue crescente até 72 horas, iniciando um decaimento em 96 horas, possivelmente devido à

estabilização do pH em 8, que indica o final do período de adaptação e infecção de *T. interdigitale* ao substrato disponível. O aumento crescente no acúmulo de transcritos do gene ao longo do tempo de cultivo indica um possível papel deste no processo de desenvolvimento dos dermatófitos *in vitro*. Como observado anteriormente, a expressão do gene *stuA* ocorre independente de *pacC* (Cazzaniga, 2011).

Com exceção de *T. interdigitale*, que ativa a transcrição de *stuA* ao longo tempo, os demais dermatófitos analisados apresentam maior quantidade de mRNA no tempo de 24 horas de cultivo, indicando uma possível resposta adaptativa à queratina, com o objetivo de promover o início da infecção no substrato disponível.

Comparação entre os homólogos *sub3*

Os fungos podem produzir e secretar várias enzimas hidrolíticas como proteases, lipases e fosfolipases, que atuam como fatores relacionados à virulência em processos de aquisição de nutrientes, danos aos tecidos e difusão da infecção, além de promover a evasão ao sistema imune do hospedeiro, influenciando fortemente na patogenicidade de fungos como *C. albicans*, *A. fumigatus*, *C. neoformans* e dermatófitos (Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009; Aboul-Nasr *et al.*, 2013; Al-Fakih, 2014).

No início da infecção, os fungos patogênicos precisam aderir à superfície a ser infectada e se adaptar ao ambiente do hospedeiro (Shepardson *et al.*, 2013). Os dermatófitos iniciam o processo de adesão através de artroconídios e após sua germinação, as hifas atuam invadindo os tecidos queratinizados. A adesão dos fungos durante a infecção é mediada por adesinas, e por interações com receptores do hospedeiro (Baldo *et al.*, 2011).

É amplamente aceito que a virulência dos dermatófitos está relacionada à sua capacidade singular de utilizar queratina dura como fonte nutricional, um dos principais constituintes do estrato córneo da pele, cabelo e unhas, através da atuação de enzimas com atividade proteolítica (Weitzman *et al.*, 1995; Grumbt *et al.*, 2013).

Experimentalmente, o crescimento de dermatófitos em queratina está fortemente correlacionado à expressão de múltiplas proteases secretadas (Monod, 2008). Estas proteases são, no entanto, geralmente incapazes de diretamente degradar a queratina, que é extremamente estável devido ao seu alto conteúdo de ligações dissulfeto de cistina (Vermout *et al.*, 2008; Grumbt *et al.*, 2013). Da atividade proteolítica, resultam pequenos peptídeos e aminoácidos, que permitem ao fungo a assimilação destes compostos, carregados por meio de transportadores (Monod, 2008). Em cultivos de dermatófitos em meio de cultura contendo

proteínas como única fonte nutricional, foi identificada atividade proteolítica pela secreção de enzimas como subtilisinas (serino-proteases da família S8) e fungalisinas (metaloproteases da família M36) (Baldo *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2010; Bagut *et al.*, 2012).

Proteases da família das subtilisinas secretadas estão entre as famílias de genes mais importantes para fungos que vivem aderidos à pele. Esta família é expandida em dermatófitos, e deve desempenhar papel relevante na degradação de queratina. Por análise de sequências dos genomas completos das espécies utilizadas no presente trabalho, observou-se que todas contêm 12 subtilisinas, sendo que *T. tonsurans* apresenta uma cópia adicional, e *M. canis* parece ter perdido uma subtilisina (Martinez *et al.*, 2012). O entendimento a respeito da regulação da atividade destas inúmeras proteases no processo de obtenção de nutrientes do substrato insolúvel, além de possíveis funções adicionais ou alternativas, ainda não está bem elucidado.

Os níveis de acúmulo de transcritos de cinco proteases pertencentes à família das metaloproteases e sete genes que codificam para serinoproteases em *T. rubrum* foram avaliados em cultivos contendo unhas e pele humanas. Após 21 dias de cultivo, foi observado maior acúmulo de transcritos de *sub7* e *mep2*, indicando terem estas duas enzimas papel de destaque no processo manutenção da infecção. *sub1*, *sub2*, *sub3* e *sub4* mantiveram níveis de acúmulo de transcritos inferiores à condição controle no referido experimento, indicando que as enzimas devem atuar em diferentes momentos da infecção, possivelmente com diferentes papéis no processo infeccioso (Chen *et al.*, 2010).

Em *M. canis*, cultivado na presença de substratos queratinolíticos, observou-se que *sub3* é requerida para o processo de adesão dos artroconídios, não estando relacionada ao processo de invasão à epiderme humana e de animais (Baldo *et al.*, 2010; Bagut *et al.*, 2012). *Sub3* apresenta em *M. canis* elevada atividade durante o cultivo em pelos de gatos como substrato, *in vitro*, com níveis de acúmulo de mRNA aumentados em tempos mais tardios do desenvolvimento, observados a partir do oitavo dia de cultivo. Esta subtilisina possui papel significativo no processo de adesão à epiderme de felinos (Mignon *et al.*, 1998; Baldo *et al.*, 2010).

O gene que codifica para uma subtilisina *sub3*, protease com atividade de adesina em dermatófitos, foi analisado de forma comparativa entre os cinco dermatófitos em estudo, visando avaliar seu papel no período inicial de infecção (Tabela 8).

As sequências de *sub3* nos genomas analisados são muito conservadas, tanto nas regiões intrônicas quanto nas regiões de éxons (Figura 29). É observada apenas uma região

em *T. rubrum* (íntron 2) e duas regiões em *M. canis* (íntrons 1 e 3) com diferença no número de nucleotídeos. As proteínas preditas apresentam, nos cinco dermatófitos, o mesmo número de aminoácidos. Tal similaridade de sequências não influencia nos níveis de acúmulo de mRNA, nas espécies em estudo.

Tabela 8. Número de éxons e íntrons, tamanho do gene e proteína predita, e identificações de famílias do gene *sub3*.

Espécie	<i>M. canis</i>	<i>T. equinum</i>	<i>T. interdigitale</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. tonsurans</i>
Locus*	MCYG_04040	TEQG_06704	H101_01018	TERG_03815	TESG_03300
Nome	alkaline proteinase	alkaline proteinase	subtilisin-like protease 3	subtilisin-like protease 3	alkaline serine protease
Família	subtilisin-like protease 3				
Tamanho do gene	1402 nt	1418 nt	1418 nt	1415 nt	1418 nt
Tamanho da proteína	398 aa	398 aa	398 aa	398 aa	398 aa
Número de éxons	4	4	4	4	4
Número de íntrons	3	3	3	3	3
Família pelo Pfam**	Peptidase_S8 - Subtilase family				

*ID disponível em www.broadinstitute.org/annotation/genome/dermatophyte_comparative

**disponível em <http://pfam.xfam.org/family>

Figura 29. Representação esquemática do gene que codifica para uma Sub3 em dermatófitos. Éxons indicados nas regiões preenchidas, com seus respectivos números de nucleotídeos indicados em azul. Regiões intrônicas nos intervalos, com seus respectivos tamanhos indicados em vermelho. A escala corresponde a 100 bases. Espécies identificadas pelas siglas, seguido do número de identificação do gene nos genomas.

T. equinum apresenta elevado acúmulo de transcritos de *sub3* nas condições ensaiadas, comparado com *M. canis* no tempo de 24 horas. Com exceção do tempo inicial de cultivo, os níveis de transcritos aumentaram em mais de 20 vezes em 48 horas, chegando a aumento superior a 800 vezes em comparação ao experimento controle após 96 horas (Figura 30). *T. equinum* apresenta menor desenvolvimento micelial em queratina, em comparação às demais

espécies em estudo, com maior limitação no desenvolvimento fúngico. Sugerimos que os aumentados níveis de transcritos de *sub3* sejam uma resposta na tentativa de garantir a adesão deste fungo ao substrato não preferencial, aumentando sua capacidade de virulência, e garantindo a sobrevivência da espécie e perpetuação do processo infeccioso nas condições ensaiadas.

Figura 30. Valores relativos de acúmulo de transcritos (por RT-qPCR) do gene *sub3* obtidos a partir de cultivos em meio contendo água e queratina bovina como fonte nutricional. As análises estatísticas foram realizadas em comparação a *M. canis* no tempo de 24 horas de cultivo. Significância estatística determinada utilizando teste de Bonferroni *ad hoc* e indicadas por asteriscos: * indicando $p < 0.05$; ** indicando $p < 0.01$; *** indicando $p < 0.001$. As análises estatísticas apresentadas abaixo dos gráficos indicam as relações de significância em relação ao tempo de 24 horas por espécie.

O aumento no número de transcritos em *T. interdigitale* (próximo a 150 vezes em relação ao experimento controle, no tempo de 24 horas) e *T. rubrum* (cerca de 470 vezes em relação ao controle, também no tempo de 24 horas) sugere que esta protease atue, em *T. interdigitale* e *T. rubrum*, nos tempos iniciais do desenvolvimento do dermatófito. A redução de mRNA acumulado obtida em tempos longos de cultivo também foi observado em unha e pele humanas por Chen *et al.*, (2010).

O nocaute do gene *pacC* em *T. interdigitale* aumenta o acúmulo de mRNA no tempo de 24 horas em cerca de 150 para mais de 500 vezes mais transcritos em relação ao controle do experimento, e exige que o fungo permaneça acumulando transcritos nos tempos de 48 horas e 72 horas, diferentemente da linhagem selvagem, indicando que PacC possa regular a

capacidade de adesão em *T. interdigitale*. A deleção estaria exigindo do fungo maior tempo até o início da instauração da infecção.

Também *T. tonsurans* apresenta acúmulo de transcritos do gene *sub3* nas condições testadas, em proporções menores, sem a ocorrência de uma resposta de acúmulo imediata, no tempo de 24 horas, tal como observado para *T. equinum*.

Simultaneamente à adesão, os dermatófitos iniciam o processo de invasão e destruição das estruturas queratinizadas do hospedeiro para obtenção de nutrientes, de modo a perpetuar sua permanência e infecção. Estas estruturas queratinizadas são basicamente constituídas de proteínas e lipídeos, alvos de atuação de enzimas fúngicas secretadas para a promoção do processo infeccioso.

Comparação entre os homólogos de lisofosfolipase (*lpl*)

Fosfolipases correspondem a um grupo heterogêneo de enzimas que compartilham a capacidade de hidrolisar uma ou mais ligações éster de glicerofosfolipídeos, grupo mais importante dos lipídeos de membrana. Cada glicerofosfolipídeo consiste de um esqueleto de glicerol contendo uma (lisofosfolipídeo) ou duas (fosfolipídeo) ligações éster a cadeias hidrofóbicas de ácidos graxos, além de uma terceira ligação éster a um grupamento fosfato. Este grupamento fosfato também está unido por ligações éster a uma variedade de agrupamentos polares, tais como colina, etanolamina, serina e inositol (Djordjevic, 2010). São enzimas ubíquas envolvidas em diversos processos, tais como a homeostase da membrana, aquisição de nutrientes, produção de moléculas bioativas sendo que algumas desempenham papel importante na patogênese e virulência de micro-organismos (Ghannoum, 2000; Kohler *et al.*, 2006; Hsu *et al.*, 2009).

Estas enzimas são classificadas como fosfolipases A₁ (PLA₁), A₂ (PLA₂), B (PLB), C (PLC) ou D (PLD), ou como lisofosfolipases (LPL), de acordo com o sítio de hidrólise na molécula de lipídeos. As LPLs estão associadas à regulação do nível de lisofosfolipídeos, componentes estruturais de membranas que participam em várias funções celulares como proliferação, apoptose, migração celular, nutrição e invasão de células de câncer em mamíferos, sinalização celular, não tendo sido ainda amplamente estudadas em fungos (Birgbauer *et al.*, 2006; Hsu *et al.*, 2009).

Muitos micro-organismos patogênicos, incluindo fungos, produzem fosfolipases com o intuito de promover sua invasão, sobrevivência, disseminação e evasão do sistema imunológico do hospedeiro. Estas fosfolipases são tanto secretadas quanto produzidas

intracelularmente, e atuam fisicamente perturbando as membranas do hospedeiro ou alterando a sinalização celular de fungos, modulando a produção de imunomoduladores (Djordjevic, 2010).

Um gene que codifica para uma lisofosfolipase identificada nos genomas dos cinco dermatófitos em estudo mostrou grande diferença nos tamanhos do gene e da proteína predita entre os dermatófitos analisados, sem relação direta com o gênero analisado, de acordo com os dados disponibilizados o site do Broad Institute. A diferença no número de íntrons e tamanho do gene entre os cinco dermatófitos sugerem a ausência de parte da sequência da lisofosfolipase nos genomas de *T. interdigitale* e *T. tonsurans*, provavelmente por um erro na anotação (Tabela 9 e Figura 31).

Tabela 9. Número de éxons e íntrons, tamanho do gene e proteína predita, e identificações de famílias para o gene *lpl*.

Espécie	<i>M. canis</i>	<i>T. equinum</i>	<i>T. interdigitale</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. tonsurans</i>
Locus*	MCYG_02652	TEQG_06949	H101_07838	TERG_05522	TESG_01690
Nome	lysophospholipase	lysophospholipase	hypothetical protein	hypothetical protein	lysophospholipase
Família	Lysophospholipase				
Tamanho do gene	2053 nt	2065 nt	1686 nt	2061 nt	1704 nt
Tamanho da proteína	645 aa	644 aa	562 aa	645 aa	568 aa
Número de éxons	3	3	2	3†	2
Número de íntrons	2	2	1	2†	1
Família pelo Pfam**	PLA2_B - Lysophospholipase catalytic domain				

†é possível observar 3 diferentes isoformas putativas para o referido gene em www.broadinstitute.org/annotation/genome/dermatophyte_comparative/GeneDetails.html. Indicada a isoforma apresentando maior número de introns e éxons.

*ID disponível em www.broadinstitute.org/annotation/genome/dermatophyte_comparative

**disponível em <http://pfam.xfam.org/family>

Figura 31. Representação esquemática do gene *lpl* em dermatófitos. Éxons indicados nas regiões preenchidas, com seus respectivos números de nucleotídeos indicados em azul. Regiões intrônicas nos intervalos, com seus

respectivos tamanhos indicados em vermelho. A escala corresponde a 100 bases. Espécies identificadas pelas siglas, seguido do número de identificação do gene nos genomas.

O acúmulo de transcritos da *lpl* foi analisado comparativamente, em relação ao tempo de 24 horas de *M. canis* (Figura 32). Foi observado maior acúmulo de transcritos entre as linhagens antropofílicas em relação às duas linhagens zoofílicas, principalmente no tempo inicial, de 24 horas de cultivo. Estes fungos antropofílicos podem ter requerido maior atividade de *lpl* para metabolização do substrato queratinolítico disponível, que não é seu substrato preferencial *in vivo*, aumentando o acúmulo de transcritos do gene da lisofosfolipase. Outra hipótese que pode ser levantada seria que esta enzima é fundamental para a atuação de fungos antropofílicos e menos relevante para os zoofílicos.

É observado em *T. interdigitale* o acúmulo de transcritos aumentado em 18 vezes, em relação ao controle, ocorrendo a diminuição nos níveis acumulados de transcritos nos tempos subsequentes. Na linhagem mutante para o fator de transcrição PacC, há necessidade de acúmulo de mRNA por um período mais longo, até 48 horas de cultivo, mas os níveis decaem igualmente à linhagem controle sugerindo que a ausência de *pacC* influencia negativamente a atividade lipolítica inicial, que perdura então por mais 24 horas, mas não altera o perfil geral.

Figura 32. Valores relativos de acúmulo de transcritos (por RT-qPCR) do gene que codifica para uma lisofosfolipase obtidos a partir de cultivos em meio contendo água e queratina bovina como fonte nutricional. As análises estatísticas foram realizadas em comparação a *M. canis* no tempo de 24 horas de cultivo. Significância estatística determinada utilizando teste de Bonferroni *ad hoc* e indicadas por asteriscos: * indicando $p < 0.05$; **

indicando $p < 0.01$; *** indicando $p < 0.001$. As análises estatísticas apresentadas abaixo dos gráficos indicam as relações de significância em relação ao tempo de 24 horas por espécie.

A atividade de lisofosfolipases é muito elevada durante a invasão de tecidos pela atividade hidrólise dos glicerofosfolípidos constituintes da membrana das células do hospedeiro (Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009). Análises de atividade da enzima nas mesmas condições de cultivo, bem como a verificação do perfil proteico destes dermatófitos poderão auxiliar no entendimento dos padrões de expressão diferencial entre os fungos antropofílicos e zoofílicos analisados. Os resultados obtidos com a lisofosfolipase sugerem que os fungos possivelmente regulam a transcrição do gene que codifica para esta lisofosfolipase em resposta ao substrato disponível. Análises de expressão da lisofosfolipase em cultivos contendo substratos queratinolíticos de origem humana, como cabelos ou unhas, poderão auxiliar na verificação desta hipótese.

Comparação entre os homólogos da glicosidase (*eglC*)

A parede celular está diretamente envolvida na virulência de fungos, uma vez que medeia processos como a adesão, invasão das hifas no epitélio e interação com o sistema imunológico do hospedeiro, além da função de proteger a célula contra estresses externos. A modulação dinâmica desta estrutura frente a diversas alterações no ambiente contribui da mesma forma para perpetuação da infecção e manutenção do processo infeccioso (Latge, 2007; Shepardson e Cramer, 2013). É uma estrutura rígida, mas permeável, composta tipicamente por quitina, 1,3- β e 1,6- β -glicana, manana e proteínas, em composições variáveis entre diferentes espécies de fungos (Adams, 2004; Gastebois *et al.*, 2009). Beta-1,3-glicana é a principal constituinte estrutural, à qual outros componentes da parede estão ligados covalentemente. Como resultado, a síntese de beta-1,3-glicana é necessária para a correta formação da parede celular e o desenvolvimento normal dos fungos (Bowman *et al.*, 2006; Amarsaikhan *et al.*, 2014).

A capacidade dinâmica da parede dos fungos está relacionada a modificações estruturais das cadeias lineares de glicana, e permitem modificações morfogênicas como a germinação de conídios, emergência do tubo germinativo e a produção de hifas laterais durante o crescimento micelial. Pouco se sabe a respeito da modulação dinâmica da parede celular, mas acredita-se que decorra da atividade de enzimas glicosil hidrolases. Teoricamente, é a clivagem das cadeias longas de β -1,3-glicana o evento responsável pela

ocorrência do amolecimento da parede celular (Adams, 2004; Mouyna *et al.*, 2013). Para o processo de degradação da queratina dura dos hospedeiros, os dermatófitos devem ser capazes de modular a secreção de tais enzimas, que atuam favorecendo o início do processo infeccioso e sua instauração.

β -glicosidases (3.2.1.21) são glicosil hidrolases encontradas em todos os domínios de organismos vivos, e desempenham um papel essencial na hidrólise de ligações glicosídicas liberando resíduos glicosil terminais. β -glicosidases atuam na formação da parede celular em micro-organismos, na conversão de biomassa e na degradação das células do hospedeiro, atuando como fatores associados à virulência (Ketudat Cairns *et al.*, 2010).

O gene que codifica para uma enzima com atividade de glicosidase foi avaliada de forma comparativa entre os dermatófitos, revelando o mesmo número de íntrons e éxons, dispostos em similar organização nos genomas (Figura 33). Os tamanhos dos genes são similares entre os organismos do gênero *Trichophyton*, sendo pouco menor para *M. canis*. As proteínas preditas apresentam quase o mesmo número de aminoácidos, com diferença de um aminoácido em *M. canis* em relação aos organismos do gênero *Trichophyton* avaliados (Tabela 10).

Tabela 10. Número de éxons e íntrons, tamanho do gene e proteína predita, e identificações de famílias para o gene *eglC*.

Espécie	<i>M. canis</i>	<i>T. equinum</i>	<i>T. interdigitale</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. tonsurans</i>
Locus*	MCYG_01527	TEQG_02229	H101_07920	TERG_07959	TESG_05666
Nome	beta-glucosidase 4	glucan 1,3-beta-glucosidase	hypothetical protein	hypothetical protein	17 glycosyl hydrolase
Família	hypothetical protein				
Tamanho do gene	1092 nt	1115 nt	1115 nt	1116 nt	1115 nt
Tamanho da proteína	308 aa	309 aa	309 aa	309 aa	309 aa
Número de éxons	4	4	4	4	4
Número de íntrons	3	3	3	3	3
Família pelo Pfam**	Glycosyl hydrolases family 17				

*ID disponível em www.broadinstitute.org/annotation/genome/dermatophyte_comparative

**disponível em <http://pfam.xfam.org/family>

Figura 33. Representação esquemática do gene *eglC* em dermatófitos. Éxons indicados nas regiões preenchidas, com seus respectivos números de nucleotídeos indicados em azul. Regiões intrônicas nos intervalos, com seus respectivos tamanhos indicados em vermelho. A escala corresponde a 100 bases. Espécies identificadas pelas siglas, seguido do número de identificação do gene nos genomas.

Quanto ao acúmulo de transcritos do gene, em relação a *M. canis* no tempo de 24 horas, utilizado como controle do experimento, observamos que houve significativo acúmulo de transcritos para o dermatófito *T. rubrum* em relação aos demais dermatófitos (Figura 34). Este acúmulo de mRNA é crescente em relação ao tempo de cultivo analisado, chegando a nível 10 vezes maior que o controle no tempo de 96 horas de cultivo, sugerindo atividade aumentada de formação da parede celular neste dermatófito.

T. interdigitale apresenta acúmulo de transcritos quatro vezes maior em relação ao controle do experimento apenas no tempo inicial de cultivo, decaindo a níveis basais nos tempos posteriores. Na linhagem mutante para o fator de transcrição PacC observamos um retardo no decaimento dos níveis de acúmulo, em relação à linhagem selvagem, indicando que a ausência do fator de transcrição possa estar exigindo maior esforço do fungo no período inicial da infecção na atuação de genes com atividade de formação e remodelamento da parede celular em *T. interdigitale*.

Apresentando em seus genomas diversas enzimas com a mesma função hidrolítica, e pela ausência da verificação de atividade enzimática desta β -glicosidase, não nos é possível relacionar o papel específico desta em relação à patogenicidade. Os resultados nos permitem sugerir uma maior importância desta enzima no processo infeccioso de *T. rubrum* comparado aos demais dermatófitos analisados.

O gene *eglC* analisado pertence à família 17 das glicosil hidrolases, que atuam especificamente em ligações β -(1,3)-glicosídicas liberando α -glicose, com atividade de

endoglicosidase (Lafond *et al.*, 2012). Compreendem proteínas ancoradas por glicosilfosfatidilinosositol (GPI), tal como o gene *gell* avaliado anteriormente (Nakajima *et al.*, 2012).

Figura 34. Valores relativos de acúmulo de transcritos (por RT-qPCR) do gene *eglC* obtidos a partir de cultivos em meio contendo água e queratina bovina como fonte nutricional. As análises estatísticas foram realizadas em comparação a *M. canis* no tempo de 24 horas de cultivo. Significância estatística determinada utilizando teste de Bonferroni *ad hoc* e indicadas por asteriscos: * indicando $p < 0.05$; ** indicando $p < 0.01$; *** indicando $p < 0.001$. As análises estatísticas apresentadas abaixo dos gráficos indicam as relações de significância em relação ao tempo de 24 horas por espécie.

Da mesma forma que o gene *eglC*, avaliado por RT-qPCR, *gell* manteve baixos níveis de acúmulo de transcritos nas condições avaliadas, para praticamente todos os dermatófitos avaliados. Tais resultados sugerem uma possível regulação de forma a manter sempre constante os níveis de mRNA para a síntese da proteína com atividade de glicosil hidrolases em dermatófitos.

Comparação entre os homólogos (*chiB1*)

Quitinases são enzimas consideradas importantes para a remodelação da parede celular dos fungos, e a inibição destas tem sido proposta como uma estratégia potencial para o desenvolvimento de novos antifúngicos (Wang *et al.*, 2006; Schuttelkopf *et al.*, 2010; Wagener *et al.*, 2014).

A quitina é um polímero linear de N-acetilglicosamina (GlcNAC), unidas por ligações glicosídicas do tipo β -1,4. É um componente estrutural essencial da parede da célula fúngica, dando-lhe rigidez estrutural e química, bem como estabilidade biológica. Por causa de sua rigidez inerente, os fungos precisam hidrolisar parcialmente a camada de quitina para a divisão celular e morfogênese, o que é realizado por quitinases (E.C. 3.2.1.14) classificadas em duas famílias das glicosil hidrolases, GH18 ou GH19 (Schuttelkopf *et al.*, 2010; Junges *et al.*, 2014). Dependendo dos padrões de clivagem, quitinases são categorizados em exo ou endoquitinases. Endoquitinases são capazes de clivar a cadeia de quitina em posições aleatórias, enquanto as exoquitinases clivam a partir das extremidades do polímero (Horn *et al.*, 2006; Junges *et al.*, 2014).

A relevância de enzimas quitinolíticas em fungos é refletida no número de membros incluídos nesta família de multigenes, que é representada como uma das maiores famílias entre as glicosídeo hidrolases em genomas de fungos. Compreender as funções específicas de cada membro de uma família multigene, bem como comparar genes entre espécies de fungos, fornece informações importantes para a caracterização destas famílias gênicas (Junges *et al.*, 2014).

Em dermatófitos, a atuação de enzimas com atividade de quitinase pode favorecer o início da infecção, facilitando a instauração do fungo no ambiente do hospedeiro. Nos cinco fungos utilizados neste estudo observamos mesmo número de íntrons e éxons, com igual disposição destas sequências, para uma enzima com atividade de quitinase (Figura 35). Ocorre pequena variação no número total de nucleotídeos entre os gêneros *Microsporum* e *Trichophyton*, igual tamanho das proteínas preditas (Tabela 11).

Tabela 11. Número de éxons e íntrons, tamanho do gene e proteína predita, e identificações de famílias para o gene *chiB1*.

Espécie	<i>M. canis</i>	<i>T. equinum</i>	<i>T. interdigitale</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. tonsurans</i>
Locus*	MCYG_00676	TEQG_05542	H101_04759	TERG_00216	TESG_05705
Nome	endochitinase 1	Endochitinase	hypothetical protein	hypothetical protein	chitinase
Família	endochitinase 1				
Tamanho do gene	1598 nt	1591 nt	1591 nt	1589 nt	1591 nt
Tamanho da proteína	402 aa	402 aa	402 aa	402 aa	402 aa
Número de éxons	7	7	7	7	7
Número de íntrons	6	6	6	6	6
Família pelo Pfam**	Glycoside hydrolase family 18				

*ID disponível em www.broadinstitute.org/annotation/genome/dermatophyte_comparative

**disponível em <http://pfam.xfam.org/family>

Figura 35. Representação esquemática do gene *chiB1* em dermatófitos. Éxons indicados nas regiões preenchidas, com seus respectivos números de nucleotídeos indicados em azul. Regiões intrônicas nos intervalos, com seus respectivos tamanhos indicados em vermelho. A escala corresponde a 100 bases. Espécies identificadas pelas siglas, seguido do número de identificação do gene nos genomas.

Na avaliação dos níveis transcricionais dos genes que codificam esta enzima, com atividade de quitinase, observamos, em comparação a *M. canis* no tempo de 24 horas, que ocorre expressivo aumento no acúmulo de transcritos de *chiB1* para *T. interdigitale* e *T. rubrum* (Figura 36).

Figura 36. Valores relativos de acúmulo de transcritos (por RT-qPCR) do gene *chiB1*, obtidos a partir de cultivos em meio contendo água e queratina bovina como fonte nutricional. As análises estatísticas foram realizadas em comparação a *M. canis* no tempo de 24 horas de cultivo. Significância estatística determinada utilizando teste de Bonferroni *ad hoc* e indicadas por asteriscos: * indicando $p < 0.05$; ** indicando $p < 0.01$; *** indicando $p < 0.001$. As análises estatísticas apresentadas abaixo dos gráficos indicam as relações de significância em relação ao tempo de 24 horas por espécie.

No tempo inicial avaliado, *T. rubrum* apresenta níveis 85 vezes maiores e *T. interdigitale*, 112 vezes maiores que o controle. Estes níveis decaem no curso do tempo, mas continuam elevados, sugerindo participação desta quitinase na instauração do processo infeccioso destes dois dermatófitos antropofílicos nas condições analisadas. O terceiro dermatófito antropofílico analisado apresenta padrão de acúmulo de mRNA bem reduzido em relação a *T. rubrum* e *T. interdigitale*, indicando não haver correlação entre o nicho preferencial dos fungos e o acúmulo de transcritos desta quitinase.

A linhagem mutante para o fator de transcrição PacC de *T. interdigitale* apresenta um retardo no início do acúmulo dos transcritos da quitinase. Os níveis de mRNA sobem de pouco mais de 4 vezes a quase 150 vezes mais transcritos em relação ao controle do experimento em 48 horas, momento em que já foi iniciada a redução no acúmulo de transcritos na linhagem selvagem. Em 72 horas, os níveis acumulados entre linhagens selvagem e mutante se igualam.

M. canis apresenta também níveis de transcritos elevados, em torno de 10 vezes, nos tempos de 48 e 72h de cultivo, até que tenha ocorrido a alcalinização do meio de cultivo a pH 8 (em 72 horas). A concentração de mRNA decai em 96 horas, provavelmente em decorrência da estabilização do pH do meio de cultivo em 8, ambiente ótimo para atividade de proteases que atuarão, então, na degradação do substrato disponível. Tal situação sugere que esta quitinase possa estar atuando como uma proteína auxiliar na degradação do substrato, promovendo a instauração da infecção *in vitro*.

Comparação entre os homólogos *ocpB*

Proteases (peptidases, enzimas proteolíticas ou peptídeo hidrolases) são enzimas que catalisam a clivagem de ligações peptídicas (CO-NH) de proteínas, digerindo-as em peptídeos e aminoácidos livres e podem ser endoproteases ou exoproteases.

Os genes que codificam exopeptidases não foram expandidos para formar famílias de genes em dermatófitos. Foi observado no genoma de *T. rubrum* que este secreta, ao menos, duas leucino aminopeptidases, Lap2 e Lap1, duas dipeptidil-peptidases, DppIV e DppV, uma metalocarboxipeptidase (McpA) e duas serino carboxipeptidases da família S10, ScpA e ScpB, que são proteínas glicofosfatidilinositol ancoradas (Monod, 2008; Zaugg *et al.*, 2008). Estas proteínas atuam sobre cadeias peptídicas longas, sobre as quais já atuaram endopeptidases, liberando então pequenos peptídeos e aminoácidos livres, substratos para os transportadores de membrana (Monod, 2008).

Serino carboxipeptidases catalisam a hidrólise de ligações peptídicas na porção C-terminal de proteínas e peptídeos sob condições ácidas, e apresentam uma tríade catalítica consistindo de três aminoácidos essenciais, serina, aspartato e histidina (Breddam, 1986; Parussini *et al.*, 2003).

A análise do gene *ocpB*, que codifica uma serino carboxipeptidase da família S10 entre os cinco dermatófitos utilizados neste estudo revelou que o tamanho dos genes e proteínas preditas é similar (Tabela 12 e Figura 37).

Tabela 12. Número de éxons e íntrons, tamanho do gene e proteína predita, e identificações de famílias para o gene *ocpB*.

Espécie	<i>M. canis</i>	<i>T. equinum</i>	<i>T. interdigitale</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. tonsurans</i>
Locus*	MCYG_02825	TEQG_04191	H101_05478	TERG_08557	TESG_01852
Nome	carboxypeptidase S1	carboxypeptidase S1	hypothetical protein	hypothetical protein	serine carboxypeptidase
Família	carboxypeptidase S1				
Tamanho do gene	2117 nt	2106 nt	1935 nt	2106 nt	2106 nt
Tamanho da proteína	660 aa	663 aa	663 aa	663 aa	606 aa
Número de éxons	3	3	3	3	3
Número de íntrons	2	2	2	2	2
Família pelo Pfam**	Peptidase_S10 - Serine carboxypeptidase				

*ID disponível em www.broadinstitute.org/annotation/genome/dermatophyte_comparative

**disponível em <http://pfam.xfam.org/family>

Figura 37. Representação esquemática do gene *ocpB* em dermatófitos. Éxons indicados nas regiões preenchidas, com seus respectivos números de nucleotídeos indicados em azul. Regiões intrônicas nos intervalos, com seus respectivos tamanhos indicados em vermelho. A escala corresponde a 100 bases. Espécies identificadas pelas siglas, seguido do número de identificação do gene nos genomas.

Por PCR em tempo real verificamos, em relação ao cultivo de 24 horas de *M. canis*, o acúmulo transcricional desta serino carboxipeptidase (Figura 38). Observamos elevados

níveis de acúmulo de transcritos deste gene em pelo menos um dos tempos de cultivo analisados, para todos os dermatófitos.

Figura 38. Valores relativos de acúmulo de transcritos (por RT-qPCR) do gene que codifica para uma carboxipeptidase, obtidos a partir de cultivos em meio contendo água e queratina bovina como fonte nutricional. As análises estatísticas foram realizadas em comparação a *M. canis* no tempo de 24 horas de cultivo. Significância estatística determinada utilizando teste de Bonferroni *ad hoc* e indicadas por asteriscos: * indicando $p < 0.05$; ** indicando $p < 0.01$; *** indicando $p < 0.001$. As análises estatísticas apresentadas abaixo dos gráficos indicam as relações de significância em relação ao tempo de 24 horas por espécie.

T. tonsurans apresenta baixos níveis de acúmulo de mRNA nos tempos iniciais de cultivo, apresentando em 72 horas um aumento de 3 vezes em relação ao controle experimental. Este acúmulo sugere atividade aumentada de exopeptidase ao início da alcalinização do meio. Trata-se de uma enzima essencial para o desenvolvimento de dermatófitos queratinolíticos, e a atividade de exopeptidase aumentada apenas em 72 horas sugerem que é a alteração do pH do meio de cultura que determina a necessidade de acúmulo deste mRNA em *T. tonsurans*.

Diferente de *T. tonsurans*, os outros dois dermatófitos antropofílicos em estudo, *T. rubrum* e *T. interdigitale*, apresentam nas condições analisadas elevadas quantidades da carboxipeptidase acumulada, no curso dos tempos analisados, com singular aumento de 117 vezes em relação ao controle para *T. rubrum* em 24 horas de crescimento, e aumento de cerca de 25 vezes para *T. interdigitale* em todas as condições de cultivo analisadas. O padrão de

acúmulo de mRNA da carboxipeptidase avaliada observado na linhagem $\Delta pacC$ indica que a atividade desta enzima ocorre independente de regulação de PacC.

T. rubrum diminui o nível de mRNA acumulado drasticamente após 72 horas de cultivo, indicando uma relação inversa entre a atividade de exopeptidase e a alcalinização do meio de cultura, ambiente ótimo para atividade de proteases. O aumento no consumo do substrato queratinolítico disponível e reduzido acúmulo de mRNA sugerem a ocorrência do consumo do mRNA acumulado nos tempos iniciais de cultivo neste momento, de elevada atividade queratinolítica.

Além de *T. tonsurans*, tanto *M. canis* quanto *T. equinum*, zoofílicos, apresentam menor acúmulo de transcritos da carboxipeptidase analisada, sugerindo a necessidade de menor quantidade de mRNA nas condições de cultivo avaliadas, em substrato de origem animal. Também outras exoproteases podem estar atuando no início do processo infeccioso nestes dermatófitos.

Comparação entre os homólogos *cdol* que codifica uma cisteína dioxigenase e homólogos *ssuI*, que codificam para bomba efluxo de sulfito

A digestão proteolítica de queratina dura não é possível até que sua estrutura fique enfraquecida pela redução das pontes de dissulfeto que a compõem, permitindo então o início da atividade de degradação do substrato (Vermout *et al.*, 2008; Grumbt *et al.*, 2013). A secreção do agente redutor sulfito auxilia na degradação de queratina ao clivar diretamente as ligações estabilizadoras de cisteína presentes na queratina, propiciando a atuação das enzimas com atividade proteolítica, e resultando na liberação de oligopeptídeos e aminoácidos para o desenvolvimento dos fungos. (Lechenne *et al.*, 2007; Grumbt *et al.*, 2013).

Durante a degradação de queratina, foi demonstrado em dermatófitos e outros fungos filamentosos a capacidade de conversão dos elevados níveis de cistina em cisteína e S-sulfocisteína pela secreção de sulfito inorgânico, em conjunto com a produção de sulfato como produto final do metabolismo da cisteína (em um processo denominado sulfitólise). Esta conversão diminui as concentrações de cisteína, que são tóxicas a homens e micro-organismos (Kunert, 1972; 2000; Grumbt *et al.*, 2013; Hennicke *et al.*, 2013).

Em humanos, o sulfito é produzido como um intermediário durante o catabolismo oxidativo da cisteína, regulado pela enzima cisteína dioxigenase Cdo1. Um gene homólogo a *cdol* foi recentemente identificado em *A. benhamiae*, e apresenta a capacidade de produzir

sulfito a partir de cisteína disponível no ambiente (Kasperova *et al.*, 2011; Grumbt *et al.*, 2013).

O sulfito é oxidado a sulfato, não tóxico em seres humanos. Em dermatófitos, a excreção de sulfito é promovido pelo gene *ssu1*, uma bomba de efluxo que atua diminuindo as altas concentrações da molécula tóxica, permitindo o desenvolvimento do fungo (Lechenne *et al.*, 2007; Grumbt *et al.*, 2013).

Linhagens mutantes para $\Delta cdo1$ e $\Delta ssu1$ obtidas com o dermatófito *A. benhamiae* apresentam elevada sensibilidade à presença de cisteína. O mutante *ssu1* é especificamente sensível a sulfito. Estes dois genes são fundamentais para a infecção em estruturas queratinizadas, atuando na formação de sulfito para a degradação da queratina, e aumentando a tolerância à cisteína. Mais notavelmente, mutantes para *cdo1* e *ssu1* apresentaram reduzido desenvolvimento especificamente em cabelo e unhas indicando, *in vitro*, implicações destes dois genes na patogênese (Grumbt *et al.*, 2013; Hennicke *et al.*, 2013).

Foi feita uma análise comparativa entre os genes *cdo1* e *ssu1* nos cinco dermatófitos utilizados neste estudo. O gene *cdo1* e a proteína CDO1 tem tamanho similar entre os dermatófitos, com exceção de *T. interdigitale*. Este tamanho menor reflete em menor quantidade de íntrons e éxons nesta espécie (Tabela 13), sugerindo a ocorrência de erro na anotação de *cdo1* (Figura 39).

Tabela 13. Número de éxons e íntrons, tamanho do gene e proteína predita, e identificações de famílias para o gene *cdo1*.

Espécie	<i>M. canis</i>	<i>T. equinum</i>	<i>T. interdigitale</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. tonsurans</i>
Locus*	MCYG_00905	TEQG_01460	H101_08051	TERG_00456	TESG_02360
Nome	cysteine dioxygenase	cysteine dioxygenase	cysteine dioxygenase	hypothetical protein	cysteine dioxygenase
Família	cysteine dioxygenase				
Tamanho do gene	967 nt	1060 nt	532 nt	1098 nt	1060 nt
Tamanho da proteína	220 aa	220 aa	120 aa	220 aa	220 aa
Número de éxons	5	5	2	5 [†]	5
Número de íntrons	4	4	1	4 [†]	4
Família pelo Pfam**	CDO_I - Cysteine dioxygenase type I				

[†]é possível observar 3 diferentes isoformas putativas para o referido gene em www.broadinstitute.org/annotation/genome/dermatophyte_comparative/GeneDetails.html. Indicada a isoforma apresentando maior número de introns e éxons.

*ID disponível em www.broadinstitute.org/annotation/genome/dermatophyte_comparative

**disponível em <http://pfam.xfam.org/family>

Figura 39. Representação esquemática do gene que codifica para uma cisteína dioxigenase em dermatófitos. Éxons indicados nas regiões preenchidas, com seus respectivos números de nucleotídeos indicados em azul. Regiões intrônicas nos intervalos, com seus respectivos tamanhos indicados em vermelho. A escala corresponde a 100 bases. Espécies identificadas pelas siglas, seguido do número de identificação do gene nos genomas.

Os níveis de acúmulo de transcritos deste gene entre os cinco dermatófitos, em comparação a *M. canis* no tempo de 24 horas de cultivo, mostrou que as duas espécies zoofílicas mantêm níveis de mRNA de *cdo1* inferiores ao do tempo controle, nos períodos avaliados, com reduzido acúmulo de transcritos (Figura 40).

Entre os dermatófitos antropofílicos, *T. tonsurans* apresenta algum acúmulo em 24 horas, e concentrações de mRNA reduzidas em relação ao controle nos tempos subsequentes. Os demais fungos antropofílicos apresentam um aumento significativo nos transcritos *cdo1* principalmente nos tempos iniciais de cultivo. A disrupção do gene *pacC* no dermatófito *T. interdigitale* reduz à metade os níveis de acúmulo de transcritos de *cdo1* nas condições testadas indicando que o fator de transcrição PacC regula positivamente o acúmulo transcricional deste gene.

Foi descrito por Grumbt *et al.*, (2013), pela análise *in vitro* em dermatófitos, ser razoável postular que exista cisteína livre suficiente na queratina para iniciar o mecanismo de degradação de queratina por secreção de sulfito. A metabolização desta cisteína livre pode promover o acúmulo de transcritos de *cdo1* no tempo inicial de cultivo, conforme observado também em nossos experimentos.

Figura 40. Valores relativos de acúmulo de transcritos (por RT-qPCR) do gene *cdo1* obtidos a partir de cultivos em meio água contendo queratina bovina como fonte nutricional. As análises estatísticas foram realizadas em comparação a *M. canis* no tempo de 24 horas de cultivo. Significância estatística determinada utilizando teste de Bonferroni *ad hoc* e indicadas por asteriscos: * indicando $p < 0.05$; ** indicando $p < 0.01$; *** indicando $p < 0.001$. As análises estatísticas apresentadas abaixo dos gráficos indicam as relações de significância em relação ao tempo de 24 horas por espécie.

O segundo gene envolvido na degradação da queratina dura, *ssu1*, codifica uma bomba de efluxo de sulfito SSU1. Sulfito é também formado como resultado da metabolização de cisteína por ação da enzima CDO1 e, uma vez secretado, atua na degradação da queratina (Lechenne *et al.*, 2007; Grumbt *et al.*, 2013). Entre os dermatófitos, o gene *ssu1* e a proteína predita apresentam similaridade de tamanhos (Figura 41) e mesmo número de éxons e íntrons identificados nos genomas (Tabela 14).

Tabela 14. Número de éxons e íntrons, tamanho do gene e proteína predita e identificações de famílias para o gene *ssu1*.

Espécie	<i>M. canis</i>	<i>T. equinum</i>	<i>T. interdigitale</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. tonsurans</i>
Locus*	MCYG_08415	TEQG_01770	H101_04808	TERG_02694	TESG_02066
Nome	sulphite efflux pump protein	sulphite efflux pump protein	sulfite efflux pump SSU1	sulfite efflux pump SSU1	sulphite efflux pump protein
Família	sulfite efflux pump SSU1				
Tamanho do gene	1386 nt	1389 nt	1389 nt	1410 nt	1389 nt
Tamanho da proteína	462 aa	463 aa	463 aa	470 aa	463 aa
Número de éxons	5	5	5	5 [†]	5
Número de íntrons	4	4	4	4 [†]	4
Família pelo Pfam**	SLAC1 - Voltage-dependent anion channel				

[†]é possível observar 5 diferentes isoformas putativas para o referido gene. Indicada a isoforma apresentando maior número de introns e éxons.

*ID disponível em www.broadinstitute.org/annotation/genome/dermatophyte_comparative

**disponível em <http://pfam.xfam.org/family>

Figura 41. Representação esquemática do gene que codifica para uma bomba de efluxo de sulfito em dermatófitos. Éxons indicados nas regiões preenchidas, com seus respectivos números de nucleotídeos indicados em azul. Regiões intrônicas nos intervalos, com seus respectivos tamanhos indicados em vermelho. A escala corresponde a 100 bases. Espécies identificadas pelas siglas, seguido do número de identificação do gene nos genomas.

Pela análise do acúmulo de mRNA do gene *ssu1* de forma comparativa entre os dermatófitos, utilizando o tempo de 24 horas de cultivo de *T. tonsurans* como controle, observamos significativo acúmulo de *ssu1* em *T. rubrum*, sugerindo maior excreção de sulfito e, por conseguinte, elevada atividade de redução das pontes dissulfeto (Figura 42). A maior capacidade infectante de *T. rubrum* em humanos pode decorrer desta atividade aumentada, permitindo posterior maior facilidade de atuação das enzimas proteolíticas.

A linhagem mutante para o fator de transcrição PacC apresenta redução no acúmulo de transcritos de *ssu1* nos tempos iniciais avaliados, em relação à linhagem selvagem, sugerindo que o PacC tenha um efeito positivo no controle da transcrição deste gene.

Os níveis aumentados de acúmulo de *ssu1* acontecem, nos cinco dermatófitos em análise, nos tempos iniciais de cultivo, entre 24 e 48 horas, momento inicial do processo de agregação do fungo ao substrato, resultando em maior atividade de redução das pontes dissulfeto no início do processo de agregação os fungos ao substrato.

Estudos com *S. cerevisiae* indicam que *ssu1* é constitutivamente expresso, em níveis de acúmulo de transcritos que variam de acordo com o ambiente de crescimento das linhagens analisadas (Nardi *et al.*, 2010). Cultivos em diferentes meios contendo substratos proteicos poderão igualmente auxiliar na elucidação dos mecanismos utilizados pelas bombas de efluxo de sulfito em dermatófitos.

Figura 42. Valores relativos de acúmulo de transcritos (por RT-qPCR) do gene *ssu1* obtidos a partir de cultivos em meio contendo água e queratina bovina como fonte nutricional. As análises estatísticas foram realizadas em comparação a *M. canis* no tempo de 24 horas de cultivo. Significância estatística determinada utilizando teste de Bonferroni *ad hoc* e indicadas por asteriscos: * indicando $p < 0.05$; ** indicando $p < 0.01$; *** indicando $p < 0.001$. As análises estatísticas apresentadas abaixo dos gráficos indicam as relações de significância em relação ao tempo de 24 horas por espécie.

É evidente nos genomas analisados um alto grau de conservação entre as suas sequências (anexo A). As análises de distância filogenética sempre apresentam clados bem diferenciados, com significativa distância entre os dermatófitos em relação aos grupos externos utilizados. A análise global identificou íntima relação entre as sequências genômicas, entre os dermatófitos, sugerindo que é recente a ocorrência de especiação em relação ao um ancestral comum, havendo maior distanciamento filogenético entre as espécies do gênero *Trichophyton* avaliadas, da espécie do gênero *Microsporum* (Martinez *et al.*, 2012).

Como observado pelos resultados obtidos no presente trabalho, as relações de similaridade de sequências genômicas não estão refletidas nos padrões de expressão dos genes em análise, nas condições ensaiadas. Também não se observa na, maioria dos casos, correlação direta entre o nicho preferencial dos dermatófitos e os níveis transcricionais frente ao substrato utilizado, de origem animal. Para o gene *lpl*, pelo acúmulo elevado de transcritos entre os dermatófitos antropofílicos, sugerimos a ocorrência desta correlação.

Gel1 e *pacC* apresentam maior acúmulo de transcritos em *M. canis* nas condições ensaiadas, sugerindo nossos resultados que possa haver, para estes dois genes, diferenças no

acúmulo de transcritos relacionadas ao gênero dos dermatófitos analisados. O acúmulo de transcritos aumentado de *ureD* entre as espécies do gênero *Trichophyton* também sugerem haver relação na atividade ureolítica relacionada à gênero entre os dermatófitos analisados, nas condições ensaiadas.

Sob uma visão geral, verificamos que os genes que codificam para proteínas relacionadas à formação de parede celular e degradação de componentes estruturais do hospedeiro apresentam maior acúmulo de mRNA nas condições avaliadas entre os dermatófitos antropofílicos. O acúmulo da quitinase, urease, carboxipeptidase, lisofosfolipase, cisteína dioxigenase e β -glicosidase sugerem uma resposta específica dos fungos frente ao substrato selecionado, de origem animal.

Estes resultados indicam grande necessidade destas proteínas estruturais no período inicial da infecção por dermatófitos. As atividades simultâneas de formação e remodelamento das estruturas dos fungos, somadas à atividade de degradação e metabolização das estruturas do ambiente do hospedeiro sugerem que os dermatófitos tendem a acumular transcritos de forma a garantir a perpetuação da infecção, mesmo nas condições adversas do início da infecção.

Os fungos *T. rubrum* e *T. interdigitale*, descritos como os de maior incidência em infecções em humanos, apresentam aumentado acúmulo de mRNA tanto para os genes de remodelamento da parede celular (*lpl*, *eglB*, *chiB1*), de afrouxamento das estruturas queratinizadas do hospedeiro (*cdo1* e *ssu1*) e de metabolização do substrato queratinolítico (*ocpB*), o que sugere um indício de capacidade aumentada de infecção no ambiente testado.

T. tonsurans apresenta aumento significativo no acúmulo de transcritos no tempo de 72 horas de cultivo para os genes *pacC*, *ocpB*, *chiB1* e *lpl*, sugerindo que em resposta à alcalinização do ambiente, o fungo requiera grande aporte nutricional ativando a quebra do substrato queratinolítico e mantendo os níveis de PacC elevado.

O acúmulo de transcritos dos genes *eglC*, *chiB1*, *ocpB*, *sub3* e *ssu*, relacionados com a função de metabolização do substrato apresenta, na espécie *T. tonsurans*, nos tempos de cultivo propostos, níveis mais baixos em relação às demais espécies avaliadas. Essa quantidade de transcritos pode incorrer em menor atividade de metabolização do substrato disponível, o que poderia auxiliar na compreensão do desenvolvimento mais lento desta espécie em meio de cultivo contendo queratina como fonte de carbono.

A deleção do fator de transcrição PacC em *T. interdigitale* parece exercer influência no período inicial da infecção na atuação de genes com atividade de formação e

remodelamento da parede celular em *T. interdigitale*, estando relacionado também ao processo de adesão do fungo, ao induzir maior necessidade de acúmulo de *sub3* ou *eglC* quando da ausência de *pacC*.

Análises das atividades enzimáticas, bem como estudos em nível proteico irão auxiliar na elucidação dos mecanismos utilizados por estes fungos no processo de instauração e perpetuação da infecção.

Estudos funcionais nos genomas de dermatófitos também auxiliariam no entendimento dos mecanismos utilizados pelos fungos, mas são tarefa desafiadora, dificultada pela baixa frequência de transformação (Gonzalez *et al.*, 1989; Yamada *et al.*, 2005) e relativamente ineficiente recombinação homóloga, tal como observado em outros fungos filamentosos (Ruiz-Diez, 2002; Yamada *et al.*, 2005). Apesar desses obstáculos, já se obteve linhagens mutantes para alguns genes em dermatófitos, o que complementa grandemente os estudos em nível molecular (Fachin *et al.*, 2006; Ferreira-Nozawa *et al.*, 2006; Grumbt *et al.*, 2013).

Novas ferramentas genéticas vêm permitindo uma investigação funcional mais rápida e de alto rendimento em dermatófitos, bem como a identificação de novos fatores de virulência, auxiliando no estudo das relações destes patógenos com seus hospedeiros (Vermout *et al.*, 2008).

6.2 Análise comparativa de expressão gênica em dermatófitos em resposta a agentes antifúngicos

Uma das grandes dificuldades no tratamento das dermatofitoses é a reduzida opção de antifúngicos disponíveis comercialmente e o fato de tais drogas atuarem praticamente sobre os mesmos alvos celulares. Assim sendo, há necessidade de se descobrir novos alvos terapêuticos, para o posterior desenvolvimento de fármacos com atividade antifúngica (Jo Siu *et al.*, 2013). O conhecimento da biologia dos fungos patogênicos e dos mecanismos utilizados por eles durante a colonização e invasão do tecido hospedeiro, assim como o entendimento dos mecanismos moleculares de evasão à ação de drogas são essenciais para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas eficazes.

Os fungos podem desenvolver resistência às drogas citotóxicas por mecanismos específicos e mutações pontuais. Não obstante, os fungos também podem se tornar resistentes a múltiplas drogas, não estruturalmente relacionadas, com diferentes modos de ação, por transporte ativo destes compostos para fora da célula. O transporte das moléculas resulta na diminuição das concentrações intracelulares destas, tornando-as, assim, insuficientes para a inibição dos alvos celulares.

Não obstante, os fungos também podem se tornar resistentes a múltiplas drogas, não estruturalmente relacionadas, com diferentes modos de ação, por transporte ativo destes compostos para fora da célula. O transporte das moléculas resulta na diminuição das concentrações intracelulares destas, tornando-as, assim, insuficientes para a inibição dos alvos celulares.

Transportadores do tipo ABC estão envolvidos na regulação do meio intracelular em diferentes processos tais como a absorção de nutrientes, patogênese e no efluxo de substâncias tóxicas. Eles agem de forma eficaz no efluxo de drogas, diminuindo o acúmulo de agentes citotóxicos no meio intracelular, e desempenhando um papel importante nos mecanismos de resistência a drogas (Higgins, 1992; Maranhão *et al.*, 2009; Morschhauser, 2010). A super-expressão destes transportadores pode ter efeitos pleiotrópicos, o que resulta em resistência simultânea a vários compostos quimicamente não relacionados, um fenômeno descrito como resistência a múltiplas drogas (Stergiopoulos *et al.*, 2003).

Estruturalmente os transportadores do tipo ABC apresentam uma região denominada domínio de ligação a nucleotídeo citoplasmático (*cytoplasmic nucleotide-binding domains* - NBD), também denominados domínio ABC, responsável pela hidrólise do ATP, liberando a energia necessária para o efetivo transporte de substâncias. Essa região de ligação ao ATP, contendo aproximadamente 90-110 aminoácidos, inclui dois consensos denominados “Walker” (regiões A e B), uma região de ligação entre estes dois consensos Walker (também denominada região C ou *assinatura ABC*), e algumas regiões adicionais de homologia *upstream* e *downstream* em relação aos domínios Walker A e B (Higgins, 1992). Os domínios ABC são bem conservados entre os organismos e estão normalmente associados a domínios transmembrana (*transmembrane domains* - TMD), regiões menos conservadas constituídas por seis hélices transmembrana, responsáveis por reconhecer e mediar a passagem dos substratos (Gottesman *et al.*, 2001; Locher, 2004; Hollenstein *et al.*, 2007).

A análise do perfil de expressão destes genes, cuja atuação não está ainda inteiramente elucidada, pode contribuir para o entendimento dos mecanismos de resistência de fungos a

drogas podendo, posteriormente, ser utilizados como alvos para novos fármacos com ação antifúngica (Gulshan e Moye-Rowley, 2007).

Três genes da família dos transportadores de xenobióticos *mdr1*, *mdr2* e *mdr4* foram identificados no genoma de *T. rubrum* e suas seqüências foram analisadas de forma comparativa nos genomas dos outros quatro dermatófitos utilizados neste trabalho. Foram analisados quanto a regiões codantes e não codantes, similaridade de seqüências e regiões consenso, com o intuito de identificar relações e diferenças estruturais.

Foi observado elevado grau de conservação de seqüências de aminoácidos e nucleotídeos para cada um destes genes entre as espécies analisadas, com especial grau de paridade entre as espécies *T. equinum* e *T. tonsurans*. Todos os dados foram obtidos pelas ferramentas disponíveis no site do Broad Institute.

Para o gene *mdr1*, as espécies de *Trichophyton* apresentam cinco regiões intrônicas. *M. canis* apresenta um íntron a menos em relação aos demais dermatófitos analisados, sendo que o primeiro íntron apresenta tamanho significativamente maior em relação aos organismos do gênero *Trichophyton* (Tabela 15 e Figura 43). No entanto, o tamanho dos genes e das proteínas preditas entre os cinco dermatófitos é muito similar.

Tabela 15. Número de éxons e íntrons, tamanho do gene e proteína predita e identificações de famílias para o gene *mdr1*.

Espécie	<i>M. canis</i>	<i>T. equinum</i>	<i>T. interdigitale</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. tonsurans</i>
Locus*	MCYG_08227	TEQG_01571	H101_00538	TERG_02508	TESG_01875
Nome	ABC transporter	ABC transporter	hypothetical protein	hypothetical protein	ABC transporter
Família	ABC transporter				
Tamanho do gene	4960 nt	4979 nt	4979 nt	4978 nt	4979 nt
Tamanho da proteína	1560 aa	1568 aa	1568 aa	1568 aa	1568 aa
Número de éxons	5	6	6	6	6
Número de íntrons	4	5	5	5	5
Família pelo Pfam**	ABC_tran - ABC transporter				

*ID disponível em www.broadinstitute.org/annotation/genome/dermatophyte_comparative

**disponível em <http://pfam.xfam.org/family>

Figura 43. Representação esquemática do gene que codifica para uma proteína MDR1 em dermatófitos. Éxons indicados nas regiões preenchidas, com seus respectivos números de nucleotídeos indicados em azul. Regiões intrônicas nos intervalos, com seus respectivos tamanhos indicados em vermelho. A escala corresponde a 100 bases. Espécies identificadas pelas siglas, seguido do número de identificação do gene nos genomas.

O gene *mdr2* apresenta único íntron, de igual tamanho e sequência nucleotídica entre os genomas das espécies do gênero *Trichophyton* (Figura 44 e Tabela 16). O íntron adicional, observado no genoma de *T. equinum*, tem 244 bases, sendo que destas, 171 correspondem a uma sequência de baixa qualidade, indicando que esta diferença seja devido a uma baixa qualidade do sequenciamento. As proteínas preditas, com exceção de *T. equinum*, conservam o mesmo tamanho entre os dermatófitos. A localização do íntron também está conservada entre os organismos.

Tabela 16. Número de éxons e íntrons, tamanho do gene e da proteína predita e identificações de famílias para o gene *mdr2*.

Espécie	<i>M. canis</i>	<i>T. equinum</i>	<i>T. interdigitale</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. tonsurans</i>
Locus*	MCYG_01745	TEQG_03450	H101_02705	TERG_08613	TESG_00664
Nome	leptomycin B resistance protein pmd1	ABC multidrug transporter mdr1	hypothetical protein	hypothetical protein	multidrug resistance protein
Família	multidrug resistance protein				
Tamanho do gene	4055 nt	4004 nt	4048 nt	4048 nt	4048 nt
Tamanho da proteína	1332 aa	1236 aa	1332 aa	1332 aa	1332 aa
Número de éxons	2	3	2	2	2
Número de íntrons	1	2	1	1	1
Família pelo Pfam**	ABC_tran - ABC transporter				

*ID disponível em www.broadinstitute.org/annotation/genome/dermatophyte_comparative

**disponível em <http://pfam.xfam.org/family>

Figura 44. Representação esquemática do gene que codifica para uma proteína MDR2 em dermatófitos. Éxons indicados nas regiões preenchidas, com seus respectivos números de nucleotídeos indicados em azul. Regiões intrônicas nos intervalos, com seus respectivos tamanhos indicados em vermelho. A escala corresponde a 100 bases. Espécies identificadas pelas siglas, seguido do número de identificação do gene nos genomas.

O gene *mdr4* de *M. canis* (Tabela 17), revelou-se um pouco maior em relação aos organismos do gênero *Trichophyton*, e também apresenta uma proteína predita de maior tamanho. Este gene apresenta dois íntrons nos cinco dermatófitos em estudo, com significativo grau de conservação em tamanho e sequência, e um terceiro íntron apenas no genoma de *T. tonsurans* (Figura 45), talvez por isto sua proteína predita seja menor que os outros dermatófitos do gênero *Trichophyton*.

Tabela 17. Número de éxons e íntrons, tamanho do gene e da proteína predita e identificações de famílias para o gene *mdr4*.

Espécie	<i>M. canis</i>	<i>T. equinum</i>	<i>T. interdigitale</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. tonsurans</i>
Locus*	MCYG_01685	TEQG_08364	H101_05743	TERG_07801	TESG_00713
Nome	multidrug resistance protein 1	multidrug resistance protein 1	hypothetical protein	ABC multidrug transporter Mdr4	ABC multidrug transporter SitT
Família	multidrug resistance protein				
Tamanho do gene	4266 nt	4250 nt	4250 nt	4249 nt	4251 nt
Tamanho da proteína	1385 aa	1380 aa	1380 aa	1380 aa	1364 aa
Número de éxons	3	3	3	3	4
Número de íntrons	2	2	2	2	3
Família pelo Pfam**	ABC_tran - ABC transporter				

*ID disponível em www.broadinstitute.org/annotation/genome/dermatophyte_comparative

**disponível em <http://pfam.xfam.org/family>

Figura 45. Representação esquemática do gene que codifica para uma proteína MDR4 em dermatófitos. Éxons indicados nas regiões preenchidas, com seus respectivos números de nucleotídeos indicados em azul. Regiões intrônicas nos intervalos, com seus respectivos tamanhos indicados em vermelho. A escala corresponde a 100 bases. Espécies identificadas pelas siglas, seguido do número de identificação do gene nos genomas.

Por análise de distância filogenética dos três genes, *mdr1*, *mdr2* e *mdr4*, observamos grande proximidade entre os organismos do gênero *Trichophyton*, com maior distância em relação a *M. canis*, e significativa distância entre os organismos utilizados como grupos externos, pertencentes à mesma ordem *Onygenales* (anexo A).

Os domínios da proteína MDR1 estão organizados, no genoma dos cinco dermatófitos, na topologia (NBD-TMF₆)₂. MDR2 e MDR4 estão organizadas de forma diferente em todos os organismos, apresentando um domínio transmembrana antes da primeira região de ligação ao ATP, com topologia (TMF₆-NBD)₂. Os domínios transmembrana foram preditos com auxílio dos programas TM finder (Deber *et al.*, 2001) e HHMMTOP (Tusnady e Simon, 2001).

Uma exceção a essa topologia foi observada na sequência da proteína MDR4 de *T. tonsurans*, que não apresenta o quarto domínio transmembrana da porção C-terminal completo (Figura 46). A presença da sequência inicial e final deste domínio, e as características de conservação entre os genomas sugerem um provável erro no sequenciamento ou na predição de íntron nesta região em *T. tonsurans*.

830   840   850   860   870   880   890   900   910   920

TERG_07801   GLLFFILAIVKFAAIVVNGAAGWAAEKTLYRTRVLSLSLLRQPLEWHNADGRTPGLLVALVTSASALSSLTGTTIGVLFSTVANLFAGVILS

TEQG_08364   GLLFFILAIVKFAAIVVNGAAGWAAEKTLYRTRVLSLSLLRQPLEWHNADGRTPGLLVALVTSASALSSLTGTTIGVLFSTVANLFAGVILS

TESG_00713   GLLFFILAIVKFAAIVVNGAAGWAAEKTLYRTRVLSLSLLRQPLEWHNADGRTPGLLVALVTSASALSSLTGTTIGVLFSTVANLFAGVILS

MCYG_01685   GLLFFVLAIVKFAAIVVNGAAGWAAEKTLYRTRVLSLSLLRQPLEWHNADGRTPGLLIAVTSASALSSLTGTTIGVLFSTVANLFAGVILS

H101_05743   GLLFFILAIVKFAAIVVNGAAGWAAEKTLYRTRVLSLSLLRQPLEWHNADGRTPGLLVALVTSASALSSLTGTTIGVLFSTVANLFAGVILS

Figura 46. Parte do alinhamento dos ortólogos da proteína MDR4 indicando, sublinhadas, regiões transmembrana. *T. tonsurans* (TESS_00713) apresenta um gap em região conservada, sugerindo falha no sequenciamento. *T. interdigitale* (H101_05743), *T. equinum* (TEQG_08364), *T. rubrum* (TERG_07801) e *M. canis* (MCYG_01685).

Da mesma forma, na proteína MDR2 de *T. equinum*, foi observada a ausência da região Walker A da porção N-terminal. Por ser uma região consenso altamente conservada entre diferentes espécies e, como observado no alinhamento da Figura 47, absolutamente conservada entre as espécies de dermatófitos utilizadas neste estudo, pode-se sugerir que a ausência se deve, igualmente, a um erro no sequenciamento desta porção do genoma.

Figura 47. Parte do alinhamento dos ortólogos da proteína MDR2 indicando, sublinhadas, regiões transmembrana. *T. equinum* (TEQG_03450) apresenta um gap em região conservada, sugerindo falha no sequenciamento. *T. interdigitale* (H101_02705), *T. tonsurans* (TESS_00664), *T. rubrum* (TERG_08613) e *M. canis* (MCYG_01745). Com asteriscos, regiões consenso nos genomas.

As regiões consenso das proteínas MDR1 e MDR2 não apresentam trocas de aminoácidos, permanecendo absolutamente conservadas entre as espécies em estudo. As sequências das proteínas MDR4 permanecem conservadas entre as espécies de *Trichophyton*, mas apresentam duas modificações em *M. canis*, em dois consensos da porção N-terminal: uma alteração de uma Valina para uma Isoleucina no Walker A e uma modificação de uma Valina para uma Leucina no Walker B. As substituições ocorreram entre aminoácidos com características físico-químicas semelhantes, conservando características apolares, o que aumenta a probabilidade de serem seletivamente neutras. Portanto, é evidente nos genomas

analisados o alto grau de conservação das sequências destes genes *mdr*, o que ocorre devido a um pequeno índice de seleção e especiação nestes organismos.

Analizamos a expressão dos genes *mdr1*, *mdr2* e *mdr4* nos dermatófitos do gênero *Trichophyton*, antes e após a exposição a agentes citotóxicos, visando elucidar questões referentes à suscetibilidade de cada espécie, e possíveis mecanismos de resistência a tais drogas.

Na Figura 48 observamos o nível de acúmulo de transcritos do gene *mdr1* entre as espécies analisadas. Os padrões observados entre os dermatófitos são muito diferentes em relação à exposição às quatro drogas utilizadas neste estudo. O aumento no acúmulo de transcritos quando da exposição à anfotericina B em *T. rubrum*, em resposta imediata à presença da droga (15 minutos), e que perdura até o tempo de 60 minutos de exposição, corrobora com dados de estudos que indicam atividade desta droga contra *T. rubrum* (Fernandez-Torres *et al.*, 2001; Coelho *et al.*, 2008).

Figura 48. Níveis de acúmulo de transcritos do gene *mdr1* por RT-qPCR. Acúmulo de mRNA avaliado após exposição a meio RPMI (controle) ou meio RPMI contendo concentrações subinibitórias de anfotericina B (AMB), griseofulvina (GRS), itraconazol (ITRA) ou terbinafina (TRB), por 15 ou 60 minutos de exposição. Níveis de acúmulo de transcritos representado por *fold change* em relação ao experimento controle (sem droga) de *T. interdigitale*. Barras nas colunas representam o desvio padrão de três experimentos independentes. A significância estatística foi avaliada pelo teste Bonferroni *ad hoc* e indicadas por asteriscos: * indica p < 0,05; ** indica p < 0,01; *** indica p < 0,001. Análises estatísticas indicadas acima das colunas correlacionam o

experimento controle de *T. interdigitale* em comparação às demais condições experimentais. Análises estatísticas indicadas abaixo dos gráficos correlacionam cada fungo com seu próprio experimento controle.

T. interdigitale aumenta os níveis transcricionais de *mdr1* apenas em presença de griseofulvina, estando aproximadamente 10 vezes mais disponível em relação ao micélio não exposto às drogas, sugerindo que este gene colabore para uma menor susceptibilidade deste fungo à droga testada. Estudo anteriormente realizado em nosso laboratório mostra que, após exposição a concentrações sub-inibitórias de cetoconazol, fluconazol ou griseofulvina durante 30 minutos, *T. interdigitale* aumenta a expressão de *mdr1* (Cervelatti et al., 2006) revelando o largo espectro de atividade deste gene.

Ao contrário de *T. interdigitale*, *T. rubrum* e *T. equinum* acumulam transcritos de *mdr1* na presença de anfotericina B. Além disso, *T. equinum* acumula 30 vezes mais transcritos em resposta ao itraconazol, quando comparado com *T. interdigitale*. Esta é a única espécie que acumulou níveis elevados de transcritos de *mdr1* na presença de itraconazol, sob as condições experimentais avaliadas. *T. tonsurans* apresenta níveis não significativos de transcritos de *mdr1* acumulados após exposição a qualquer dos quatro antifúngicos avaliados.

Transcritos de *mdr2* acumulam em *T. rubrum* e *T. equinum* depois de exposição a todos os agentes antifúngicos testados, sugerindo que este gene tem um papel importante na susceptibilidade a várias drogas (Figura 49). No entanto, é importante ressaltar que houve acúmulo de transcritos em *T. rubrum* e *T. equinum*, mesmo na ausência do tratamento com as drogas, o que sugere haver outras funções para este gene, além de efluxo de drogas. *T. rubrum* e *T. equinum* acumularam níveis elevados de transcritos *mdr2*, especialmente na presença de itraconazol. Curiosamente, em *T. equinum*, os níveis de transcritos acumulados em 15 minutos de exposição à anfotericina B e griseofulvina decaem após 60 minutos de exposição, efeito não observado para o itraconazol e terbinafina.

Foi demonstrado anteriormente, que a transcrição de *mdr2* foi regulada positivamente após exposição de *T. interdigitale* por 15 minutos a antifúngicos tais como fluconazol e acriflavina (Fachin et al., 2006; Paião et al., 2007). Além disso, a regulação negativa observada para este gene após exposição à acriflavina durante 3 horas indica que o transportador MDR2 é ativado nos tempos iniciais de exposição a estes fármacos (Persinoti et al., 2014).

Figura 49. Níveis de acúmulo de transcritos do gene *mdr2* por RT-qPCR. Acúmulo de mRNA avaliado após exposição a meio RPMI (controle) ou meio RPMI contendo concentrações subinibitórias de anfotericina B (AMB), griseofulvina (GRS), itraconazol (ITRA) ou terbinafina (TRB), por 15 ou 60 minutos de exposição. Níveis de acúmulo de transcritos representado por *fold change* em relação ao experimento controle (sem droga) de *T. interdigitale*. Barras nas colunas representam o desvio padrão de três experimentos independentes. A significância estatística foi avaliada pelo teste Bonferroni *ad hoc* e indicadas por asteriscos: * indica $p < 0,05$; ** indica $p < 0,01$; *** indica $p < 0,001$. Análises estatísticas indicadas acima das colunas correlacionam o experimento controle de *T. interdigitale* em comparação às demais condições experimentais. Análises estatísticas indicadas abaixo dos gráficos correlacionam cada fungo com seu próprio experimento controle.

T. tonsurans responde com maior acúmulo de transcritos de *mdr2* em presença de griseofulvina, itraconazol e terbinafina, sugerindo que este gene apresenta neste dermatófito, atividade de efluxo destas drogas, o que não foi observado para o gene *mdr1*.

Os valores observados de mRNA acumulados em *T. interdigitale*, *T. rubrum* e *T. equinum* sugerem grande especificidade de *mdr2* na atividade de efluxo de substâncias tóxicas das células dos fungos. Aumentos superiores a 70 vezes para *T. interdigitale*, 80 vezes para *T. rubrum* (no momento de maior acúmulo observado de transcritos) e quantidades superiores a 1400 vezes, no momento de maior acúmulo de *T. equinum*, nos permitem sugerir que a atividade principal deste gene seja eliminar da célula dos fungos agentes nocivos. Também *T. tonsurans* apresenta, em presença de griseofulvina, aumento de transcritos sete vezes maior em relação ao controle do experimento.

O acúmulo de transcritos de *mdr4* não segue um padrão entre as quatro espécies. Enquanto a presença de anfotericina B e terbinafina induzem o acúmulo em *T. interdigitale*, *T. rubrum* e *T. equinum*, a presença de itraconazol induz o acúmulo de transcritos de *mdr4* em *T. rubrum*, *T. tonsurans* e *T. equinum*. Na presença de qualquer uma das quatro drogas, ocorre a indução de elevados níveis de transcritos de *mdr4* em *T. equinum*, enquanto para *T. tonsurans*, o acúmulo de transcritos apenas ocorre na presença de itraconazol (Figura 50). Diferenças tão significativas entre *T. tonsurans* e *T. equinum* não eram esperadas, uma vez que são as espécies mais intimamente relacionadas, apresentando o maior percentual de colinearidade entre genes nos dermatófitos em estudo (Martinez *et al.*, 2012).

Figura 50. Níveis de acúmulo de transcritos do gene *mdr4* por RT-qPCR. Acúmulo de mRNA avaliado após exposição a meio RPMI (controle) ou meio RPMI contendo concentrações subinibitórias de anfotericina B (AMB), griseofulvina (GRS), itraconazol (ITRA) ou terbinafina (TRB), por 15 ou 60 minutos de exposição. Níveis de acúmulo de transcritos representado por *fold change* em relação ao experimento controle (sem droga) de *T. interdigitale*. Barras nas colunas representam o desvio padrão de três experimentos independentes. A significância estatística foi avaliada pelo teste Bonferroni *ad hoc* e indicadas por asteriscos: * indica $p < 0,05$; ** indica $p < 0,01$; *** indica $p < 0,001$. Análises estatísticas indicadas acima das colunas correlacionam o experimento controle de *T. interdigitale* em comparação às demais condições experimentais. Análises estatísticas indicadas abaixo dos gráficos correlacionam cada fungo com seu próprio experimento controle.

Para *T. equinum* observamos significativo acúmulo de transcritos mesmo na ausência do tratamento com as drogas, o que sugere que este gene esteja ativo para realizar outras funções celulares, além de efluxo de drogas.

Por análise de RNA-seq foi observado aumento no acúmulo de transcritos de *mdr4* em *T. rubrum*, em resposta à exposição à acriflavina, por tempos mais longos de cultivo (após 12 horas e 24 horas de exposição). Tais resultados sugerem que *mdr4* é transcrito no decorrer do tempo, presumindo-se que a alta taxa de efluxo desta substância tóxica ocorra após longos períodos de exposição (Persinoti *et al.*, 2014).

Para avaliar se o acúmulo de mRNA observado nos tempos iniciais de cultivo, sem a presença de drogas, ocorre em função da troca de meio de cultura, de SDB para RPMI, foi realizado experimento de RT-qPCR após 96 horas de cultivo destes dois fungos em ambos meios. Observamos na Figura 51 que em resposta à troca do meio de cultura para RPMI, *T. rubrum* aumenta os transcritos de *mdr2* em mais de 160 vezes, mas que essa transição entre meios de cultivo não altera o acúmulo de *mdr4*. Estes dados indicam que parte da resposta observada em relação ao acúmulo de *mdr2* em presença das drogas corresponde ao estresse causado pela passagem dos micélios de um meio de cultura, rico em fontes nutricionais (SDB), para um meio mais restritivo (RPMI).

Figura 51. Níveis de acúmulo de transcritos dos genes *mdr2* e *mdr4*, apresentados em sequência, verificados por RT-qPCR. *T. equinum* e *T. rubrum* em meio SDB foram cultivados por 96 horas. *T. equinum*, *T. interdigitale* e *T. rubrum* em meio RPMI foram cultivados igualmente em meio SDB por 96 horas, e o micélio resultante foi lavado assepticamente, transferido para meio RPMI, e cultivados durante 3 horas adicionais. Os níveis de acúmulo de transcritos do gene estão representados em relação à amostra controle de *T. interdigitale*. Barras nas colunas representam o desvio padrão dos dados obtidos a partir de três experiências independentes. A significância estatística foi avaliada pelo teste de Bonferroni *ad hoc* e indicada por asteriscos: * indica $p < 0,05$; ** Indica $p < 0,01$; *** Indica $p < 0,001$.

Nos cultivos com *T. equinum* observa-se que a passagem do micélio do meio SDB para RPMI aumenta o acúmulo de transcritos de *mdr2* em mais de 400 vezes, o que não ocorre para *mdr4* que permanece em níveis basais. No entanto, quando o fungo foi submetido ao meio SDB o nível de mRNA do gene *mdr4* aumentou quase 400 vezes, o que não ocorre

para o gene *mdr2*. Estes resultados sugerem que estes dois genes estão realmente envolvidos em outras funções nutricionais celulares, além do efluxo de drogas.

Foi também avaliada a modulação dos genes que codificam *mdr1* e *mdr4* na linhagem mutante para o gene *mdr2* no dermatófito *T. interdigitale*. Nas análises de expressão relativa entre as espécies, os gráficos foram construídos utilizando como experimento controle o micélio de *T. interdigitale* sem exposição a drogas.

A interrupção do gene *mdr2* afeta ligeiramente o nível de expressão de *mdr1* em $\Delta mdr2$ após exposição à griseofulvina, e influencia de forma significativa e positiva os níveis de acúmulo de transcritos de *mdr4* na presença desta mesma droga, em comparação à linhagem selvagem. Os resultados sugerem que no mutante gene *mdr4* compensa a inativação de *mdr2* aumentando sua expressão e sua atividade de efluxo, de modo a aumentar a resistência a este fármaco antifúngico (Figura 52). Este resultado pode explicar porque não foi observada diferença entre as linhagens $\Delta mdr2$ e a selvagem, no que diz respeito ao grau de susceptibilidade para a griseofulvina (Figura 53) (Fachin *et al.*, 2006).

Figura 52. Níveis de acúmulo de transcritos dos genes *mdr1* (acima) e *mdr4* (abaixo) por RT-qPCR na espécie *T. interdigitale* e em seu mutante $\Delta mdr2$. Acúmulo de mRNA avaliado após exposição a meio RPMI (controle) ou meio RPMI contendo concentrações subinibitórias de anfotericina B (AMB), griseofulvina (GRS), itraconazol (ITRA) ou terbinafina (TRB), por 15 ou 60 minutos de exposição. Níveis de acúmulo de transcritos representado por *fold change* em relação ao experimento controle (sem droga) de *T. interdigitale*. Barras nas colunas representam o desvio padrão de três experimentos independentes. A significância estatística foi avaliada pelo

teste Bonferroni *ad hoc* e indicadas por asteriscos: * indica $p < 0,05$; ** indica $p < 0,01$; *** indica $p < 0,001$. Análises estatísticas indicadas acima das colunas correlacionam o experimento controle de *T. interdigitale* em comparação às demais condições experimentais. Análises estatísticas indicadas abaixo dos gráficos correlacionam cada linhagem com seu próprio experimento controle.

Em contraste, a expressão do gene *mdr4* no mutante $\Delta mdr2$ é regulada negativamente em presença de anfotericina B e terbinafina, sugerindo que o nível de transcrição do gene *mdr4* depende, de algum modo, do transportador MDR2 quando *T. interdigitale* é exposto a estes antifúngicos. Isto indica que pode existir um efeito de cooperação, que contribui para a resistência a múltiplas drogas através de redes gênicas. Em comparação com a linhagem selvagem, $\Delta mdr2$ apresenta sensibilidade aumentada à terbinafina e anfotericina B (Figura 53).

Figura 53. Efeitos da deleção do gene *mdr2* sobre o crescimento de *T. interdigitale* (wild-type) na presença de drogas: AMB (0,07 ug / ml, correspondente a 70% da MIC), GRS (0,04 ug / ml, 1% da MIC) ITRA (0,002 ug / ml, 50 % de MIC), e TRB (0,008 ug / mL, 1% de MIC). As células foram pingadas sobre placas contendo meio MEA, em diluições seriadas (1×10^7 células na primeira posição, até 1×10^3 células). As células foram cultivadas a 28 ° C durante 48 h (A) e 72 horas (B).

Os dados obtidos de acúmulo de transcritos de três genes envolvidos no processo de extrusão de agentes tóxicos das células de dermatófitos indicam que estes atuam de forma sinérgica e ao mesmo tempo compensatória.

A modulação da expressão gênica pelos fungos durante a infecção de tecidos hospedeiros ou em resposta a diferentes estímulos, como a ação de drogas antifúngicas, é essencial para que ocorra a ativação, ou mesmo repressão, de genes que possibilitam sua sobrevivência e permanência no hospedeiro.

Dados de sequenciamento e estudos comparativos concernentes à expressão de genes potencialmente envolvidos na patogenicidade destes organismos, e relacionados os mecanismos de defesa contra agentes antifúngicos tem permitido compreender os mecanismos que torna os dermatófitos capazes de se evadir dos mecanismos de defesa inatos e infectar diferentes hospedeiros. Muito ainda há de ser feito para a compreensão das relações entre patógeno e hospedeiro na tentativa de reduzir o tempo de tratamento ou aumentar a eficácia da atuação das drogas contra dermatófitos.

Nossos resultados sugerem que, em resposta a estressores, bem como em virtude da disponibilidade de nutrientes presentes no meio de cultura, os genes são acumulados em níveis que variam de acordo com a atividade metabólica dos fungos, do substrato disponibilizado e dos tempos de cultura e alcalinização do ambiente, independente da similaridade em nível genômico dos organismos em estudo.

VII. Conclusões

Entre os genomas analisados é notável o alto grau de conservação em suas sequências, devido à recente ocorrência de seleção e especiação em relação ao um ancestral comum.

O acúmulo de mRNA dos diferentes genes entre os dermatófitos ensaiados variou, na maioria dos casos, independentemente do grau de conservação destes genes, da proximidade filogenética entre os dermatófitos analisados, ou do habitat preferencial destes fungos. Quanto às relações filogenéticas, nossos resultados sugerem que o acúmulo de transcritos do gene *ureD* esteja relacionada ao gênero *Trichophyton*, e os transcritos de *gell* e *pacC*, são preferencialmente acumulados na espécie do gênero *Microsporum*. Em relação à predileção por habitat específico, pelo maior acúmulo de transcritos do gene *lpl* entre os dermatófitos antropofílicos, sugerimos a ocorrência desta correlação.

A atividade transcricional dos genes avaliados nos cultivos em queratina, associados à virulência em dermatófitos, sugere que a maquinaria metabólica destes dermatófitos, no que concerne à formação da parede, metabolização do substrato do hospedeiro e adesão ao substrato está ativada nos períodos iniciais de infecção.

Os dois dermatófitos com maior índice de infecção em humanos, *T. rubrum* e *T. interdigitale*, apresentam um maior acúmulo de mRNA para os genes de remodelamento da parede celular e metabolização do substrato queratinolítico, indícios da capacidade aumentada de infecção destes fungos.

Observamos indícios de regulação via fator de transcrição PacC em *T. interdigitale* no período inicial da infecção em atividades relacionadas à formação e remodelamento da parede celular, e no processo de adesão do fungo.

Os nossos dados sugerem que os genes *mdr* atuam sinergicamente em dermatófitos, e eles podem compensar um ao outro, quando da exposição a drogas antifúngicas. Isto pode ser uma importante causa de fracasso no tratamento das dermatofitoses.

Referências Bibliográficas

- Abdel-Rahman, S. M., S. Simon, *et al.* Tracking *Trichophyton tonsurans* through a large urban child care center: defining infection prevalence and transmission patterns by molecular strain typing. Pediatrics, v.118, n.6, Dec, p.2365-73. 2006.
- Aboul-Nasr, M. B., A. N. Zohri, *et al.* Enzymatic and toxigenic ability of opportunistic fungi contaminating intensive care units and operation rooms at Assiut University Hospitals, Egypt. Springerplus, v.2, p.347. 2013.
- Achterman, R. R., A. R. Smith, *et al.* Sequenced dermatophyte strains: growth rate, conidiation, drug susceptibilities, and virulence in an invertebrate model. Fungal Genet Biol, v.48, n.3, Mar, p.335-41. 2011.
- Adams, D. J. Fungal cell wall chitinases and glucanases. Microbiology, v.150, n.Pt 7, Jul, p.2029-35. 2004.
- Al-Fakih, A. A. Overview on the Fungal Metabolites Involved in Mycopathy. Open Journal of Medical Microbiology, v.4, p.38-63. 2014.
- Altschul, S. F., W. Gish, *et al.* Basic local alignment search tool. J Mol Biol, v.215, n.3, Oct 5, p.403-10. 1990.
- Amarsaikhan, N., E. M. O'dea, *et al.* Isolate-dependent growth, virulence, and cell wall composition in the human pathogen *Aspergillus fumigatus*. PLoS One, v.9, n.6, p.e100430. 2014.
- Arst, H. N. e M. A. Penalva. pH regulation in *Aspergillus* and parallels with higher eukaryotic regulatory systems. Trends Genet, v.19, n.4, Apr, p.224-31. 2003.
- Atlas, R. M. Handbook of microbiological media: Ed. CRC Press 1993. 786 p. p.
- Bagut, E. T., A. Baldo, *et al.* Subtilisin Sub3 is involved in adherence of *Microsporum canis* to human and animal epidermis. Vet Microbiol, v.160, n.3-4, Dec 7, p.413-9. 2012.
- Baldo, A., A. Mathy, *et al.* Secreted subtilisin Sub3 from *Microsporum canis* is required for adherence to but not for invasion of the epidermis. Br J Dermatol, v.162, n.5, May, p.990-7. 2010.
- Baldo, A., M. Monod, *et al.* Mechanisms of skin adherence and invasion by dermatophytes. Mycoses, v.55, n.3, May, p.218-23. 2011.
- Birgbauer, E. e J. Chun. New developments in the biological functions of lysophospholipids. Cell Mol Life Sci, v.63, n.23, Dec, p.2695-701. 2006.

- Blyskal, B. Fungi utilizing keratinous substrates. International Biodeterioration & Biodegradation, v.63, p.631-653. 2009.
- Bowman, S. M. e S. J. Free. The structure and synthesis of the fungal cell wall. Bioessays, v.28, n.8, Aug, p.799-808. 2006.
- Brasch, J., B. Logering, *et al.* Tinea capitis caused by *Trichophyton equinum*. Acta Derm Venereol, v.89, n.2, p.204-5. 2009.
- Breddam, K. Serine carboxypeptidases. A review. Carlsberg Res Commun, v.51, p. 83-128. 1986.
- Burmester, A., E. Shelest, *et al.* Comparative and functional genomics provide insights into the pathogenicity of dermatophytic fungi. Genome Biol, v.12, n.1, p.R7. 2011.
- Bustin, S. A., V. Benes, *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin Chem, v.55, n.4, Apr, p.611-22. 2009.
- Bustin, S. A. e T. Nolan. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. Journal of Biomolecular Techniques, v.15, n.3, Sep, p.155-166. 2004.
- Cannon, R. D., E. Lamping, *et al.* Efflux-mediated antifungal drug resistance. Clin Microbiol Rev, v.22, n.2, Apr, p.291-321, Table of Contents. 2009.
- Carter, E. L. e R. P. Hausinger. Characterization of the *Klebsiella aerogenes* urease accessory protein UreD in fusion with the maltose binding protein. J Bacteriol, v.192, n.9, May, p.2294-304. 2010.
- Cazzaniga, R. A. Caracterização funcional do fator de transcrição PacC do dermatófito *Trichophyton rubrum*: regulação da expressão gênica em resposta ao pH ambiente e na interação com moléculas do hospedeiro. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011. 111 p.
- Cervelatti, E. P., A. L. Fachin, *et al.* Molecular cloning and characterization of a novel ABC transporter gene in the human pathogen *Trichophyton rubrum*. Med Mycol, v.44, n.2, Mar, p.141-7. 2006.
- Cervelatti, E. P., M. S. Ferreira-Nozama, *et al.* Electrophoretic molecular karyotype of the dermatophyte, *Trichophyton rubrum*. Genetics and Molecular Biology, v.27, p.99-102. 2004.
- Chen, J., J. Yi, *et al.* Substrate adaptation of *Trichophyton rubrum* secreted endoproteases. Microb Pathog, v.48, n.2, Feb, p.57-61. 2010.
- Chermette, R., L. Ferreiro, *et al.* Dermatophytoses in animals. Mycopathologia, v.166, n.5-6, Nov-Dec, p.385-405. 2008.

- Coelho, L. M., R. Aquino-Ferreira, *et al.* In vitro antifungal drug susceptibilities of dermatophytes microconidia and arthroconidia. J Antimicrob Chemother, v.62, n.4, Oct, p.758-61. 2008.
- Coelho, L. M., J. R. Cursino-Santos, *et al.* The *Microsporum canis* genome is organized into five chromosomes based on evidence from electrophoretic karyotyping and chromosome end mapping. Med Mycol, v.51, n.2, Feb, p.208-13. 2013.
- Cove, D. J. The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. Biochim Biophys Acta, v.113, n.1, Jan 11, p.51-6. 1966.
- Craik, D. J., N. L. Daly, *et al.* Plant cyclotides: A unique family of cyclic and knotted proteins that defines the cyclic cystine knot structural motif. J Mol Biol, v.294, n.5, Dec 17, p.1327-36. 1999.
- Crissey, J. T., L. C. Parish, *et al.* Manual of medical mycology: Cambridge, Mass., USA : Blackwell Scientific. 1995
- Cuomo, C. A. e B. W. Birren. The fungal genome initiative and lessons learned from genome sequencing. Methods Enzymol, v.470, p.833-55. 2010.
- Deber, C. M., C. Wang, *et al.* TM Finder: a prediction program for transmembrane protein segments using a combination of hydrophobicity and nonpolar phase helicity scales. Protein Sci, v.10, n.1, Jan, p.212-9. 2001.
- Degreef, H. Clinical forms of dermatophytosis (ringworm infection). Mycopathologia, v.166, n.5-6, Nov-Dec, p.257-65. 2008.
- Del Sorbo, G., H. Schoonbeek, *et al.* Fungal transporters involved in efflux of natural toxic compounds and fungicides. Fungal Genet Biol, v.30, n.1, Jun, p.1-15. 2000.
- Dheda, K., J. F. Huggett, *et al.* The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization. Analytical Biochemistry, v.344, n.1, Sep 1, p.141-143. 2005.
- Djordjevic, J. T. Role of phospholipases in fungal fitness, pathogenicity, and drug development - lessons from *Cryptococcus neoformans*. Front Microbiol, v.1, p.125. 2010.
- Dobrowolska, A., J. Debska, *et al.* Strains differentiation of *Microsporum canis* by RAPD analysis using (GACA)₄ and (ACA)₅ primers. Pol J Microbiol, v.60, n.2, p.145-8. 2011.
- Doedt, T., S. Krishnamurthy, *et al.* APSES proteins regulate morphogenesis and metabolism in *Candida albicans*. Mol Biol Cell, v.15, n.7, Jul, p.3167-80. 2004.
- Esquenazi, D., C. S. Alviano, *et al.* The influence of surface carbohydrates during *in vitro* infection of mammalian cells by the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. Res Microbiol, v.155, n.3, Apr, p.144-53. 2004.

- Esteban, A., M. L. Abarca, *et al.* Comparison of disk diffusion method and broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of dermatophytes. Med Mycol, v.43, n.1, Feb, p.61-6. 2005.
- Fachin, A. L., M. S. Ferreira-Nozawa, *et al.* 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.
- Fernandez-Torres, B., A. J. Carrillo, *et al.* *In vitro* activities of 10 antifungal drugs against 508 dermatophyte strains. Antimicrob Agents Chemother, v.45, n.9, Sep, p.2524-8. 2001.
- Ferreira-Nozawa, M. S., S. R. Nozawa, *et al.* The dermatophyte *Trichophyton rubrum* secretes an EDTA-sensitive alkaline phosphatase on highphosphate medium. Braz J Microbiol, v.34, p.161-164. 2003.
- Ferreira-Nozawa, M. S., H. C. Silveira, *et al.* The pH signaling transcription factor PacC mediates the growth of *Trichophyton rubrum* on human nail *in vitro*. Med Mycol, v.44, n.7, Nov, p.641-5. 2006.
- Freitas, J. S., E. M. Silva, *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, v.16, n.5, Sep, p.565-72. 2011.
- _____. Identification of nutrient-dependent changes in extracellular pH and acid phosphatase secretion in *Aspergillus nidulans*. Genet Mol Res, v.6, n.3, p.721-9. 2007.
- Garcia-Pedrajas, M. D., L. Baeza-Montanez, *et al.* Regulation of *Ustilago maydis* dimorphism, sporulation, and pathogenic development by a transcription factor with a highly conserved APSES domain. Mol Plant Microbe Interact, v.23, n.2, Feb, p.211-22. 2010.
- Gastebois, A., I. Mouyna, *et al.* Characterization of a new beta(1-3)-glucan branching activity of *Aspergillus fumigatus*. J Biol Chem, v.285, n.4, Jan 22, p.2386-96. 2009.
- Ghannoum, M. A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. Clin Microbiol Rev, v.13, n.1, Jan, p.122-43, table of contents. 2000.
- Ghelardi, E., F. Celandroni, *et al.* Potential of Ergosterol synthesis inhibitors to cause resistance or cross-resistance in *Trichophyton rubrum*. Antimicrob Agents Chemother, v.58, n.5, May, p.2825-9. 2014.
- Giddey, K., B. Favre, *et al.* Closely related dermatophyte species produce different patterns of secreted proteins. FEMS Microbiol Lett, v.267, n.1, Feb, p.95-101. 2007.
- Ginter-Hanselmayer, G., W. Weger, *et al.* Epidemiology of *tinea capitis* in Europe: current state and changing patterns. Mycoses, v.50 Suppl 2, p.6-13. 2007.
- Gonzalez, R., S. Ferrer, *et al.* Transformation of the dermatophyte *Trichophyton mentagrophytes* to hygromycin B resistance. Infect Immun, v.57, n.9, Sep, p.2923-5. 1989.

- Gottesman, M. M. e S. V. Ambudkar. Overview: ABC transporters and human disease. J Bioenerg Biomembr, v.33, n.6, Dec, p.453-8. 2001.
- Graser, Y., J. Scott, *et al.* The new species concept in dermatophytes-a polyphasic approach. Mycopathologia, v.166, n.5-6, Nov-Dec, p.239-56. 2008.
- Grumbt, M., M. Monod, *et al.* Genetic advances in dermatophytes. FEMS Microbiol Lett, v.320, n.2, Jul, p.79-86. 2011.
- _____. Keratin degradation by dermatophytes relies on cysteine dioxygenase and a sulfite efflux pump. J Invest Dermatol, v.133, n.6, Jun, p.1550-5. 2013.
- Grunwald, M. H., B. Amichai, *et al.* Fingertip contamination after a brief touch of tinea capitis lesions caused by *Microsporum canis*. Br J Dermatol, Jun 28. 2014.
- Gulshan, K. e W. S. Moye-Rowley. Multidrug resistance in fungi. Eukaryot Cell, v.6, n.11, Nov, p.1933-42. 2007.
- 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.
- Hamill, R. J. Amphotericin B formulations: a comparative review of efficacy and toxicity. Drugs, v.73, n.9, Jun, p.919-34. 2013.
- Hennicke, F., M. Grumbt, *et al.* Factors supporting cysteine tolerance and sulfite production in *Candida albicans*. Eukaryot Cell, v.12, n.4, Apr, p.604-13. 2013.
- Higgins, C. F. ABC transporters: from microorganisms to man. Annu Rev Cell Biol, v.8, p.67-113. 1992.
- Hollenstein, K., R. J. Dawson, *et al.* Structure and mechanism of ABC transporter proteins. Curr Opin Struct Biol, v.17, n.4, Aug, p.412-8. 2007.
- Horn, S. J., A. Sorbotten, *et al.* Endo/exo mechanism and processivity of family 18 chitinases produced by *Serratia marcescens*. FEBS J, v.273, n.3, Feb, p.491-503. 2006.
- Hryniewicz-Gwozdz, A., V. Beck-Jendroschek, *et al.* Tinea capitis and tinea corporis with a severe inflammatory response due to *Trichophyton tonsurans*. Acta Derm Venereol, v.91, n.6, Oct, p.708-10. 2011a.
- Hryniewicz-Gwozdz, A., T. Jagielski, *et al.* Molecular typing of *Trichophyton rubrum* clinical isolates from Poland. Mycoses, v.54, n.6, Nov, p.e726-36. 2011b.
- Hsu, K. H., S. Y. Wang, *et al.* Characterization and heterologous expression of a novel lysophospholipase gene from *Antrodia cinnamomea*. J Appl Microbiol, v.108, n.5, May, p.1712-22. 2009.
- Huggett, J., K. Dheda, *et al.* Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. Genes Immunology, v.6, n.4, Jun, p.279-284. 2005.

Huovinen, S., E. Tunnela, *et al.* Human onychomycosis caused by *Trichophyton equinum* transmitted from a racehorse. Br J Dermatol, v.138, n.6, Jun, p.1082-4. 1998.

Iyer, S. e K. R. Acharya. Tying the knot: the cystine signature and molecular-recognition processes of the vascular endothelial growth factor family of angiogenic cytokines. FEBS J, v.278, n.22, Nov, p.4304-22. 2011.

Jackson, C. J., R. C. Barton, *et al.* Species identification and strain differentiation of dermatophyte fungi by analysis of ribosomal-DNA intergenic spacer regions. J Clin Microbiol, v.37, n.4, Apr, p.931-6. 1999.

Jacob, T. R., N. T. Peres, *et al.* rpb2 is a reliable reference gene for quantitative gene expression analysis in the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. Med Mycol, v.50, n.4, May, p.368-77. 2012.

Jo Siu, W. J., Y. Tatsumi, *et al.* Comparison of *in vitro* antifungal activities of efinaconazole and currently available antifungal agents against a variety of pathogenic fungi associated with onychomycosis. Antimicrob Agents Chemother, v.57, n.4, Apr, p.1610-6. 2013.

Junges, A., J. T. Boldo, *et al.* Genomic analyses and transcriptional profiles of the glycoside hydrolase family 18 genes of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. PLoS One, v.9, n.9, p.e107864. 2014.

Kamei, M., K. Yamashita, *et al.* Deletion and expression analysis of beta-(1,3)-glucanosyltransferase genes in *Neurospora crassa*. Fungal Genet Biol, v.52, Mar, p.65-72. 2013.

Kannan, P., C. Janaki, *et al.* Prevalence of dermatophytes and other fungal agents isolated from clinical samples. Indian J Med Microbiol, v.24, n.3, Jul, p.212-5. 2006.

Karkowska-Kuleta, J., M. Rapala-Kozik, *et al.* Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. Acta Biochim Pol, v.56, n.2, p.211-24. 2009.

Kasperova, A., J. Kunert, *et al.* Isolation of recombinant cysteine dioxygenase protein from *Trichophyton mentagrophytes*. Mycoses, v.54, n.5, Sep, p.e456-62. 2011.

Ketudat Cairns, J. R. e A. Esen. beta-Glucosidases. Cell Mol Life Sci, v.67, n.20, Oct, p.3389-405. 2010.

Kohler, G. A., A. Brenot, *et al.* Phospholipase A2 and phospholipase B activities in fungi. Biochim Biophys Acta, v.1761, n.11, Nov, p.1391-9. 2006.

Kunert, J. Keratin decomposition by dermatophytes: evidence of the sulphitolysis of the protein. Experientia, v.28, n.9, Sep 15, p.1025-6. 1972.

- _____. Physiology of keratinophilic fungi. In: Kushwaha RKS, Guarro J (eds), Biology of Dermatophytes and Other Keratinophilic Fungi, p.77–85 Bilbao: Revista Iberoamericana de Micología. 2000.
- Kwon-Chung, K. J. e J. E. Bennett. Medical Mycology: Philadelphia, Lea & Febiger. 1992. 866 p.
- Lafond, M., D. Navarro, *et al.* Characterization of a broad-specificity beta-glucanase acting on beta-(1,3)-, beta-(1,4)-, and beta-(1,6)-glucans that defines a new glycoside hydrolase family. Appl Environ Microbiol, v.78, n.24, Dec, p.8540-6. 2012.
- Latge, J. P. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. Mol Microbiol, v.66, n.2, Oct, p.279-90. 2007.
- Le, S. Q. e O. Gascuel. An improved general amino acid replacement matrix. Mol Biol Evol, v.25, n.7, Jul, p.1307-20. 2008.
- Leal, J., F. M. Squina, *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, v.583, n.1, Jan 5, p.180-4. 2009.
- Lechenne, B., U. Reichard, *et al.* Sulphite efflux pumps in *Aspergillus fumigatus* and dermatophytes. Microbiology, v.153, n.Pt 3, Mar, p.905-13. 2007.
- Livak, K. J. e T. D. Schmittgen. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods, v.25, n.4, Dec, p.402-8. 2001.
- Locher, K. P. Structure and mechanism of ABC transporters. Curr Opin Struct Biol, v.14, n.4, Aug, p.426-31. 2004.
- Lysoe, E., M. Pasquali, *et al.* The transcription factor FgStuAp influences spore development, pathogenicity, and secondary metabolism in *Fusarium graminearum*. Mol Plant Microbe Interact, v.24, n.1, Jan, p.54-67. 2011.
- Maranhão, F. C., F. G. Paiao, *et al.* Membrane transporter proteins are involved in *Trichophyton rubrum* pathogenesis. J Med Microbiol, v.58, n.Pt 2, Feb, p.163-8. 2009.
- _____. Isolation of transcripts over-expressed in human pathogen *Trichophyton rubrum* during growth in keratin. Microb Pathog, v.43, n.4, Oct, p.166-72. 2007a.
- Maranhão, F. C., F. G. Paiao, *et al.* Isolation of transcripts over-expressed in human pathogen *Trichophyton rubrum* during growth in keratin. Microb Pathog, v.43, n.4, Oct, p.166-72. 2007b.
- Martinez-Rossi, N. M., M. S. Ferreira-Nozawa, *et al.* Molecular aspects of dermatophyte-host interactions. In: R. K. S. Kushwaha (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, *et al.* Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. Mycopathologia, v.166, n.5-6, Nov-Dec, p.369-83. 2008.
- Martinez-Rossi, N. M., G. F. Persinoti, *et al.* Role of pH in the pathogenesis of dermatophytoses. Mycoses, v.55, n.5, Sep, p.381-7. 2011.
- Martinez, D. A., B. G. Oliver, *et al.* Comparative genome analysis of *Trichophyton rubrum* and related dermatophytes reveals candidate genes involved in infection. MBio, v.3, n.5, p.e00259-12. 2012.
- Matsuzaki, Y., K. Ota, *et al.* Deep pseudocystic dermatophytosis caused by *Trichophyton rubrum* in a patient with myasthenia gravis. Acta Derm Venereol, v.93, n.3, May, p.358-9. 2012.
- Mendes, N. S., G. L. Trevisan, *et al.* Transcription of N- and O-linked mannosyltransferase genes is modulated by the *pacC* gene in the human dermatophyte *Trichophyton rubrum*. FEBS Open Bio, v.2, p.294-7. 2012.
- Mignon, B., M. Swinnen, *et al.* Purification and characterization of a 315 kDa keratinolytic subtilisin-like serine protease from *Microsporum canis* and evidence of its secretion in naturally infected cats. Med Mycol, v.36, n.6, Dec, p.395-404. 1998.
- Miller, K. Y., J. Wu, *et al.* StuA is required for cell pattern formation in *Aspergillus*. Genes Dev, v.6, n.9, Sep, p.1770-82. 1992.
- Mirbod-Donovan, F., R. Schaller, *et al.* Urease produced by *Coccidioides posadasii* contributes to the virulence of this respiratory pathogen. Infect Immun, v.74, n.1, Jan, p.504-15. 2006.
- Moen, M. D., K. A. Lyseng-Williamson, *et al.* Liposomal amphotericin B: a review of its use as empirical therapy in febrile neutropenia and in the treatment of invasive fungal infections. Drugs, v.69, n.3, p.361-92. 2009.
- Monod, M. Secreted proteases from dermatophytes. Mycopathologia, v.166, n.5-6, Nov-Dec, p.285-94. 2008.
- Morschhauser, J. Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. Fungal Genet Biol, v.47, n.2, Feb, p.94-106. 2010.
- Morton, C. O., M. Chau, *et al.* *In vitro* combination therapy using low dose clotrimazole and photodynamic therapy leads to enhanced killing of the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. BMC Microbiol, v.14, p.261. 2014.
- Mouyna, I., L. Hartl, *et al.* beta-1,3-glucan modifying enzymes in *Aspergillus fumigatus*. Front Microbiol, v.4, p.81. 2013.

- Mouyna, I., W. Morelle, *et al.* Deletion of GEL2 encoding for a beta(1-3)glucanosyltransferase affects morphogenesis and virulence in *Aspergillus fumigatus*. Mol Microbiol, v.56, n.6, Jun, p.1675-88. 2005.
- Mukherjee, P. K., S. D. Leidich, *et al.* Clinical *Trichophyton rubrum* strain exhibiting primary resistance to terbinafine. Antimicrob Agents Chemother, v.47, n.1, Jan, p.82-6. 2003.
- Nahas, E., H. F. Terenzi, *et al.* 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, v.128, p.2017-2021. 1982.
- Nakajima, M., T. Yamashita, *et al.* A novel glycosylphosphatidylinositol-anchored glycoside hydrolase from *Ustilago esculenta* functions in beta-1,3-glucan degradation. Appl Environ Microbiol, v.78, n.16, Aug, p.5682-9. 2012.
- Nardi, T., V. Corich, *et al.* A sulphite-inducible form of the sulphite efflux gene *SSU1* in a *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast. Microbiology, v.156, n.Pt 6, Jun, p.1686-96. 2010.
- Nenoff, P., J. Herrmann, *et al.* *Trichophyton mentagrophytes* sive *interdigitale*? A dermatophyte in the course of time. J Dtsch Dermatol Ges, v.5, n.3, Mar, p.198-202. 2007.
- Nenoff, P., C. Kruger, *et al.* Mycology - an update. Part 1: Dermatomycoses: causative agents, epidemiology and pathogenesis. J Dtsch Dermatol Ges, v.12, n.3, Mar, p.188-209; quiz 210, 188-211; quiz 212. 2013.
- Nolan, T., R. E. Hands, *et al.* Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. Nat Protoc, v.1, n.3, p.1559-82. 2006.
- Nozawa, S. R., M. S. Ferreira-Nozawa, *et al.* The pH-induced glycosylation of secreted phosphatases is mediated in *Aspergillus nidulans* by the regulatory gene *pacC*-dependent pathway. Fungal Genet Biol, v.39, n.3, Aug, p.286-95. 2003.
- Ogawa, H., R. C. Summerbell, *et al.* Dermatophytes and host defence in cutaneous mycoses. Med Mycol, v.36 Suppl 1, p.166-73. 1998.
- Onyewu, C., J. R. Blankenship, *et al.* Ergosterol biosynthesis inhibitors become fungicidal when combined with calcineurin inhibitors against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei*. Antimicrob Agents Chemother, v.47, n.3, Mar, p.956-64. 2003.
- Paião, F. G., F. Segato, *et al.* Analysis of *Trichophyton rubrum* gene expression in response to cytotoxic drugs. FEMS Microbiol Lett, v.271, n.2, Jun, p.180-6. 2007.
- Pallaghy, P. K., K. J. Nielsen, *et al.* A common structural motif incorporating a cystine knot and a triple-stranded beta-sheet in toxic and inhibitory polypeptides. Protein Sci, v.3, n.10, Oct, p.1833-9. 1994.
- Park, I. S., M. B. Carr, *et al.* *In vitro* activation of urease apoprotein and role of UreD as a chaperone required for nickel metallocenter assembly. Proc Natl Acad Sci U S A, v.91, n.8, Apr 12, p.3233-7. 1994.

- Parussini, F., M. Garcia, *et al.* Characterization of a lysosomal serine carboxypeptidase from *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol, v.131, n.1, Sep, p.11-23. 2003.
- Peres, N. T., P. R. Sanches, *et al.* 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. 2010.
- Persinoti, G. F., N. T. A. Peres, *et al.* RNA-sequencing analysis of *Trichophyton rubrum* transcriptome in response to sublethal doses of acriflavine. BMC Genomics. 2014.
- Prasad, R., M. Sharma, *et al.* Functionally Relevant Residues of Cdr1p: A Multidrug ABC Transporter of Human Pathogenic *Candida albicans*. J Amino Acids, v.2011, p.531412. 2011.
- Ragni, E., J. Calderon, *et al.* Phr1p, a glycosylphosphatidylinositol-anchored beta(1,3)-glucanotransferase critical for hyphal wall formation, localizes to the apical growth sites and septa in *Candida albicans*. Fungal Genet Biol, v.48, n.8, Aug, p.793-805. 2011.
- Ramirez-Zavala, B. e A. Dominguez. Evolution and phylogenetic relationships of APSES proteins from *Hemiascomycetes*. FEMS Yeast Res, v.8, n.4, Jun, p.511-9. 2008.
- Rodwell, G. E., C. L. Bayles, *et al.* The prevalence of dermatophyte infection in patients infected with human immunodeficiency virus. Int J Dermatol, v.47, n.4, Apr, p.339-43. 2008.
- Rolli, E., E. Ragni, *et al.* Immobilization of the glycosylphosphatidylinositol-anchored Gas1 protein into the chitin ring and septum is required for proper morphogenesis in yeast. Mol Biol Cell, v.20, n.22, Nov, p.4856-70. 2009.
- Rossi, A., A. H. Cruz, *et al.* Ambient pH sensing in filamentous fungi: pitfalls in elucidating regulatory hierarchical signaling networks. IUBMB Life, v.65, n.11, Nov, p.930-5. 2013.
- Ruiz-Diez, B. Strategies for the transformation of filamentous fungi. J Appl Microbiol, v.92, n.2, p.189-95. 2002.
- Rutherford, J. C. The emerging role of urease as a general microbial virulence factor. PLoS Pathog, v.10, n.5, May, p.e1004062. 2014.
- Sambrook J, F. E., Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual: Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York-USA. 1989
- Sanglard, D. Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. Curr Opin Microbiol, v.5, n.4, Aug, p.379-85. 2002.
- Schuttelkopf, A. W., L. Gros, *et al.* Acetazolamide-based fungal chitinase inhibitors. Bioorg Med Chem, v.18, n.23, Dec 1, p.8334-40. 2010.
- Shepardson, K. M. e R. A. Cramer. Fungal cell wall dynamics and infection site microenvironments: signal integration and infection outcome. Curr Opin Microbiol, v.16, n.4, Aug, p.385-90. 2013.

- Silva, E. M., J. S. Freitas, *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, v.54, n.10, Oct, p.803-11. 2008.
- Silveira, H. C., D. E. Gras, *et al.* 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. 2010.
- Singh, A., R. J. Panting, *et al.* Factors required for activation of urease as a virulence determinant in *Cryptococcus neoformans*. MBio, v.4, n.3, p.e00220-13. 2013.
- Skerlev, M. e P. Miklic. The changing face of *Microsporum spp* infections. Clin Dermatol, v.28, n.2, Mar 4, p.146-50. 2010.
- Smith, E. B. The treatment of dermatophytosis: safety considerations. J Am Acad Dermatol, v.43, n.5 Suppl, Nov, p.S113-9. 2000.
- Squina, F. M., J. Leal, *et al.* Transcription of the *Neurospora crassa* 70-kDa class heat shock protein genes is modulated in response to extracellular pH changes. Cell Stress Chaperones, v.15, n.2, Mar, p.225-31. 2010.
- Staib, P., M. Kretschmar, *et al.* Transcriptional regulators Cph1p and Efg1p mediate activation of the *Candida albicans* virulence gene SAP5 during infection. Infect Immun, v.70, n.2, Feb, p.921-7. 2002.
- Staib, P., C. Zaugg, *et al.* 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.
- Stergiopoulos, I., L. H. Zwiers, *et al.* The ABC transporter MgAtr4 is a virulence factor of *Mycosphaerella graminicola* that affects colonization of substomatal cavities in wheat leaves. Mol Plant Microbe Interact, v.16, n.8, Aug, p.689-98. 2003.
- Tainwala, R. e Y. Sharma. Pathogenesis of dermatophytoses. Indian J Dermatol, v.56, n.3, May, p.259-61. 2011.
- Tamura, K., G. Stecher, *et al.* MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Mol Biol Evol, v.30, n.12, Dec, p.2725-9. 2013.
- Tamura, T., M. Asahara, *et al.* In vitro susceptibility of dermatomycoses agents to six antifungal drugs and evaluation by fractional inhibitory concentration index of combined effects of amorolfine and itraconazole in dermatophytes. Microbiol Immunol, v.58, n.1, Jan, p.1-8. 2014.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, *et al.* CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res, v.22, n.22, Nov 11, p.4673-80. 1994.

- Tilburn, J., S. Sarkar, *et al.* The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. EMBO J, v.14, n.4, Feb 15, p.779-90. 1995.
- Tong, X., X. Zhang, *et al.* GcSTUA, an APSES transcription factor, is required for generation of appressorial turgor pressure and full pathogenicity of *Glomerella cingulata*. Mol Plant Microbe Interact, v.20, n.9, Sep, p.1102-11. 2007.
- Trevisan, G. L., E. H. Oliveira, *et al.* Transcription of *Aspergillus nidulans* pacC is modulated by alternative RNA splicing of palB. FEBS Lett, v.585, n.21, Nov 4, p.3442-5. 2011.
- Tusnady, G. E. e I. Simon. The HMMTOP transmembrane topology prediction server. Bioinformatics, v.17, n.9, Sep, p.849-50. 2001.
- Van Veen, H. W. e W. N. Konings. The ABC family of multidrug transporters in microorganisms. Biochim Biophys Acta, v.1365, n.1-2, Jun 10, p.31-6. 1998.
- Vena, G. A., P. Chieco, *et al.* 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.
- Vermout, S., J. Tabart, *et al.* Pathogenesis of dermatophytosis. Mycopathologia, v.166, n.5-6, Nov-Dec, p.267-75. 2008.
- Vitt, U. A., S. Y. Hsu, *et al.* Evolution and classification of cystine knot-containing hormones and related extracellular signaling molecules. Mol Endocrinol, v.15, n.5, May, p.681-94. 2001.
- Vylkova, S., A. J. Carman, *et al.* The fungal pathogen *Candida albicans* autoinduces hyphal morphogenesis by raising extracellular pH. MBio, v.2, n.3, p.e00055-11. 2011.
- Wagener, J., R. K. Malireddi, *et al.* Fungal chitin dampens inflammation through IL-10 induction mediated by NOD2 and TLR9 activation. PLoS Pathog, v.10, n.4, Apr, p.e1004050. 2014.
- 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.
- Wang, L., L. Ma, *et al.* Analysis of the dermatophyte *Trichophyton rubrum* expressed sequence tags. BMC Genomics, v.7, p.255. 2006.
- Wawrzkievicz, K., G. Zitkowska, *et al.* *In vitro* biodegradation of hair from different animal species by *Microsporum canis*. International Biodeterioration & Biodegradation, v.39. 1997.
- 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, *et al.* Generating and testing molecular hypotheses in the Dermatophytes. Eukariotic Cell, v.7, n.8, p.1238-1245. 2008.

Yamada, T., K. Makimura, *et al.* Reproducible genetic transformation system for two dermatophytes, *Microsporum canis* and *Trichophyton mentagrophytes*. Med Mycol, v.43, n.6, Sep, p.533-44. 2005.

Zaugg, C., O. Jousson, *et al.* *Trichophyton rubrum* secreted and membrane-associated carboxypeptidases. Int J Med Microbiol, v.298, n.7-8, Oct, p.669-82. 2008.

Zhao, Y., H. Su, *et al.* The APSES family proteins in fungi: Characterizations, evolution and functions. Fungal Genet Biol, Dec 19. 2014.

Zomorodian, K., U. Uthman, *et al.* The effect of griseofulvin on the gene regulation of beta-tubulin in the dermatophyte pathogen *Trichophyton rubrum*. J Infect Chemother, v.13, n.6, Dec, p.373-9. 2007.

Anexos

A. Relação filogenética entre as sequências dos genes analisados por RT-qPCR

Árvore de distância filogenética entre sequências do gene *pacC* de dermatófitos, *Coccidioides immitis* (CIMG_03725) e *Coccidioides posadasii* (CPC735_005640).

Árvore de distância filogenética entre sequências do gene *gelI* em dermatófitos, *C. immitis* (CIMG_00181) e *C. posadasii* (CPC735_033480).

Árvore de distância filogenética entre sequências do gene *ureD* em dermatófitos, *C. immitis* (CIMG_00328) e *C. posadasii* (CPC735_058660).

Árvore de distância filogenética entre sequências do gene *stuA* em dermatófitos, *C. immitis* (CIMG_00904) e *C. posadasii* (CPC735_054280).

Árvore de distância filogenética entre sequências do gene *sub3* em dermatófitos, *C. immitis* (CIMG_09106) e *C. posadasii* (CPC735_015300).

Árvore de distância filogenética entre sequências do gene *lpl* em dermatófitos, *C. immitis* (CIMG_08300) e *C. posadasii* (CPC735_022400).

Árvore de distância filogenética entre sequências do gene *eglC* em dermatófitos, *C. immitis* (CIMG_06979) e *C. posadasii* (CPC735_033480).

Árvore de distância filogenética entre sequências do gene *chiB1* em dermatófitos, *C. immitis* (CIMG_02795) e *C. posadasii* (CPC735_036390).

Árvore de distância filogenética entre sequências do gene *ocpB* em dermatófitos, *C. immitis* (CIMG_06060) e *C. posadasii* (CPC735_026300).

Árvore de distância filogenética entre sequências do gene *cdo1* em dermatófitos, *C. immitis* (CIMG_03912) e *C. posadasii* (CPC735_004350).

Árvore de distância filogenética entre sequências do gene *ssu1* em dermatófitos, *C. immitis* (CIMG_07333) e *C. posadasii* (CPC735_001270).

Árvore de distância filogenética entre sequências do gene *mdr1* em dermatófitos, *C. posadasii* (CPC735_057020) e *C. immitis* (CIMG_00533).

Árvore de distância filogenética entre sequências do gene *mdr2* de dermatófitos, *C. immitis* (CIMG_06197) e *C. posadasii* (CPC735_027430).

Árvore de distância filogenética entre sequências do gene *mdr4* de dermatófitos, *C. immitis* (CIMG_06852) e *C. posadasii* (CPC735_032570).

B. Artigo submetido

1   **Compensatory expression of three multidrug resistance genes**
2   **coding for ABC transporters in dermatophytes**

3
4
5
6
7   Maíra P. Martins, Ana Carolina C. Franceschini, Tiago R. Jacob, Antonio Rossi and
8   Nilce M. Martinez-Rossi*

9
10   *Department of Genetics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo,*
11   *14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil*

12
13
14
15
16
17   *Corresponding author. Tel: + 55 16 3315 3150; fax: +55 16 3315 0222; E-mail:
18   nmmrossi@usp.br

19
20
21   **Short running title:** Compensatory expression of MDR genes in dermatophytes

22
23
24   **Keywords:** antifungal resistance, MDR, Trichophyton, transcriptional regulation
25
26

Objectives: Genomic sequencing of several dermatophyte species revealed only small differences in genetic content and genome organization, although each fungus had adapted to a specific niche. Thus, it seemed relevant to compare gene expression between species.

Methods: We used qRT-PCR to compare the transcriptional modulation of three multidrug resistance (MDR) genes (*mdr1*, *mdr2*, and *mdr4*) coding for membrane transporter proteins in four species of *Trichophyton*, *T. interdigitale*, *T. rubrum*, *T. tonsurans*, and *T. equinum*, challenged with sub-lethal concentrations of griseofulvin, itraconazole, terbinafine, and amphotericin B, to evaluate the possible functional interaction among these three genes. A mutant strain of *T. interdigitale*, $\Delta mdr2$, was also evaluated for the modulation of the genes encoding MDR1 and MDR4 proteins.

Results: All assayed antifungals induced accumulation of multiple MDR transcripts in several species, suggesting a synergy between these genes. Disruption of the *mdr2* gene in *T. interdigitale* resulted in the accumulation of high levels of *mdr4* transcripts when challenged with griseofulvin, suggesting that *mdr4* gene is compensating for the inactivation of *mdr2* by acting as an efflux pump to provide resistance to this antifungal.

Conclusions: Although the three MDR genes have high homology between the four dermatophytes analysed, it is likely that they have specific functions, suggesting that the action of each drug is dependent on other factors inherent to each species. Our data suggest that MDR genes act synergistically in dermatophytes, and they may compensate for one another when challenged with antifungal drugs. This may be an important cause of therapeutic failure when treating fungal infections.

Introduction

The majority of cutaneous infections are caused by dermatophytes, a specialized group of filamentous fungi that colonizes human skin and nails; i.e. the keratinized tissue of the living host.¹ Although fungal mycoses do not cause pandemics, they have become

an important public health issue. Indeed, recurrence of fungal infections is increasing due to the rising population of the severely immunocompromised, including those with HIV (human immunodeficiency virus) infection and recipients of organ transplantations or chemotherapy treatments.² Despite their importance to public health, only a small number of antifungal drugs are available to treat dermatophytoses. Regardless of the availability and effectiveness of these drugs, a crucial problem concerning the treatment of fungal infections is the occurrence of resistance, where pathogens overcome host defence mechanisms.³⁻⁵

Fungi mediate the transport of many endogenous and exogenous toxic compounds through active transport mechanisms. This is accomplished by two types of efflux pumps localized at the cytoplasmic membrane: the ATP-binding cassette (ABC) transporters, an energy-dependent efflux mechanism mediated by the hydrolysis of ATP, and the major facilitator superfamily (MFS), which are energized by proton gradients across the cell membrane.⁶ ABC transporters are composed of four domains: two integral membrane domains (MDs), each containing six helical transmembrane segments (TMSs), and two nucleotide-binding domains (NBDs).^{6,7} ABC transporters are involved in a variety of processes such as nutrient uptake, pathogenesis, and efflux pumping of structurally unrelated drugs with different modes of action. They act effectively in drug efflux, decreasing the accumulation of cytotoxic agents in the intracellular milieu, and they play a major role in multidrug resistance (MDR) mechanisms.⁸⁻¹⁰ Thus, therapeutic failures, due to the development of fungal resistance, are often associated with efflux pumps in the cell membrane.^{11,12}

Membrane transporters are commonly involved in bacterial and fungal pathogenesis. Many have important roles as virulence factors, ensuring successful colonization of the host environment.¹³ The *mdr1* gene of *Trichophyton interdigitale* encodes an ABC transporter that is over-expressed in the presence of antifungal drugs such as griseofulvin and fluconazole.¹⁴ Moreover, the *mdr2* gene, encoding a different

ABC transporter, showed increased mRNA transcription levels when fungal cells were exposed to cytotoxic drugs such as griseofulvin, fluconazole, tioconazole, and itraconazole, among others¹⁵. Genetic analysis of the *mdr2* knockout ($\Delta mdr2$) strain of *T. interdigitale* showed that a MDR2 transporter-mediated toxicant efflux mechanism modulated susceptibility to terbinafine.¹⁵ Taken together, these results suggest a redundant function for *mdr1* and *mdr2* in modulating fungal susceptibility to some drugs. Furthermore, high transcript levels of the *mdr2* gene in *T. interdigitale* during mimetic infection, and reduced virulence in $\Delta mdr2$ mutants in an *in vitro* infection model, suggest that this transporter is also involved in fungal pathogenicity.⁹

It is accepted that loss-of-function or inhibition of one ABC transporter leads to the activation of alternative transporters, resulting in a compensatory effect that modulates the efflux of antifungal drugs in *Candida albicans*.¹⁶ Despite dermatophytes having similar genetic makeup, a high degree of collinearity, and a small number of unique genes, each fungus has adapted to a highly specific niche, host range, and preference for different proteinaceous substrates, suggesting that specificity may be at the level of gene expression.¹⁷ To explore this possibility, we analysed the transcription patterns of three ABC transporter genes among four related species of dermatophytes, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton equinum*, *Trichophyton tonsurans*, and *T. interdigitale*, as well as its mutant strain $\Delta mdr2$. We comparatively evaluated the involvement of these ABC transporter genes in the multiple drug resistance phenomenon, and examined possible compensatory effects between them. We found that transcription patterns of the ABC transporter genes do not correlate with the phylogeny of the dermatophytes we analysed. In each species, the gene transcription pattern in response to antifungal drug treatment is specific and dependent upon the

antifungal used. We also showed a synergic effect and a compensatory response among these genes when fungi are challenged with antifungal drugs.

Materials and methods

Fungal strains and culture conditions

The following strains were used in this study: *T. rubrum* (CBS118892), *T. equinum* (CBS127.97), and *T. tonsurans* (CBS112818), obtained from the culture collection of the CBS Fungal Biodiversity Centre (Utrecht, The Netherlands); and *T. interdigitale* strain H6 (ATCC MYA-3108), isolated from clinical specimens at the University Hospital of Ribeirão Preto, SP, Brazil, and its $\Delta mdr2$ strain derivative, obtained by an inactivation method, as previously described.¹⁵ The H6 strain, previously identified as *T. rubrum*, was recently reclassified by the Broad Institute as *T. interdigitale* H6. The strains were grown on malt extract agar (MEA; 2% glucose, 2% malt extract, 0.1% peptone, 2% agar, pH 5.7) at 28°C, while the $\Delta mdr2$ strain was grown on MEA supplemented with 400 µg/ml of hygromycin B.

Drug exposure conditions

For drug response assays, 1×10^6 conidia were germinated in 50 ml of Sabouraud dextrose broth (SDB; 2% glucose, 1% peptone, pH 5.7) at 28°C for 96 h under agitation (120 rpm). For each fungus, the resultant mycelia were aseptically transferred to RPMI 1640 (Gibco), incubated for 3 h to allow mycelia to adapt to the medium, and then one sample was harvested by filtration and used as a control experiment. Sub-inhibitory concentrations of amphotericin B (AMB; 0.07 µg/ml), griseofulvin (GRS; 2.8 µg/ml), itraconazole (ITRA; 0.56 µg/ml), or terbinafine (TRB; 0.14 µg/ml), quantities corresponding to 70% of the minimal inhibitory concentration (MIC), were tested for

periods of 15 min and 60 min of drug contact at 28°C, under agitation. The MIC of each drug showed equal value for all species assayed.¹⁸ The resulting mycelia were harvested by filtration and used for RNA extraction.

RNA preparation and cDNA synthesis

The cells were disrupted with a mortar and pestle in liquid nitrogen. Total RNA was isolated using the Illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare, Madison, WI) and reverse transcribed into cDNA by using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA), according to the manufacturer's instructions. The cDNA from three independent biological experiments per fungus/condition was stored at -80°C until PCR amplification.

Gene expression analysis by qRT-PCR

Three genes encoding multidrug efflux transporters that were present in the genome of the four *Trichophyton* species used in this study were selected arbitrarily for gene expression analysis by qRT-PCR. Specific primer pairs were designed on conserved regions of these genes by using Primer 3 software. Primer specificity was confirmed by BLAST searches. The gene IDs, their primer sequences, and qRT-PCR efficiencies are listed in Table 1. All of the measurements and reactions were performed in triplicate. Real-time PCR signals were normalized to the expression of *gapdh* (*T. rubrum* entry TERG_04402) and *-actin* (TERG_06637).¹⁹ qRT-PCR was performed using SYBR green PCR master mix with the StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA). Thermocycler conditions were 95°C for 10 min, followed by 40 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. The $2^{-\Delta\Delta C_q}$ relative expression quantification method was used to calculate the fold change in expression for each gene.²⁰ Analysis was performed using the StepOne Software v2.2. The *T. interdigitale* strain, grown in

RPMI 1640 medium in the absence of drugs, was used as a reference sample to calculate relative gene expression. Gene expression levels are represented by fold changes at each time point relative to the control sample. Bars in the columns represent the standard deviation of data obtained from three independent experiments. Statistical significance was determined using Bonferroni's ad hoc test and indicated by asterisks: * indicates $p < 0.05$; ** indicates $p < 0.01$; *** indicates $p < 0.001$. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA with the GraphPad Prism v 5.1 software.

Serial drop dilution assay

To analyse the effects of *mdr2* gene expression in *T. interdigitale*, serial drop dilution assays were carried out. Five microlitres of a conidia suspension of wild-type *T. interdigitale* or its $\Delta mdr2$ derivative strain was pipetted at different concentrations (10^7 to 10^3 cells/ml) onto solid, rich medium (Malt Extract Agar) plates containing different drugs at sub-inhibitory concentrations. After 48 h and 72 h of incubation at 28 °C, images were taken.

Results and discussion

A major challenge during treatment of dermatophytosis is the small number of commercially available antifungal drugs, minimizing the number of targets that can be exploited to selectively treat these infections.²¹ Therefore, the elucidation of mechanisms used by dermatophytes to invade and colonize their hosts, as well as the signalling mechanisms and metabolic routes activated in response to antifungal drugs, is essential to effectively develop new therapeutic strategies.

To evaluate the mechanisms involved in resistance, susceptibility, and tolerability to the antifungal drugs griseofulvin, itraconazole, terbinafine, and

amphotericin B, we exposed four related species of dermatophytes to sub-lethal concentrations of these drugs, *in vitro*, and then compared the transcription profiles of the ABC transporter genes, *mdr1*, *mdr2*, and *mdr4*. Dermatophytes were exposed to antifungal drugs for 15 or 60 min, to evaluate rapid gene expression changes in ABC transporters in response to different treatments. Although amphotericin B did not appear to be effective in treating dermatophytosis, this drug was active against *T. rubrum* *in vitro*.^{18,22}

Comparisons were performed between *Trichophyton* species, with *T. interdigitale* used as the reference species (Figures 1 to 3). Comparisons between the $\Delta mdr2$ strain and wild-type *T. interdigitale* were performed independently (Figure 4). Transcription profiling did not show a correlation between toxicant efflux and the phylogenetic relationship among these fungi. Although dermatophytes share a similar genetic makeup and genome organization,¹⁷ we observed that species cultured in the same conditions responded to antifungal drugs differently. As previously hypothesized, differences in adaptation to a specific niche, mating, and disease progression among dermatophyte species may be explained by different gene transcription profiles.¹⁷

Transcription levels of the MDR genes respond differently to each drug and incubation period in each strain tested. *mdr1* and *mdr2* transcripts accumulate at significant levels in *T. interdigitale* in the presence of griseofulvin. The *mdr1* and *mdr2* transcript levels were at least 10-fold and 80-fold greater, respectively, as compared to untreated controls (Figures 1 and 2). In both cases, they gradually accumulate over time, suggesting that both *mdr1* and *mdr2* genes are functional and may be involved in the efflux of griseofulvin in *T. interdigitale*. Interestingly, the accumulation of *mdr4* transcripts in this species occurs in response to both amphotericin B and terbinafine, but poorly accumulates in response to griseofulvin (Figure 3). Furthermore, the *mdr4*

transcript levels that accumulated in *T. interdigitale* in the early minutes after exposure to amphotericin B, diminished, an effect not observed for terbinafine. Pre-mRNAs transcribed from the *mdr4* gene are the same product; however, they probably have different processing pathways before or after mRNA maturation that are dependent on antifungal signalling.

Unlike *T. interdigitale*, *T. rubrum* and *T. equinum* accumulate *mdr1* transcripts in the presence of amphotericin B. In addition, these transcript levels were in *T. equinum* about 30-fold greater in the presence of itraconazole, when compared to *T. interdigitale*. This is the only species that accumulates high levels of *mdr1* transcripts in the presence of itraconazole, under our experimental conditions. However, insignificant levels of *mdr1* transcripts accumulated when *T. tonsurans* was challenged with any of the four antifungal drugs (Figure 1). A previous report shows that when *T. interdigitale* was exposed to sub-inhibitory concentrations of ketoconazole, fluconazole, or griseofulvin for 30 min, *mdr1* expression increased.¹⁴

Conversely, *mdr2* transcripts accumulate in *T. rubrum* and *T. equinum* after exposure to all tested antifungal agents, suggesting that this gene has an important role in susceptibility to various antifungal drugs. This response was not observed in *T. interdigitale* or *T. tonsurans*. However, it is important to note that *T. rubrum* and *T. equinum* accumulated *mdr2* transcripts even in the absence of drug treatment, which indicated there may be other functions for this gene related to fungal nutrition. In addition, *T. rubrum* and *T. equinum* accumulated high levels of this transcript, especially in the presence of itraconazole. Interestingly, in *T. equinum*, the transcript levels accumulated during early exposure to amphotericin B and griseofulvin decrease after 60 min exposure, an effect not observed for itraconazole and terbinafine (Figure 2). We previously showed that transcription of *mdr2* was upregulated after a 15-min

exposure of *T. interdigitale* to other antifungal drugs such as fluconazole and acriflavine.^{15,23} In addition, down-regulation of this gene after exposure to acriflavine for 3 h²⁴ indicated that the MDR2 transporter might be activated during early exposure to these drugs.

Accumulation of *mdr4* transcripts does not follow a pattern among the four species. While the presence of amphotericin B and terbinafine induce accumulation of *mdr4* in *T. interdigitale*, *T. rubrum*, and *T. equinum*, the presence of itraconazole induces *mdr4* transcript accumulation in *T. rubrum*, *T. tonsurans*, and *T. equinum*. In fact, the presence of any of the four drugs induced high levels of *mdr4* transcription in *T. equinum*, while these transcripts are induced in *T. tonsurans* only in the presence of itraconazole (Figure 3). The differences between *T. tonsurans* and *T. equinum* were not expected since they are the most closely related species, containing the highest percentage of collinear genes.¹⁷ We also observed increased accumulation of *mdr4* transcripts in *T. rubrum*, relative to its exposure time to acriflavine. This suggests that *mdr4* is transcribed over time, presuming that high efflux of toxicants occurs during long periods of exposure.²⁴

Disruption of the *mdr2* gene slightly affected the expression level of *mdr1* in *T. interdigitale* challenged with griseofulvin. However, the mutant strain accumulated high levels of *mdr4* transcripts in the presence of griseofulvin as compared to that observed in the wild-type strain. This suggested that the *mdr4* gene compensated for the inactivation of *mdr2* by acting as an efflux pump to provide resistance to this antifungal drug (Figure 4). This result may explain why there was no difference between the Δ *mdr2* and wild-type strains with respect to the level of susceptibility to griseofulvin (Figure 5).¹⁵

In contrast, expression of the *mdr4* gene in the Δ *mdr2* mutant is down-regulated when the fungus was challenged with amphotericin B or terbinafine, suggesting that the transcription level of the *mdr4* gene somehow depends on the MDR2 transporter when *T. interdigitale* is challenged with these antifungals (Figure 4). This indicates that a cooperative effect may exist that contributes to MDR via network interactions.²⁵ Indeed, compared to the wild-type strain, Δ *mdr2* displayed increased sensitivity to terbinafine and amphotericin B (Figure 5).

Conclusions

Whole-genome sequencing of five dermatophytes, accomplished by the Broad Institute, allowed the identification of a number of genes, such as those of the large family of ABC transporters, as well as the comparison of gene transcription patterns between these dermatophytes when challenged with four antifungal drugs. We provide evidence that the expression of MDR transporters does not correlate with the phylogeny of these dermatophytes, in spite of the different species being highly related in gene content and genome organization. Indeed, MDR gene transcription in each species responds to each antifungal in a different manner, i.e., the effect of antifungal drugs should be considered in view of the expression of each gene. It is important to note that differences in mRNA processing observed during *mdr4* gene transcription in *T. interdigitale* challenged with amphotericin B or terbinafine is likely a metabolic response dependent on antifungal signalling mechanisms. Furthermore, transcription of the *mdr4* gene is almost abolished in Δ *mdr2* mutant, indicating that the transcription of *mdr4* is dependent on the function of the *mdr2* gene. Interestingly, the expression of the *mdr4* gene can compensate, apparently, for the inactivation of the *mdr2* gene when the fungus is challenged with griseofulvin. Thus, the results presented here revealed novel aspects of the antifungal-

sensing network, emphasizing the complexity of metabolic modulation exerted by
antifungal drugs in dermatophytes.

Acknowledgements

We thank Oliveira, V.M. and Martins, M.D. for technical support.

Funding

This work was supported by grants from the Brazilian Funding Agencies: Fundação de
Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), (Grant No 2008/58634-7),
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), (Grants No
305252/2013-5 and 304222/2013-5), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de
Nível Superior (CAPES) and, Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência
(FAEPA).

Transparency declarations

None to declare.

References

- 1 Grumbt M, Monod M, Yamada T *et al.* Keratin degradation by dermatophytes relies on cysteine dioxygenase and a sulfite efflux pump. *J Invest Dermatol* 2013;**133**:1550-5.
- 2 Richardson MD. Changing patterns and trends in systemic fungal infections. *J Antimicrob Chemother* 2005;**56 Suppl 1**:i5-i11.
- 3 Cho EJ, Shin JH, Kim SH *et al.* Emergence of multiple resistance profiles involving azoles, echinocandins and amphotericin B in *Candida glabrata* isolates from a neutropenia patient with prolonged fungaemia. *J Antimicrob Chemother* 2014;**doi: 10.1093/jac/dku518**.
- 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.

- 315 **5** Rocha EMF, Gardiner RE, Park S *et al.* A Phe389Leu substitution in ErgA confers terbinafine
316 resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;**50**:2533-6.
- 317 **6** Del Sorbo G, Schoonbeek H, De Waard MA. Fungal transporters involved in efflux of natural
318 toxic compounds and fungicides. *Fungal Genet Biol* 2000;**30**:1-15.
- 319 **7** Walker JE, Saraste M, Runswick MJ *et al.* Distantly related sequences in the alpha- and beta-
320 subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common
321 nucleotide binding fold. *EMBO J* 1982;**1**:945-51.
- 322 **8** Higgins CF. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* 1992;**8**:67-
323 113.
- 324 **9** Maranhão FCA, Paião FG, Fachin AL *et al.* Membrane transporter proteins are involved in
325 *Trichophyton rubrum* pathogenesis. *J Med Microbiol* 2009;**58**:163-8.
- 326 **10** Wirsching S, Michel S, Kohler G *et al.* Activation of the multiple drug resistance gene
327 MDR1 in fluconazole-resistant, clinical *Candida albicans* strains is caused by mutations in a
328 trans-regulatory factor. *J Bacteriol* 2000;**182**:400-4.
- 329 **11** Martinez-Rossi NM, Peres NTA, Rossi A. Antifungal resistance mechanisms in
330 dermatophytes. *Mycopathologia* 2008;**166**:369-83.
- 331 **12** Prasad R, Gaur NA, Gaur M *et al.* Efflux pumps in drug resistance of *Candida*. *Infect Disord*
332 *Drug Targets* 2006;**6**:69-83.
- 333 **13** Mishra NN, Prasad T, Sharma N *et al.* Pathogenicity and drug resistance in *Candida*
334 *albicans* and other yeast species. A review. *Acta Microbiol Immunol Hung* 2007;**54**:201-35.
- 335 **14** Cervelatti EP, Fachin AL, Ferreira-Nozawa MS *et al.* Molecular cloning and characterization
336 of a novel ABC transporter gene in the human pathogen *Trichophyton rubrum*. *Med Mycol*
337 2006;**44**:141-7.
- 338 **15** Fachin AL, Ferreira-Nozawa MS, Maccheroni W, Jr. *et al.* Role of the ABC transporter
339 TruMDR2 in terbinafine, 4-nitroquinoline N-oxide and ethidium bromide susceptibility in
340 *Trichophyton rubrum*. *J Med Microbiol* 2006;**55**:1093-9.
- 341 **16** Sanglard D, Ischer F, Monod M *et al.* Cloning of *Candida albicans* genes conferring
342 resistance to azole antifungal agents: characterization of CDR2, a new multidrug ABC
343 transporter gene. *Microbiology* 1997;**143** (Pt 2):405-16.
- 344 **17** Martinez DA, Oliver BG, Graser Y *et al.* Comparative Genome Analysis of *Trichophyton*
345 *rubrum* and Related Dermatophytes Reveals Candidate Genes Involved in Infection. *MBio*
346 2012;**3**.
- 347 **18** Coelho LM, Aquino-Ferreira R, Maffei CML *et al.* In vitro antifungal drug susceptibilities of
348 dermatophytes microconidia and arthroconidia. *J Antimicrob Chemother* 2008;**62**:758-61.

349 **19** Jacob TR, Peres NT, Persinoti GF *et al.* *rpb2* is a reliable reference gene for quantitative
350 gene expression analysis in the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *Med Mycol* 2012;**50**:368-
351 77.

352 **20** Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time
353 quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;**25**:402-8.

354 **21** Shapiro RS, Robbins N, Cowen LE. Regulatory circuitry governing fungal development,
355 drug resistance, and disease. *Microbiol Mol Biol Rev* 2011;**75**:213-67.

356 **22** Fernandez-Torres B, Carrillo AJ, Martin E *et al.* In vitro activities of 10 antifungal drugs
357 against 508 dermatophyte strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;**45**:2524-8.

358 **23** Paião FG, Segato F, Cursino-Santos JR *et al.* Analysis of *Trichophyton rubrum* gene
359 expression in response to cytotoxic drugs. *FEMS Microbiol Lett* 2007;**271**:180-6.

360 **24** Persinoti GF, Peres NTA, Jacob TR *et al.* RNA-seq *Trichophyton rubrum* transcriptome
361 analysis in response to the cytotoxic drug acriflavine. *BMC Genomics* 2014;**15**:S1.

362 **25** Yibmantisiri P, Bircham PW, Maass DR *et al.* Networks of genes modulating the pleiotropic
363 drug response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biosyst* 2014;**10**:128-37.
364

Figure 1.

Expression level of *mdr1*, as determined by qRT-PCR. Strains *T. interdigitale*, *T. equinum*, *T. rubrum*, and *T. tonsurans* were cultured in RPMI media (control) or RPMI media containing sub-inhibitory concentrations of amphotericin B (AMB), griseofulvin (GRS), itraconazole (ITRA) or terbinafine (TRB) with 15 min or 60 min of exposure time. Gene expression levels represented by the fold change at each time point, relative to that in the *T. interdigitale* control strain. Bars in the columns represent the standard deviation of data from three independent experiments. Statistical significance was determined using Bonferroni's ad hoc test and indicated by asterisks: * indicates $p < 0.05$; ** indicates $p < 0.01$; *** indicates $p < 0.001$. The statistical analysis above correlates the *T. interdigitale* control among all fungi. The statistical analysis below correlates each fungus with its control experiment.

383
384

385
386

387

Figure 2.

388

Expression level of *mdr2*, as determined by qRT-PCR. Strains *T. interdigitale*, *T.*

389

equinum, *T. rubrum*, and *T. tonsurans* were cultured in RPMI media (control) or RPMI

390

media containing sub-inhibitory concentrations of amphotericin B (AMB), griseofulvin

391

(GRS), itraconazole (ITRA) or terbinafine (TRB) with 15 min or 60 min of exposure

392

time. Gene expression levels represented by the fold change at each time point, relative

393

to that in the *T. interdigitale* control strain. Bars in the columns represent the standard

394

deviation of data from three independent experiments. Statistical significance was

395

determined using Bonferroni's ad hoc test and indicated by asterisks: * indicates $p <$

396

0.05; ** indicates $p < 0.01$; *** indicates $p < 0.001$. The statistical analysis above

397

correlates the *T. interdigitale* control among all fungi. The statistical analysis below

398

correlates each fungus with its control experiment.

399

Figure 3.

Expression level of *mdr4*, as determined by qRT-PCR. Strains *T. interdigitale*, *T. equinum*, *T. rubrum*, and *T. tonsurans* were cultured in RPMI media (control) or RPMI media containing sub-inhibitory concentrations of amphotericin B (AMB), griseofulvin (GRS), itraconazole (ITRA) or terbinafine (TRB) with 15 min or 60 min of exposure time. Gene expression levels represented by the fold change at each time point, relative to that in the *T. interdigitale* control strain. Bars in the columns represent the standard deviation of data from three independent experiments. Statistical significance was determined using Bonferroni's ad hoc test and indicated by asterisks: * indicates $p < 0.05$; ** indicates $p < 0.01$; *** indicates $p < 0.001$. The statistical analysis above correlates the *T. interdigitale* control among all fungi. The statistical analysis below correlates each fungus with its control experiment.

419
420
421

422
423

Figure 4.

424 Expression level of *mdr1* (above) and *mdr4* (below), as determined by qRT-PCR. *T.*
425 *interdigitale* (wild type and $\Delta mdr2$ mutant) was cultured in RPMI media (control) or
426 RPMI media containing sub-inhibitory concentrations of amphotericin B (AMB),
427 griseofulvin (GRS), itraconazole (ITRA) or terbinafine (TRB) with 15 min or 60 min of
428 exposure time. Gene expression levels represented by the fold change at each time
429 point, relative to that in the wild type strain. Bars in the columns represent the standard
430 deviation of data from three independent experiments. Statistical significance was
431 determined using Bonferroni's ad hoc test and indicated by asterisks: * indicates $p <$
432 0.05; ** indicates $p < 0.01$; *** indicates $p < 0.001$.

433

434
435

436
437

Figure 5.

438 Effect of *mdr2* on the phenotype of *Trichophyton interdigitale* challenged with
439 amphotericin B (0.07 μ g/ml), griseofulvin (0.04 μ g/ml), itraconazole (0.002 μ g/ml), and
440 terbinafine (0.008 μ g/ml). Conidia were inoculated onto the MEA plates with or without
441 drugs at 10-fold serial dilutions (1 $\times$ 10⁷ cells in the first position). Cells were incubated
442 at 28 °C for 48 h (A) and 72 h (B).

443
444
445

446 **Table 1.** A summary of the genes evaluated, primer sequences, amplicon length, and qRT-PCR efficiency
 447

Gene Product Name	ID ^a	Primers (5' - 3')	Amplicon length (bp)	Efficiency (%)
ABC transporter (MDR1)	TERG_02508			
	TEQG_01571	F: CCTAATGCCCTTCCTGGATT		
	H101_00538	R: AAATTGCCAGCTCGTTCTGT	130	106.9
	TESG_01875			
Multidrug resistance protein (MDR2)	TERG_08613			
	TEQG_03450	F: TGACTCTGAATCCGAAAAGG		
	H101_02705	R: GTCGGTGAGCAACAGCAATA	83	95.6
	TESG_00664			
ABC multidrug transporter (MDR4)	TERG_07801			
	TEQG_08364	F: GGAAATTGAGCTTCGAGACG		
	H101_05743	R: TTCCAACGATAGCAGTGTGC	113	94.2
	TESG_00713			
Actin	TERG_06637			
	TEQG_07086	F: TGTTGGTGATGAGGCACAGT		
	H101_07683	R: CCATGTCATCCCAGTTTGTG	89	101.6
	TESG_07815			
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	TERG_04402			
	TESG_06829	F: GCGTGACCCAGCCAACA		
	H101_06863	R: TTGGCACCTCCCTTCAAGT	114	102.6
	TESG_06829			

448
 449 ^a Gene access number in *T. rubrum* genome available at Broad Institute Database
 450 (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/dermatophyte_comparative/MultiHome.html)