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

MARCOS EDUARDO RAMOS LOPES

Mecanismo molecular envolvido na regulação de um gene codificador de bomba de efluxo de fármacos no dermatófito *Trichophyton rubrum*

Ribeirão Preto - SP
2021

MARCOS EDUARDO RAMOS LOPES

Mecanismo molecular envolvido na regulação de um gene codificador de bomba de efluxo de fármacos no dermatófito *Trichophyton rubrum*

Versão corrigida

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

Área de Concentração: Genética

Orientadora: Profa. Drª. Nilce Maria Martinez-Rossi

Coorientadora: Drª. Tamires Aparecida Bitencourt

Ribeirão Preto - SP
2021

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 à fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Lopes, Marcos Eduardo Ramos

Mecanismo molecular envolvido na regulação de um gene codificador de bomba de efluxo de fármacos no dermatófito *Trichophyton rubrum*/Marcos Eduardo Ramos Lopes; orientadora: Nilce Maria Martinez-Rossi; coorientadora: Tamires Aparecida Bitencourt.
75p. : il.

Dissertação (Mestrado em ciências) apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP – Área de concentração: Genética. Ribeirão Preto – 2021.

1. Dermatófitos; 2. MDRs; 3. Transportadores 4. Retenção de íntron; 5. Biofilme

Nome: LOPES, Marcos Eduardo Ramos

Título: Mecanismo molecular envolvido na regulação de um gene codificador de bomba de efluxo de fármacos no dermatófito *Trichophyton rubrum*.

Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de mestre em Ciências. Área de concentração: Ciências Biológicas (Genética)

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

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

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP

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

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil – CNPq

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

Normalização Adotada

Este documento foi elaborado de acordo com:

As normas brasileiras em documentação do Comitê Brasileiro (ABNT/CB-014): NBR 6023, NBR 6024, NBR 6027 e NBR 6028.

Universidade de São Paulo. Sistema Integrado de Bibliotecas. Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: documento eletrônico e impresso Parte I (ABNT), São Paulo, 2019.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer inteiramente a minha mãe Cleide Ramos, por toda a educação que me deu, por toda a dedicação que tem por nossa família, por todo o amor dado e por acreditar em mim, eu só cheguei aqui por sua causa. Obrigado, Mãe!

Gostaria de agradecer também ao meu irmão Antônio Carlos, pelo apoio dado durante esse trajeto, por acreditar em mim e por todo amor e carinho que tem comigo. Agradecer também aos meus amigos, Higor Oliveira, Ilson Antunes, Leliane Antunes, Gabriel Mesquita, Rodrigo Marquiori, Janaína Souza, Marco Barbaresco, Silmara Moreira, Claudio Luiz, Nielson Félix e Karen Maraboli, pela amizade, por todos os conselhos dados, por momento de reflexões juntos, pela companhia, mesmo à distância, pelos meetings e pelos momentos de risadas! Vocês foram essenciais para que eu conseguisse alcançar mais esse objetivo na vida. Obrigado.

Gostaria de agradecer imensamente ao programa de pós-graduação em Genética da FMRP-USP por não medir esforços para que esse projeto de pesquisa fosse executado da melhor forma, e também ao laboratório de Genética e Biologia molecular de fungos filamentosos pela estrutura e pela oportunidade de atuar com a equipe.

O meu muito obrigado a minha coorientadora Tamires Aparecida Bitencourt, por todo acolhimento que teve comigo, pelo profissionalismo, por todos ensinamentos e cuidado, paciência em me ensinar as técnicas, a analisar e refletir os dados obtidos, pelos conselhos, convivência e amizade. Obrigado Tamires! É muito bom trabalhar junto com uma profissional de excelência como você.

Gratidão pelos funcionários do laboratório por todo suporte técnico que recebi durante a execução do projeto. Obrigado Cuca, Marcos, Pablo e Mendelson. Um muito obrigado aos colegas e ex-colegas de laboratório, Júlio César, Jéssica Fernanda, Larissa Ribeiro, João Neves, Flaviane Rocha, Carlos Henrique e Maíra Pompeu, pela convivência, discussões, ideias e ajuda em alguns experimentos. Obrigado pessoal!

E minha eterna gratidão a minha orientadora Profa. Dra. Nilce Maria Martinez-Rossi e ao professor Dr Antonio Rossi Filho, por me receberem em seu laboratório e acreditarem em

mim, pela paciência, conselhos e pela orientação. Para realizar os sonhos, as pessoas precisam de oportunidades, e eu sou muito grato às oportunidades que vocês me deram.

Agradeço aos órgãos financiadores FAPESP, CAPES, CNPQ e FAEPA

RESUMO

LOPES, M.E.R. **Mecanismo molecular envolvido na regulação de um gene codificador de bomba de efluxo de fármacos no dermatófito *Trichophyton rubrum*.** 2021**.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto , Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – SP.

Dermatófitos são fungos que causam uma variedade de micoses de pele, cabelos, pelos e unhas em animais e humanos. Eles acometem tecidos queratinizados provocando dermatofitoses, como a causada pelo patógeno humano *Trichophyton rubrum*. O tratamento da infecção fúngica é desafiador, pois o fungo pode apresentar resistência aos antifúngicos. As bombas de efluxo, presentes na membrana celular, fazem o efluxo de diferentes antifúngicos, sendo um mecanismo frequentemente associado à resistência a múltiplas drogas (MDR - *multidrug resistance*). Além disso, os fungos podem realizar ajustes finos via *splicing* alternativo (SA) como estratégia adaptativa frente a diferentes estímulos. A retenção de íntron (RI) é um tipo de SA, e parece ser o mais frequente em Ascomycetos. Dessa forma, o objetivo desse projeto foi investigar a ocorrência de SA em genes que codificam para proteínas transportadoras MDRs em *T. rubrum* após exposição a drogas antifúngicas. Dados de RNA-Seq de *T. rubrum* em resposta aos antifúngicos ácido undecanóico e acriflavina foram utilizados para a triagem destes genes. O gene identificado como TERG_04309 que codifica um transportador ABC se destacou por apresentar um número expressivo de RI 3 e 4. Subsequentemente, foram realizados cultivos de *T. rubrum* na presença dos antifúngicos Ácido Undecanóico (UDA), Caspofungina (CASP), Itraconazol (ITR) e Terbinafina (TRB) e a modulação das isoformas da TERG_04309 foi avaliada por RT-PCR e RT-qPCR, com o objetivo de verificar se este fenômeno se aplicariaa outros fármacos de diferentes mecanismos de ação. Resultados de RT-qPCR demonstraram a indução da isoforma com o íntron-3 retido após 12 h de exposição ao ITR e a indução da isoforma com íntron-4 retido, após 1h e 12 h de exposição a CASP. Foi observado também a indução proeminente da isoforma convencional após exposição do fungo a TRB e ITR. Paralelamente, genes que putativamente interagem com TERG_04309 tiveram suas modulações avaliadas. Um deles, a TERG_04224, que também codifica uma bomba de efluxo teve sua expressão induzida nas condições de 1h CASP e 12h ITR. Isto indica a co-expressão de TERG_04309 e TERG_04224. Em muitos casos, a RI desencadeia proteínas truncadas e com perdas de domínios, assim seria concebível que as isoformas provenientes de SA fossem não funcionais. Entretanto, o alinhamento das isoformas alternativas com proteínas ortólogas mostra semelhanças entre elas, o que sugere que as isoformas oriundas da RI do gene TERG_04309 podem manter suas funções, com prováveis alterações na afinidade e efetividade na extrusão. Adicionalmente, a modulação das isoformas de TERG_04309 foi avaliada em biofilmes maduros de *T. rubrum* após exposição às drogas CASP e TRB por 1h. Foi evidenciada a indução de ambas as isoformas alternativas após a exposição à CASP, sugerindo que elas têm função no efluxo de drogas. Portanto, os presentes resultados indicam que o *T. rubrum* tem respostas tempo e composto-específicos, que envolve além dos mecanismos regulatórios convencionais, um mecanismo alternativo proveniente de SA, que ocorre tanto nas fases de crescimento planctônico como na forma de biofilmes.

Palavras-chave: Dermatófitos; MDRs; Transportadores; Retenção de íntron; Biofilme.

ABSTRACT

LOPES, M.E.R. **Molecular mechanism involved in the regulation of a gene encoding a drug efflux pump in the dermatophyte *Trichophyton rubrum*.** 2021**.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto , Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – SP.

Dermatophytes are fungi that cause various mycoses of skin, hair, and nails in animals and humans. They affect keratinized tissues causing dermatophytoses, such as that caused by the human pathogen *Trichophyton rubrum*. The treatment of fungal infection is challenging, as the fungus can show resistance to antifungals. Efflux pumps, present in the cell membrane, extrude different antifungals from the cells, being a mechanism often associated with multidrug resistance (MDR). In addition, fungi can make fine adjustments via alternative splicing (SA) as an adaptive strategy in the face of different stimuli. Intron retention (IR) is one of the types of AS and appears to be the most frequent in Ascomycetes. Thus, this project's objective was to investigate the occurrence of AS in genes that code for multidrug transporter proteins in *T. rubrum* after exposure to antifungal drugs. We used *T. rubrum* RNA-Seq data in response to undecanoic acid and acriflavine antifungals to screen for these genes. The gene identified by TERG_04309, which encodes a multidrug transporter protein, stood out for having an expressive number of introns 3 and 4 retentions. Subsequently, cultures of *T. rubrum* were performed in the presence of the antifungals Undecanoic Acid (UDA), Caspofungin (CASP), Itraconazole (ITR), and Terbinafine (TRB), and the modulation of the TERG_04309 isoforms was evaluated by RT-PCR and RT-qPCR. The objective was to assess whether this phenomenon would apply to other drugs with different mechanisms of action. Results from RT-qPCR demonstrated that the induction of the isoform with retained intron 3 was detected after 1 h of exposure to ITR and induction of the isoform with retained intron-4 after 1 h and 12 h of exposure to CASP. It was also observed a prominent induction of the conventional isoform after exposure of the fungus to TRB and ITR. In parallel, genes that putatively interact with TERG_04309 had their modulations evaluated. One of them, TERG_04224, which also encodes an efflux pump, had its expression induced under CASP conditions at 1h and ITR conditions at 12h. This result indicates co-expression of TERG_04309 and TERG_04224. It's well known in many cases that IR triggers truncated proteins with a loss of domains, so it is conceivable that alternative isoforms would be non-functional. However, the alignment of alternative isoforms with orthologues displayed similarities between them, which suggested that isoforms obtained from IR of gene identified by TERG_04309 might keep their functions, with possible changes regarding affinity or effectivity in extrusion. In addition, the modulation of the TERG_04309 isoforms was evaluated in mature *T. rubrum* biofilms after exposure to CASP and TRB drugs for 1 h. The induction of both alternative isoforms was evidenced after exposure to CASP, suggesting that they have a role in the efflux of drugs. Therefore, the present results indicate that *T. rubrum* has time-and compound-specific responses, which involves, in addition to conventional regulatory mechanisms, an alternative mechanism originating from AS, which occurs both in planktonic growth phases and in the form of biofilms.

Keywords: Dermatophytes. MDRs. Conveyors. Intron retention. Biofilm.

.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Aspecto morfológico de *T. rubrum*..... 18

Figura 2. Estrutura química da TRB.....20

Figura 3. Estrutura química de ITR.....21

Figura 4. Estrutura química da CASP.....22

Figura 5. Estrutura química do UDA.....23

Figura 6. Topologia de diferentes subfamílias de transportadores ABC em fungos....25

Figura 7. Topologia de transportadores ABC e MSF.....27

Figura 8: Etapas da formação de biofilme em *C. albicans*.....30

Figura 9. Tipos de *splicing* alternativo.....31
.
Figura 10. Representação esquemática do gene TERG_04309.....45

Figura 11. Isoformas proteica do gene TERG_04309 (Transportador ABC).....47

Figura 12. Representação tridimensional das proteínas putativas codificadas pelo gene TERG_04309.....47

Figura 13. Proteína codificada pelo gene TERG_04309 em *T. rubrum* e seus ortólogos em diferentes fungos.....48

Figura 14. Proteína codificada pelo gene TERG_04309 na linhagem CBS118296 de *T. rubrum* e em outras diferentes linhagens da mesma espécie.....49

Figura 15. Análise filogenética da proteína codificada pelo gene TERG_04309 em diferentes linhagens de *T. rubrum* e em fungos de diferentes espécies.....50

Figura 16. Rede de interação do gene TERG_04309 (Transportador ABC) de *T. rubrum* com outros genes.....52

Figura 17. Amplificação do fragmento de 468 pb do gene β-tubulina nas amostras de cDNA do fungo cultivado na presença de antifúngicos ou de 527pb no DNA genômico utilizado como controle positivo.....54

Figura 18. Amplificação do fragmento de 253 pb ou de 315pb do gene β-tubulina nas amostras de cDNA ou DNA genômico, respectivamente.....55

Figura 19. RT-PCR feito utilizando primers flanqueadores do íntron-3 do gene TERG_04309.....55

Figura 20. RT-PCR feito utilizando primers flanqueadores do íntron-4 do gene TERG_04309.....56

Figura 21. Análise de RT-qPCR dos níveis de retenção de íntron-3 do gene de *T. rubrum* TERG_04309.....56

Figura 22. Análise de RT-qPCR dos níveis de retenção de íntron-4 do gene TERG_04309 de *T. rubrum*.....57

Figura 23. Análise de RT-qPCR dos níveis de expressão total do gene TERG_04309 do *T. rubrum*.....58

Figura 24. Análise de qRT-PCR dos níveis de expressão total do gene TERG_04224 do *T. rubrum*.....60

Figura 25. Análise de RT-qPCR dos níveis de expressão total do gene TERG_03468 de *T. rubrum*.....61

Figura 26. Análise de RT-qPCR dos níveis de expressão total do gene TERG_00588 de *T. rubrum*.....61

Figura 27. Análise de RT-qPCR dos níveis expressão das diferentes isoformas do gene TERG_04309 de *T. rubrum* após 1 h de exposição do biofilme aos antifúngicos.....62

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. A ocorrência de diferentes transportadores do tipo ABC em diferentes dermatófito.....27

Tabela 2. Constituintes do Meio de Extrato Malte – MEA (Malt Extract Agar).....38

Tabela 3. Constituintes do meio RPMI 1640.....39

Tabela 4. Primers usados nos ensaios de RT-PCR.....41

Tabela 5. Primers usados nos ensaios de RT-qPCR.....42

Tabela 6. Concentração inibitória mínima dos fármacos utilizados.....43

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....17

1.1 Dermatófitos 17

1.2 Agentes antifúngicos 19

1.2.1 Itraconazol e Terbinafina 20

1.2.2 Caspofungina 22

1.2.3 Ácido Undecanóico 22

1.3 Mecanismos de resistência aos antifúngicos: proteínas transportadoras.....23

1.4 Biofilmes 28

1.5 *Splicing* convencional e *splicing* altertivo.....30

2 JUSTIFICATIVA 34

3 HIPÓTESE 34

4 OBJETIVOS 36

5 ESTRATÉGIAS 36

6 MATERIAL E MÉTODOS 38

6.1 Linhagens 38

6.2 Meios de cultura 38

6.2.1 Meio de Extrato de Malte – MEA 38

6.2.2 Meio RPMI 38

6.3 Condições de Cultivos: 39

6.3.1 Cultivo de *T. rubrum* em meio + antifúngicos 39

6.3.2 Ensaio de formação de biofilme 40

6.4 Extração de RNA total 40

6.5 Síntese de cDNA 41

6.6 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores para RT-PCR e RT-qPCR.....41

6.7 Concentração Inibitória Mínima utilizada 42

6.8 Técnicas de validação (RT-PCR e RT-qPCR) 43

6.9 Análises *in silico* das consequências das isoformas utilizando ferramenta de bioinformática 43

6.10 Análise *in sílico* da formação de rede de interação.....43

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO 45

7.1 Análises de bioinformática 45

7.1.1 Análise *in silico* dos genes que codificam para transportadores de drogas e as consequências das suas diferentes isoformas proteicas utilizando ferramentas de Bioinformática.....45

7.1.2 Análise de rede de interação gênica 51

7.2 Técnicas de validação de *splicing* alternativo 54

7.2.1 Validação de *splicing* alternativo por RT-PCR dos genes estudados em resposta aos antifúngicos. 54

7.2.2 Modulação das diferentes isoformas produzidas dos genes analisados por RT-qPCR em resposta aos antifúngicos.....56

8. CONCLUSÕES 65

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 67

Introdução

1 Introdução:

1.1 Dermatófitos:

Dermatófitos são fungos que causam uma variedade de micoses de pele, cabelos, pelos e unhas em animais e humanos. A doença pode acometer diversos lugares do corpo, como o pé (clinicamente denominado *tinea pedis*), a virilha (*tinea cruris*), a pele (*tinea corporis*) ou o cabelo (*tinea capitis*) (Martinez *et al.*, 2012), em decorrência da colonização das camadas queratinizadas do corpo (Laksmipathy and Kannabiran, 2010). Estão classificados em 7 gêneros: *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*, *Arthroderma*, *Lophophyton*, *Nannizzia* e *Paraphyton* (De Hoog *et al.*, 2017).

As espécies de dermatófitos podem ainda ser classificadas em 3 grupos de acordo com seu nicho de associação primário sendo os antropofílicos encontrados preferencialmente em seres humanos, zoofílicos encontrados em animais e podem ser ocasionalmente transmitidos para humanos, e os geofílicos encontrados no solo e apenas raramente em infecções humanas (White *et al.*, 2008). As espécies zoofílicas são responsáveis por cerca de 30% das dermatofitoses humanas, enquanto as espécies antropofílicas são responsáveis por cerca de 70%, causando doenças crônicas, com progressão lenta, sugerindo uma adaptação evolutiva aos hospedeiros humanos (White *et al.*, 2008; Peres *et al.*, 2010). A transmissão das dermatofitoses pode ocorrer através do contato direto com animais e humanos infectados, ou indireto por fômites contaminadas (Peres *et al.*, 2010). A natureza contagiosa da infecção por dermatófitos torna a propagação fácil, acometendo pessoas saudáveis, e também a propagação de um animal para um humano, bem como a infecção ser transferida de um sítio anatômico para outro no mesmo indivíduo (Al-Khikani, 2020).

Das 51 espécies de dermatófitos descritas atualmente, pelo menos 40 são conhecidas por serem patógenos humanos (White *et al.*, 2008; De Hoog *et al.*, 2017; Al-Khikani, 2020). *Trichophyton rubrum* é uma espécie de dermatófito considerada cosmopolita, e é o agente etiológico mais comum em casos clínicos de micose superficial em todo o mundo, tendo sua maior incidência na Europa (Nenoff *et al.*, 2014; Mendes *et al.*, 2018). Da mesma forma, estudos demonstram a prevalência de *T. rubrum* entre os casos de dermatofitoses em diferentes regiões do Brasil (Godoy-Martinez *et al.*, 2009; Heidrich *et al.*, 2015; Silva-Rocha *et al.*, 2017). Essa espécie possui hifas multisseptadas de crescimento lento, de coloração branca, com aspecto cotonoso, sendo que no reverso a colônia apresenta uma coloração vermelho escura devido à produção de pigmentos que se difundem no meio de cultura, quando cultivado em meio Sabouraud (**Figura 1**) (Kern e Blevenis, 2004).

No corpo humano, o fungo *T. rubrum* possui como estruturas-alvo o estrato córneo da epiderme e a queratina da unha, raramente afetando o cabelo ou a raiz do cabelo (Nenoff *et al.*, 2014). Essas infecções apresentam características gerais como o aparecimento gradual de lesões eritomatosas anulares, bem como descamações, pústulas, coceira, perda de unhas (Bouchara *et al.*, 2017; Al-Khikani, 2020). Algumas condições favorecem a propagação e o estabelecimento da dermatofitose, como por exemplo a umidade e clima quente. Dessa forma, essas infecções são mais comuns em países tropicais (Havlickova *et al.*, 2008). Além disso, outros fatores podem contribuir para uma alta disseminação da doença, tais como a falta de higiene adequada, comunidades com baixo *status* socioeconômico e lugares onde há convívio de muitas pessoas, o que favorece o contato interpessoal (Havlickova *et al.*, 2008).

Em decorrência do aumento do número de pessoas imunodeficientes, as infecções fúngicas sistêmicas graves aumentaram significativamente (Martinez-Rossi *et al.*, 2018b).

Figura 1. Aspecto morfológico de *T. rubrum*. A) Aspecto macroscópico. As colônias são de coloração branca, com aspecto algodonoso ou cotonoso, e o reverso da placa apresenta cor vermelho escuro. **B)** Aspecto microscópico. Apresentam grande quantidade de microconídios em forma de clava e hifas septadas hialinas. **Fonte:** University of Adelaide, Mycology online.

Além de ser caro e prolongado, o tratamento clínico da infecção fúngica é desafiador, pois o fungo pode apresentar resistência aos antifúngicas. Um outro agravante é o arsenal antifúngico limitado a poucos alvos celulares (Persinoti *et al.*, 2014; Martinez-Rossi *et al.*, 2018a). Essa e outras questões, como os efeitos adversos dos agentes antifúngicos, recorrência da infecção, diagnóstico incorreto, poucos estudos *in vivo* para testar novos medicamentos e nenhuma vacina humana disponível tornam a gestão do tratamento de dermatofitoses desafiadora (Al-Khikani and Ayit, 2021).

1.2 Agentes Antifúngicos:

O número de agentes antifúngicos de uso clínico ainda é limitado quando comparado com os antibióticos disponíveis atualmente. Eles interferem em processos fundamentais inerentes à biologia do fungo. Alguns destes fármacos atuam como inibidores da via da biossíntese do ergosterol, como os azóis, triazóis e alilaminas, e inibidores da síntese da parede celular fúngica, como as equinocandinas (Campoy and Adrio, 2017; Martinez-Rossi *et al.*, 2018a). Além disso, são conhecidos também antifúngicos que agem inibindo a síntese de ácido nucleicos, da síntese proteica e da síntese de microtúbulos (Campoy and Adrio, 2017). Um pressuposto para novos antifúngicos é que esse composto deveria compilar entre suas características uma pronunciada atividade fungicida, possuir um bom efeito farmacocinético que contribua para ação farmacodinâmica do composto, ter reduzida toxicidade para o hospedeiro, possuir pouca capacidade de interação droga-droga, ser inovador, seletivo e possuir mecanismo de ação diferente dos demais antifúngicos, contribuindo assim para o combate à diferentes fungos e diminuindo as chances do surgimento de linhagens resistentes (Campoy and Adrio, 2017).

Nesse sentido, um artigo de revisão destacou novos alvos terapêuticos para tratar infecções fúngicas invasivas resistentes a medicamentos (Mccarthy *et al.*, 2017). Dentre estes alvos, estão incluídas moléculas que participam de importantes vias metabólicas fúngicas, como as enzimas envolvidas no ciclo do glioxilato, as enzimas do citocromo p450, e também a coenzyma Acetil-CoA, que atua no metabolismo energético e em diferentes vias biossintéticas. Além disto, foi enfatizado a relevância da via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), fatores de transcrição como Upc2 e também processos epigenéticos, como os mediados por histona desacetilase, para a patofisiologia das infecções fúngicas e, portanto, como alvos promissores para desenvolvimento de novas terapias antifúngicas. Trabalhos publicados pelo nosso grupo de pesquisa também sugerem outros potenciais alvos antifúngicos, como a proteína HSP90 (Jacob *et al.*, 2015), que está relacionada com diversas funções celulares, como metabolismo e resposta a diferentes tipos de estresse, o fator de transcrição *HacA* (Bitencourt *et al.*, 2020), que também se relaciona com virulência e resposta adaptativa a diferentes tipos de estresse, e o fator de transcrição, o *StuA* (Lang *et al.*, 2020), que regula diferentes processos metabólicos e de virulência em *T. rubrum*.

A genética reversa vem sendo utilizada como ferramenta importante para indicar potenciais pontos de vulnerabilidade a serem explorados em terapias antifúngicas. Além disso, a compreensão dos mecanismos moleculares de adaptação ao estresse provocado por

antifúngicos pode conduzir a importantes descobertas acerca de novas abordagens terapêuticas. Nesse sentido, no presente trabalho, foi realizada uma investigação acerca da regulação via SA de um gene que codifica uma proteína de efluxo de fármacos após a exposição de *T. rubrum* a antifúngicos que possuem diferentes modos de ação, como o ácido undecanóico (UDA), caspofungina (CASP), terbinafina (TRB) e o itraconazol (ITR). A TRB e o ITR são antifúngicos de uso sistêmico e tópico no tratamento de infecção por dermatófitos (Panday *et al.*; Cazedey *et al.*, 2007; Durdu *et al.*, 2017; Al-Khikani, 2020; Panday *et al.*, 2020). A caspofungina é um antifúngico que demonstra atividade contra a maioria das espécies de *Candida*, *Aspergillus* (Song and Stevens, 2016) e para algumas espécies de dermatófitos (Bao *et al.*, 2013), e seu modo de uso é endovenoso (Martinez, 2006). Já o UDA foi utilizado em pomadas de uso tópicos e vem sendo revisto para a utilização associado a outros fármacos (Rossi *et al.*, 2021).

1.2.1 Terbinafina e Itraconazol:

A TRB é um antifúngico do grupo das alilaminas (**Figura 2**) que age inibindo a atividade da esqualeno epoxidase, uma enzima que participa da via da biossíntese do ergosterol. O ergosterol, é um componente essencial da membrana celular fúngica. A TRB afeta a produção do ergosterol, ocasionando a morte celular do fungo devido a desintegração da membrana plasmática e o acúmulo de lanosterol, que é tóxico para a célula. (Meinerz *et al.*, 2007; Martinez-Rossi *et al.*, 2018a; Panday *et al.*, 2020). Além de ser recomendada para o tratamento de dermatofitoses, onicomicoses e micoses sistêmicas, a TRB também é usada para tratamento de outras doenças fúngicas, como no tratamento da pitríase versiculor, causada principalmente por *Malassezia furfur*, para a candidíase cutânea, dentre outras doenças (Panday *et al.*, 2020).

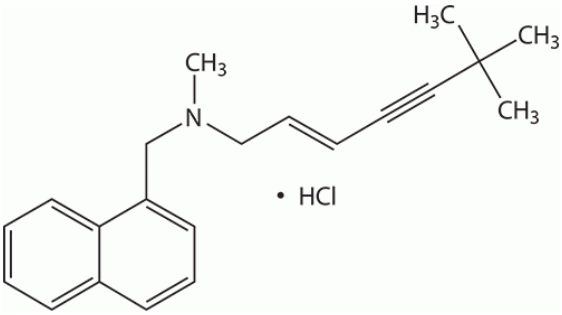


Figura 2: Estrutura química da TRB. **Fonte:** Disponível em: <https://www.biomol.com/products/chemicals/biochemicals/terbinafine-hydrochloride-lkt-t1672.1>

O ITR é um antifúngico disponível há cerca de 30 anos no mercado mundial e se apresenta em diferentes formulações, como oral (cápsulas e soluções) e intravenosa (De

Doncker *et al.*, 2017). Assim como outros antifúngicos do grupo dos azóis, o ITR age inibindo a enzima sterol 14 a-demethylase, o que também promove a inibição da síntese do ergosterol (Lupetti *et al.*, 2002; Martinez-Rossi *et al.*, 2018b). É um agente antifúngico triazólico de primeira geração, cuja fórmula química encontra-se representada na **Figura 3**. Ele possui atividade antifúngica de amplo espectro de ação, sendo utilizado comumente na prática clínica para tratamento de diferentes infecções, como as micoses sistêmicas (blastomicose, cromomicose, esporotricose, histoplasmose, paracoccidioidomicose), as dermatofitoses, incluindo as onicomicoses, e também as infecções causadas por *Candida spp*, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus spp* (De Doncker *et al.*, 1997; Slain *et al.*, 2001; Cazedey *et al.*, 2007).

Portanto, ITR e TRB atuam em diferentes enzimas da via de síntese do ergosterol, o principal esterol da membrana celular fúngica.

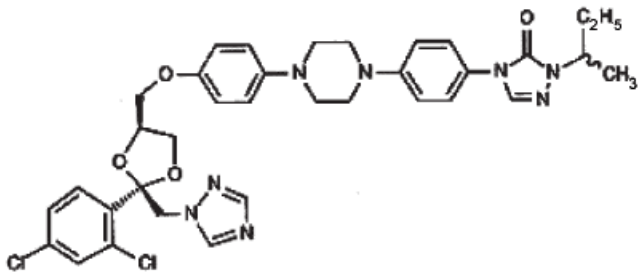


Figura 3. Estrutura química de ITR. **Fonte:** (Cazedey *et al.*, 2007)

1.2.2 Caspofungina:

Os antifúngicas do grupo das equinocandinas, como a CASP, agem inibindo a enzima β-1-3-D-glucano sintase, que é responsável pela biossíntese de β-1,3-glucano, o principal componente estrutural da parede celular dos fungos (Healey and Perlin, 2018). As equinocandinas são um grupo de lipopeptídeos que apresenta atividade antifúngica com grande especificidade, baixa toxicidade e são eficazes contra linhagens fúngicas resistentes a outros fármacos (Bao *et al.*, 2013). A CASP foi o primeiro composto do grupo das equinocandinas a se tornar licenciado para o uso nos Estados Unidos, e demonstra atividade fungicida contra a maioria das espécies de *Candida* e atividade fungistática contra as espécies de *Aspergillus* (Song and Stevens, 2016). Sua estrutura química encontra-se na **Figura 4**.

Um estudo avaliou a eficácia *in vitro* da CASP e micafungina, um outro antifúngico do grupo das equinocandidas, contra diferentes espécies de dermatófitos e demonstrou que esses fármacos exibem atividade antifúngica, induzindo mudanças morfológicas, mas não inibiram completamente o crescimento fúngico (Bao *et al.*, 2013). Da mesma forma, um outro

estudo avaliou a eficácia *in vitro* de 12 diferentes antifúngicos contra isolados clínicos de *Trichophyton schoenleinii*, o dermatófito que causa a *tinea favosa*. Foi observado um baixo índice de MIC (concentração inibitória mínima da droga que inibe o crescimento fúngico) para a anidulafungina, uma outra equinocandina, comparada com outros fármacos testados, sugerindo uma efetiva atividade antifúngica (Deng *et al.*, 2017).

A ausência de estudos *in vivo* da eficácia das equinocandinas acaba limitando seu uso para o tratamento das dermatofitoses, o que de certa forma pode explicar a ausência de linhagens de dermatófitos resistentes a estes fármacos (Martinez-Rossi *et al.*, 2018a)

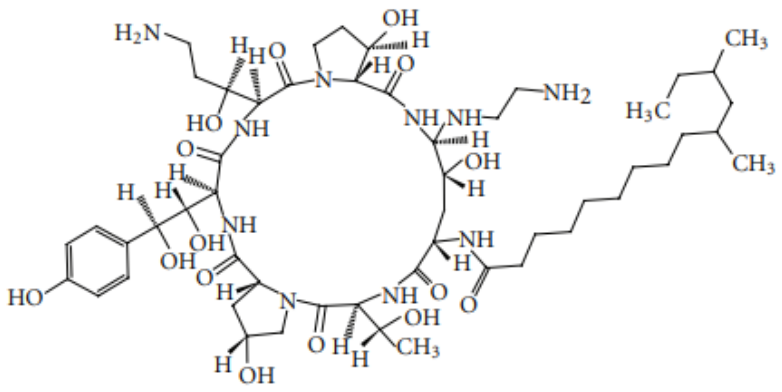


Figura 4: Estrutura química da CASP**. Fonte**: Adaptada de (Vandeputte *et al.*, 2012)

1.2.3 Ácido Undecanóico:

Alguns ácidos graxos de cadeia longa exibem atividade fungistática ou fungicida e são frequentemente utilizados no tratamento de infecções fúngicas (Das and Banerjee, 1983). O UDA é um dos mais conhecidos sendo um ácido graxo de cadeia média da série (C7 a C11), que atua inibindo o crescimento vegetativo do fungo, germinação de conídios, respiração celular e metabolismo de carboidratos. Também se insere naturalmente na bicamada lipídica das membranas fúngicas, consequentemente resultando no aumento da fluidez, fazendo com que ocorram alterações conformacionais nas proteínas da membrana, resultando na liberação de componentes intracelulares, desordem citoplasmática e, eventualmente, a desintegração celular (Das and Banerjee, 1983; Pohl *et al.*, 2011).

UDA também conduz para o status de estresse oxidativo, diminui a virulência, e apresenta efeitos sobre diversos processos celulares aparentemente não relacionados, sugerindo interações não específicas com proteínas e enzimas de células fúngicas, reduzindo a chance de resistência pelo micro-organismo, e fortalecendo sua utilidade clínica (Mendes *et al.*, 2018). A estrutura química de UDA está apresentada na **Figura 5.**

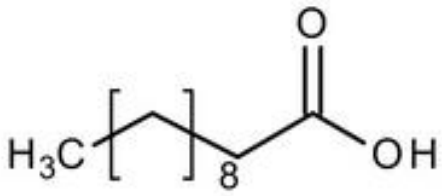


Figura 5: Estrutura química do UDA. **Fonte:** Disponível em: https://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/Undecanoic-acid,MDA_CHEM-818568

1.3 Mecanismos de resistência a antifúngicos através de bombas de efluxo: proteínas transportadoras.

A resistência antifúngica clínica é definida como a persistência da infecção ou dos sintomas, apesar da utilização de antifúngicos apropriados e a consequente falha no tratamento (Al-Khikani and Ayit, 2021). O uso generalizado e prolongado de diferentes antifúngicos pode resultar na seleção de linhagens resistentes (Prasad and Rawal, 2014). Já vem sendo discutido há algum tempo a existência de diferentes mecanismos de resistência e adaptativos apresentados pelos fungos patogênicos a diferentes antifúngicos (Martinez-Rossi *et al.*, 2008a; Martinez-Rossi *et al.*, 2018b)

Mutações pontuais que ocorrem nos genes *FKS*, que codificam para a enzima β-1-3-D-glucano sintase, em regiões denominadas *hot-spots*, conferem resistência às equinocandinas. Estas mutações resultam em enzimas com sensibilidade diminuída aos fármacos, bem como induzem a produção compensatória de outros componentes da parede celular, como a quitina, em função da inibição da síntese de glucano (Sanguinetti *et al.*, 2015; Vieira and Nascimento, 2017). Em azóis, alguns mecanismos associados a resistência foram descritos para *Candida spp* e outros fungos como a super expressão do gene *ERG11*, que codifica a enzima alvo lanosterol alfa-14 demetilase, e também mutações pontuais nesse mesmo gene, que alteram qualitativamente a enzima alvo, evitando a ligação da droga à enzima (Sanguinetti *et al.*, 2015; Vieira and Nascimento, 2017).

A resistência à TRB foi descrita em vários fungos como consequência de mutações no gene que codifica a enzima alvo esqualeno epoxidase (Rocha *et al.*, 2006; Martinez-Rossi *et al.*, 2018a). A possível ação enzimática da enzima salicilato 1-monoxigenasse na molécula de TRB também acarreta resistência a TRB em *A. nidulans* e *T. rubrum* (Graminha *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2018). Mutações em genes específicos também estão relacionadas a resistência ao UDA. Verificou-se que a substituição de um aminoácido próximo ao sítio catalítico de uma

lipase levaria a alteração de suas propriedades catalíticas, resultando em resistência ao UDA em *A. nidulans* (Brito-Madurro *et al.*, 2008).

A resistência pelos patógenos a diferentes compostos não relacionados quimicamente é promovida por bombas de efluxo que promovem a extrusão do fármaco, diminuindo a sua concentração no interior da célula fúngica. Este fenômeno é usado por *Candida spp* para resistir aos azóis (Sanguinetti *et al.*, 2015; Vieira and Nascimento, 2017). Semelhantemente, em *T. rubrum*, verificou-se um aumento dos níveis de expressão do gene *mdr1* que codifica para uma bomba de efluxo, quando o fungo foi exposto a diferentes antifúngicos, como fluconazol, cetoconazol, ITR e griseofulvina, sugerindo sua participação no efluxo de fármacos nesse dermatófito (Cervelatti *et al.*, 2006).

Proteínas transportadoras envolvidas no efluxo de fármacos do tipo ABC (ATP-*Binding Cassete*) estão presentes na membrana celular de todos os organismos vivos e usam a energia proveniente da hidrólise do ATP para transportar diversos substratos como lipídios, feromônios e xenobióticos, além de fármacos através das membranas. Portanto, estas proteínas promovem resistência aos fármacos sendo responsáveis pela falha de tratamentos antimicrobianos (Borges-Walmsley *et al.*, 2003; Martinez-Rossi *et al.*, 2008b; Baral, 2017).

De formal geral, os transportadores ABC compartilham uma estrutura semelhante de organização de domínios e possuem pelo menos um domínio de ligação ao ATP (NBD – *Nucleotide Binding Domain*), acompanhado por várias hélices transmembranares, que constituem os domínios transmembrana (*Transmembrane domain* - TMD) (Gadzalski *et al.*, 2016). Atualmente, os transportadores ABC em fungos são categorizados nas seguintes subfamílias (**Figura 6**): ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCE, ABCF, ABCG e proteínas similares a transportadores ABC procarióticos, ABCI, de acordo com a sua organização de domínios, segundo a organização de domínios e nomenclaturas adotada pela organização do genoma humano (HUGO) (Víglaš, Ján and Olejníková, Petra, 2021).

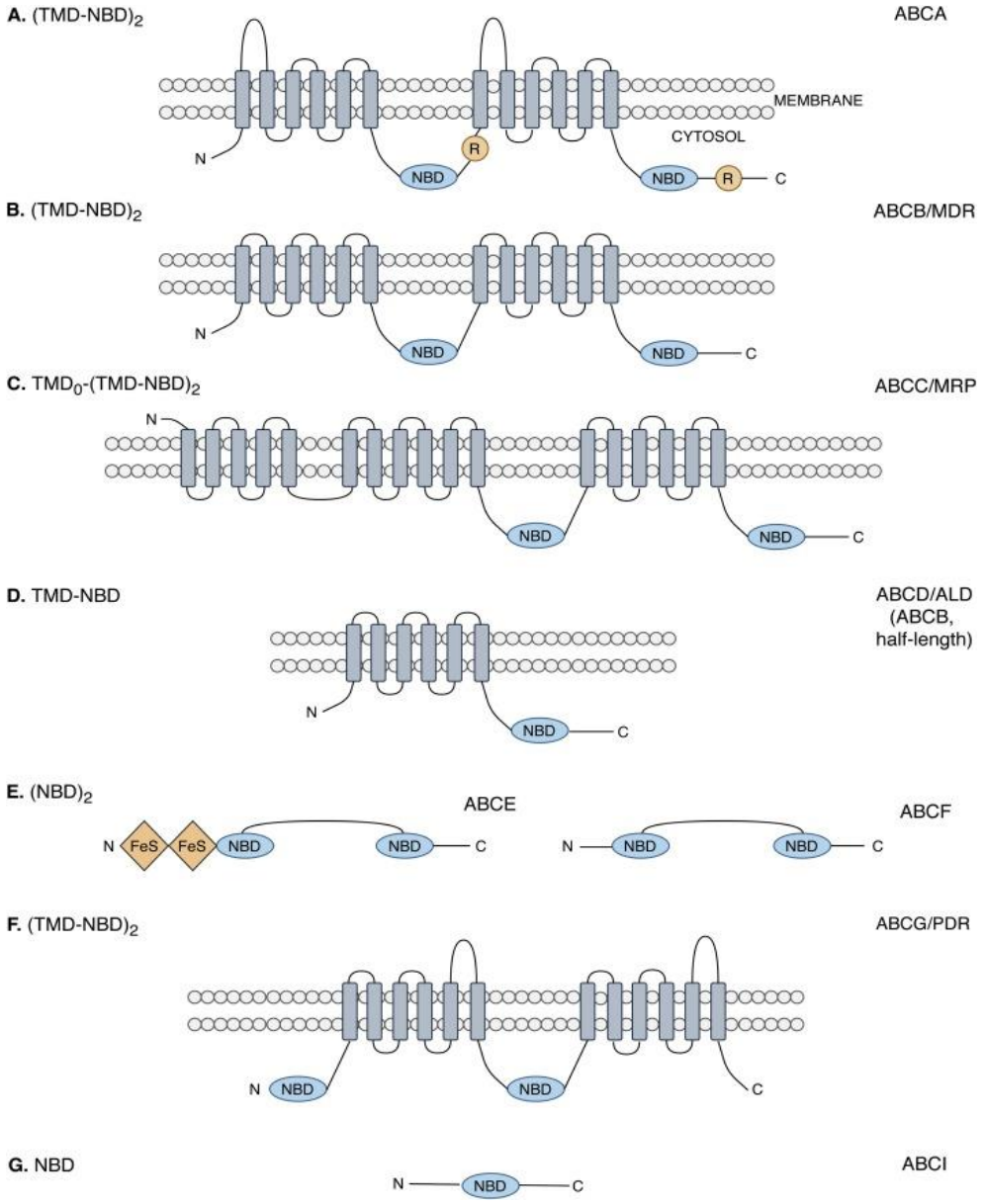


Figura 6. **Topologia de diferentes subfamílias de transportadores ABC em fungos**.
Fonte: (Víglaš, J. and Olejníková, P., 2021)

Diversos trabalhos relatam a atuação desses transportadores em diferentes fungos expostos a estressores químicos e diferentes classes de fármacos. Foi mostrado por Martins et al., (2016) a indução da expressão diferencial dos genes *pdr1*, *mdr2* e *mdr4*, que codificam para transportadores do tipo ABC, após a exposição aos fármacos anfotericina B, griseofulvina, ITR e TRB nos dermatófitos *T. interdigitale*, *T. equinum*, *T. rubrum* e *T. tonsurans*. Além disto, através da comparação dos perfis de expressão entre a linhagem selvagem e a linhagem mutante para este gene, verificou-se que, em função do *background* Δ*mdr2*, houve acúmulo do nível transcricional de *mdr4* após exposição a griseofulvina, sugerindo que o gene *mdr4* está

compensando a inativação de *mdr2*. Este resultado revela a complexidade na modulação dessas proteínas exercida por antifúngicos em dermatófitos (Martins *et al.*, 2016). Nesse mesmo contexto, um trabalho avaliou a expressão de 20 genes que codificam para diferentes transportadores ABC em *Candida auris* e foi observada a expressão diferencial desses genes quando o fungo foi exposto aos fármacos anfotericina B, TRB e fluconazol (Wasi *et al.*, 2019). Esses e outros dados corroboram a ideia da participação dessas proteínas no processo de resistência aos antifúngicos e do perfil particular de resposta que cada transportador exibe para os diferentes antifúngicos.

Além disso, uma outra superfamília de transportadores conhecida é a MSF (Major facilitator superfamily), que se caracteriza por possuir 12 hélices transmembranas (TMs), agrupadas em 2 domínios TMD similares, o domínio N-TM e o domínio C-TM. Estes transportadores fazem a extrusão de diferentes substratos como fármacos, metabólitos, aminoácidos, carboidratos, lipídios, peptídeos dentre outros (Pao *et al.*, 1998; Yan, 2013), e são classificados de acordo com a organização dos segmentos nos TMD (Law *et al.*, 2008). Os transportadores MFS incluem os facilitadores e os transportadores ativos secundários, sendo que essas proteínas não possuem o domínio de ligação ao ATP (ATP- *binding domain*). O transporte nos facilitadores ocorre pela difusão facilitada de um substrato de acordo com o gradiente de concentração, enquanto nos transportadores ativos secundários, essas proteínas utilizam do potencial eletroquímico de íons ou solutos para realizar o transporte energeticamente desfavorável de um substrato contra seu gradiente de concentração (Yan, 2013). Além disso, os transportadores ativos podem ser divididos em simportadores e antiportadores, pois catalisam o movimento transmembrana dos solutos de um ou mais substrato, na mesma direção ou em direção oposta, respectivamente (Yan, 2013). Dessa forma, enquanto os transportadores do tipo ABC possuem domínios TMD e domínios de ligação ao ATP, os transportadores MSF só possuem os domínios TMD **(Figura 7).**

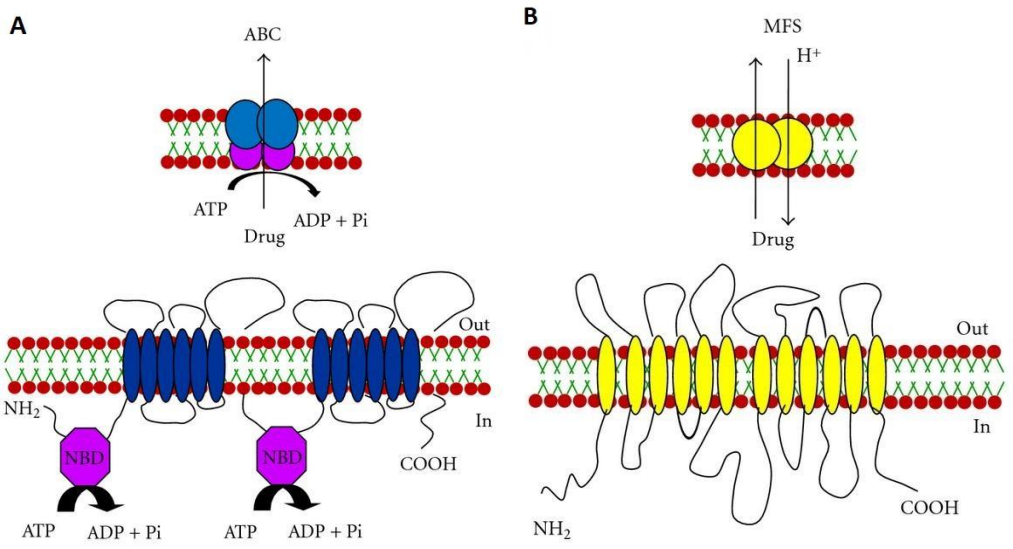


Figura 7. Topologia de transportadores ABC e MSF. Representação esquemática da topologia de (**A**) transportador ABC e (**B**) transportador MFS de *Candida spp.* A topologia do transportador ABC e do transportador MFS representado aqui tem os arranjos (NBD-TMS6) 2 e (TMS)12, respectivamente. **Fonte:** (Prasad *et al.*, 2011).

Além disso, foi relatado que os genomas de diversos dermatófitos, como *T. rubrum, T. equinum. T. tonsurans. T. verrucosum, Microsporum gypseum, Microsporum canis e Arthroderma benhamiae* são enriquecidos com genes que codificam para transportadores do tipo ABC (Tabela 1) (Gadzalski *et al.*, 2016), sugerindo assim o importante papel desempenhado por essas proteínas nestes patógenos.

Tabela 1. A ocorrência de diferentes transportadores do tipo ABC em diferentes dermatófitos, Adaptado de (Gadzalski *et al.*, 2016).

	A. Benhamiae	***M. canis***	***M. gypseum***	***T. equinum***	***T. rubrum***	***T. tonsurans***	***T. verrucosum***	***Σ***
ABC-A	0	1	1	1	1	1	1	6
ABC-B	10	12	10	8	8	9	10	67
hABC-B	2	2	3	4	2	1	2	16
ABC-C	9	12	9	7	6	7	8	58
hABC-C	3	2	4	2	2	3	3	19
ABC-G	3	4	7	4	4	4	4	30
hABC-G	2	1	1	2	1	2	2	11
ABC-D	0	1	1	1	1	1	1	6
ABC-E	1	1	1	1	1	1	1	7
ABC-F	5	5	5	4	5	4	5	33
Σ	30	36	37	30	26	29	32	253
Genes per Mpb	1.35	1.55	1.59	1.24	1.16	1.26	1.42	

Todos esses diferentes mecanismos de resistência e adaptação podem operar em conjunto ou de forma individual, o que indica um complexo circuito regulatório existente em fungos patogênicos e o que clama para a necessidade de buscar novos alvos moleculares e estratégias terapêuticas como as combinações de antifúngicas para obtenção de atividade sinérgica (Al-Khikani and Ayit, 2021), aliadas ao desenvolvimento de modernas formulações para os antifúngicos disponíveis. Atualmente, admite-se que antifúngico ideal é aquele que inibe fatores de virulência, afeta a fisiologia do fungo e seja específico para as células fúngicas (Martinez-Rossi *et al.*, 2018a).

1.4 Biofilmes:

Ainda nesse contexto de resistência antifúngica, os biofilmes fúngicos representam uma organização celular potencialmente envolvida com resistência/tolerância a antifúngicos. Biofilmes consistem em uma estrutura complexa, produzida pelo próprio micro-organismo, formada por populações celulares associadas a determinadas superfícies, inseridas em uma matriz extracelular (Martinez-Rossi *et al.*, 2018a). A presença da matriz de glucana que envolve as populações celulares ali presentes age como uma barreira física entre a droga e o micróbio, contribuindo assim para o fenótipo de resistência à diferentes fármacos (Robbins *et al.*, 2017).

Similarmente, as bactérias também possuem a capacidade de formar biofilme e esse mecanismo tem sido bem estudado em bactérias clinicamente relevantes que formam um grupo denominado ESKAPE, composto por *Enterococcus faecalis, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, P. aeruginosa and Enterobacter spp* (Rabin *et al.*, 2015). O conteúdo do biofilme pode diferir entre uma espécie e outra em relação aos seus componentes, estruturas e as propriedades dos exopolissacarídeos que são produzidos (Rabin *et al.*, 2015).

Um artigo de revisão reuniu dados referentes à composição e função dos polímeros extracelulares em biofilmes de alguns patógenos como *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae* dentre outros (Karygianni *et al.*, 2020). Basicamente, o conteúdo é divido entre polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos, lipídeos e lipopolissacarídeos (LPS), como as α-mananas, glucanas, proteínas de ligação a glucana, proteínas de ligação associada ao biofilme (BAP), lectinas, aglutininas, DNA extracelular (e-DNA), dentre outros. Estes componentes estão associados com diversas funções, como adesão, ligação célula-célula, proteção contra antimicrobianos, proteção contra antifúngicos, formação

do complexo manano-glucano, citotoxina, transferência gênica, motilidade, *mechanosensing*, entre outras.

Em fungos, o biofilme além de proteger contra agressões externas, permite a comunicação microbiana, condiciona o fungo para uma maior virulência e utilização de nutriente, consequentemente influindo na sucessão microbiana e no seu desenvolvimento (Percival *et al.*, 2012). Já foi demonstrado a capacidade de diferentes fungos patogênicos em formar biofilme, como *Cryptococcus* (Ajesh and Sreejith, 2012) , *Aspergillus* (Muszkieta *et al.*, 2013), *Histoplasma* (Pitangui *et al.*, 2012), e também dermatófitos, como *T. rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes* (Costa-Orlandi *et al.*, 2014), dentre outros.

Em *C. albicans*, a formação de biofilme já é bem caracterizada e sua formação basicamente consiste em quatro etapas diferentes: aderência, iniciação, maturação e dispersão, como mostrado na **Figura 8.** O biofilme começa a se formar a partir da aderência das células a uma superfície sólida, como em catéteres intravasculares ou em placas ou discos de silicone, no caso dos ensaios *in vitro*, o que vai resultar na formação de uma camada basal de células aderidas (**Figura 8.A**). O próximo estágio no desenvolvimento do biofilme consiste na proliferação celular e a filamentação inicial das células aderentes (**Figura 8. B**). Esta etapa será sucedida pela maturação do biofilme, resultando em uma rede complexa de várias camadas de células polimórficas, como hifais (cadeia de células cilíndricas) e pseudohifas (células elipsoidais), envolvidas por uma matriz polimérica extracelular, dando ao biofilme uma aparência espessa e bem estruturada, fornecendo assim proteção ao fungo contra lesões químicas e físicas (**Figura 8. C**). Nessa espécie, o biofilme maduro normalmente se forma em 24 horas e pode ser visualizado a olho nu como uma estrutura turva aderida na superfície sólida. Finalmente, a etapa final da formação do biofilme é denominada dispersão, na qual algumas células da levedura se desprendem do biofilme para semear em outros locais e, assim, dando continuidade ao ciclo (**Figura 8. D**) (Gulati and Nobile, 2016).

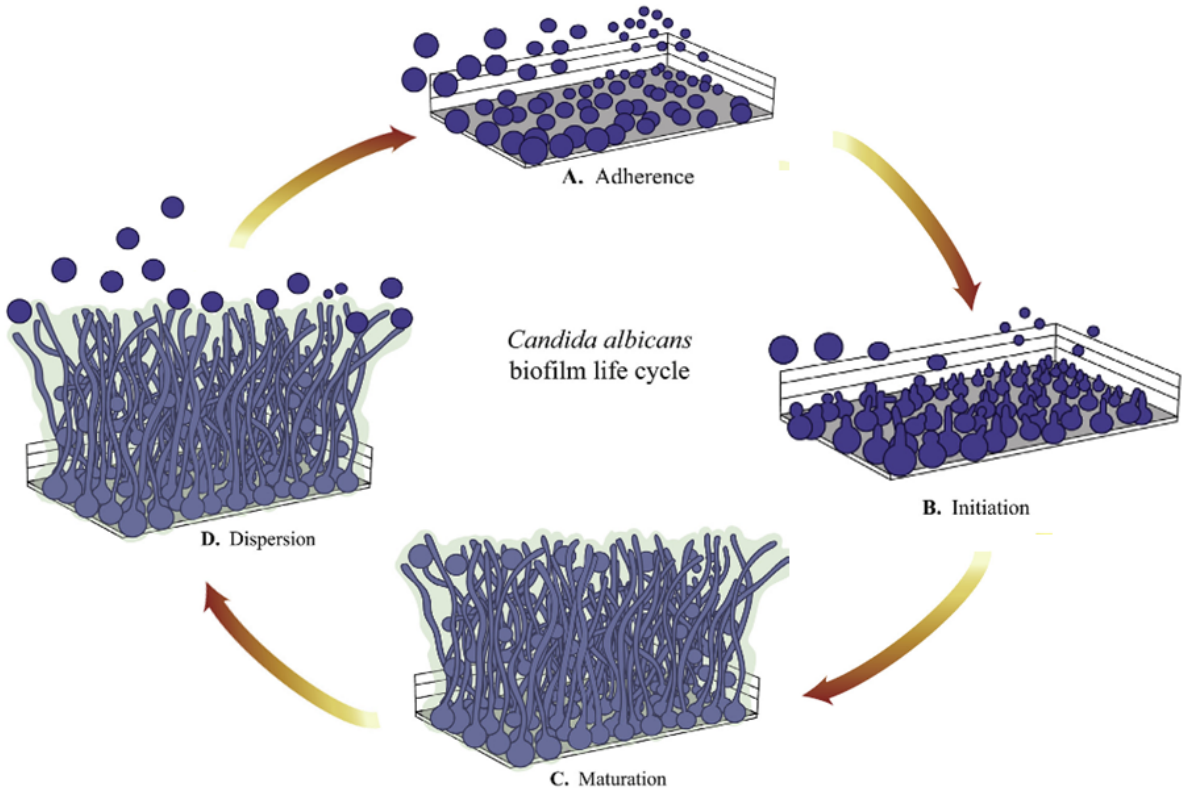


Figura 8: Etapas da formação de biofilme em *C. albicans*. **Fonte:** (Gulati and Nobile, 2016).

1.5 *Splicing* convencional *e Splicing* Alternativo:

A regulação da expressão gênica é um processo fundamental para o desenvolvimento correto, homeostase, e adaptação de todas as células ao ambiente. Em eucariotos, cada etapa do processo de regulação da expressão gênica está sujeita à uma regulação dinâmica, como mudanças estruturais na cromatina, transcrição, processamento do mRNA e tradução (Gomez *et al.*, 2010). A maioria dos genes eucariotos são expressos como uma molécula precursora, o pré-mRNA, que é posteriormente convertido em mRNA maduro pelo processo de *splicing*, que fará a retirada dos íntrons (sequências não codificantes) e a união dos éxons (sequência codificante). O processo biológico de *splicing* é catalisado pelo spliceossomo, um complexo proteico formado por diferentes ribonucleoproteínas - *small nucleolar ribonucleoproteins* (U1, U2, U4, U5 e U6), que juntamente com os fatores de *splicing* realizarão reações sequenciais de transesterificação para a retirada dos íntrons das moléculas de mRNAs (Will and Lührmann, 2011). Para que o *splicing* ocorra, é necessário que a spliceossomo reconheça um conjunto básico de sítios de *splicing* no gene: o sítio de *splicing* 5', a sequência *branched point* e o sítio de *splicing* 3', permitindo aos complexos spliceosomais que executem reações sequenciais que vão resultar na excisão dos íntros e na ligação dos éxons dos transcritos (Wang *et al.*, 2015).

No final de todo o processo, os mRNAs serão formados pelas sequências exônicas que poderão ser traduzidas em proteínas.

O *splicing* alternativo nos organismos eucariotos é um processo regulatório que também acontece a nível pós-transcricional, conduzindo a formação de diferentes mRNAs a partir de um único gene, consequentemente gerando uma diversidade proteica e, esse processamento pode variar entre as espécies (Kempken, 2013). Estudos envolvendo análises de transcriptomas demonstraram a ocorrência de *splicing* alternativo nos diversos organismos eucariotos, como em plantas (Klepikova *et al.*, 2016), humanos (Liu *et al.*, 2017), protozoários (Gomez *et al.*, 2010; Yeoh *et al.*, 2019), microalgas (Panahi and Hejazi, 2020), fungos patogênicos humanos (Persinoti *et al.*, 2014; Mendes *et al.*, 2018; Sieber *et al.*, 2018), dentre outros.

Há diferentes tipos de *splicing* alternativos em fungos (**Figura 9**), como a retenção de íntron (RI), éxon skipping (ES), sítios alternativos de *splicing* do terminal 3' (SAS3), sítios alternativos de *splicing* do terminal 5' (SAS5) e eventos mutualmente excludentes (EME) (Kempken, 2013; Jin *et al.*, 2017; Sieber *et al.*, 2018). A RI é, aparentemente, o *splicing* alternativo mais frequente em Ascomycetos (Kempken, 2013).

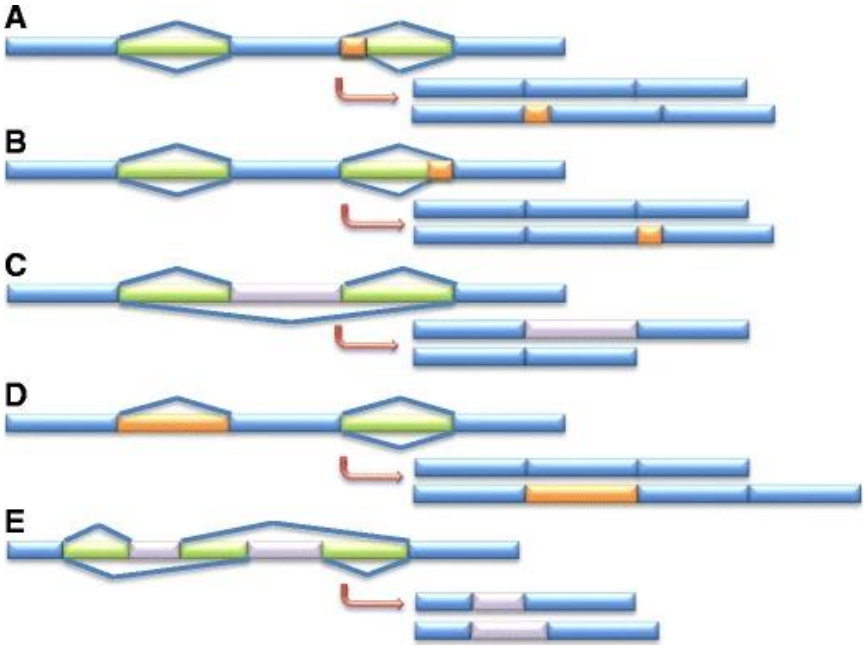


Figura 9. Tipos de *splicing* alternativo. A. Sítio de ligação alternativo 5'; **B**. Sítio de ligação alternativo 3'; **C**. Exon Skipping; **D**. Retenção de íntron; **E**. Eventos mutuamente excludentes. **Fonte:** (Kempken, 2013)

Utilizando a metodologia de RNA-seq, é possível observar a ocorrência de eventos de *splicing* alternativo em genes que participam de diferentes processos biológicos em fungos

patogênicos humanos, como por exemplo em genes que codificam para superóxido desmutases, enzimas relacionadas com o processo de infecção em *C. albicans* (Sieber *et al.*, 2018), bem como em genes codificadores de proteínas envolvidas na resistência a múltiplas drogas em *T. rubrum* (Persinoti *et al.*, 2014; Mendes *et al.*, 2018). Nesse sentido, o patógeno tem a habilidade de alterar a resposta a terapias antifúngicas por *splicing* alternativo, aumentando a diversidade de isoformas proteicas através de eventos de pós transcrição (Persinoti *et al.*, 2014; Mendes *et al.*, 2018). Esses achados em associação a dados prévios (Grützmann *et al.*, 2014) demonstram a importância desses mecanismos de *splicing* alternativo em genes relacionados com diferentes processos biológicos em fungos patogênicos. Revelou-se uma maior ocorrência de *splicing* alternativo em genes de patógenos (7,6%) comparado com fungos não patogênicos (5.1%). Esses dados são ainda mais expressivos quando consideramos a porcentagem de genes que sofrem *splicing* alternativo em fungos patogênicos humanos (10.7%) (Grützmann *et al.*, 2014).

Justificativa e hipótese

2 Justificativa:

Para sobreviver, os fungos monitoram o ambiente e respondem a mudanças, como por exemplo aquelas causadas pela exposição aos antifúngicos. Mecanismos moleculares envolvidos na resposta ao estresse, tolerância ou resistência à drogas já foram descritos em alguns fungos, mas são pouco compreendidos no grupo dos dermatófitos (Martinez-Rossi *et al.*, 2018b). Um dos principais mecanismos moleculares que contribui para a o fenótipo de resistência aos antifúngicos em eucariotos é o aumento do efluxo celular, através da expressão de genes que codificam bombas de efluxo, como os transportadores do tipo ABC (Peres *et al.*, 2010).

Para se ter um controle efetivo das dermatofitoses é necessário desenvolver uma nova geração de antifúngicos de amplo espectro com ação seletiva contra novos alvos celulares. Para a busca destes novos alvos, é essencial que se tenha um entendimento amplo sobre a biologia de fungos patogênicos (Martinez-Rossi *et al.*, 2008b). Este projeto visa elucidar mecanismos regulatórios envolvidos na resistência antifúngica e contribuir para entender o funcionamento das bombas de efluxo, pois o entendimento dos eventos moleculares que conferem resistência é fundamental para o desenvolvimento de novos antifúngicos e para modificações estruturais nos antifúngicos atualmente utilizados.

3 Hipótese

Eventos de *splicing* alternativo podem atuar como mecanismos regulatórios na modulação de genes potencialmente envolvidos com resistência antifúngica.

Objetivo e estratégias

4 Objetivos:

- Avaliar a ocorrência de *splicing* alternativo em genes de *T. rubrum* que codificam para proteínas de resistência a múltiplas drogas (MDR) e analisar a amplitude desse mecanismo regulatório em resposta a alguns fármacos de uso clínico e em biofilmes.

5 Estratégias:

- Analisar *in silico* dados de RNA-seq realizado em *T. rubrum* após exposição ao UDA e acriflavina na busca de genes que codificam transportadores, e que apresentaram retenção de íntrons.
- Validar a retenção de íntrons por meio de RT-PCR e RT-qPCR em resposta à exposição ao UDA.
- Verificar a retenção de íntrons ensaiando outros antifúngicas de uso clínico e em biofilmes.

Material e métodos

6 Material e métodos:

6.1 Linhagem:

Foi utilizada a espécie *T. rubrum* (CBS118892), doada pelo *Centraalbureau voor Schimmelcultures* (CBS - HOLANDA) em todos os ensaios biológicos, aqui apresentados.

6.2 Meios de cultura:

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

Tabela 2. Constituintes do Meio Extrato de Malte – MEA (Malt Extract Agar)

Extrato de malte	20 g
Glicose	20 g
Peptona	1g
Água destilada (qsq)	1000 ml
Ágar	25g

O pH do meio foi ajustado para 5.7 e autoclavado a 1 atm de pressão a 120 ºC.

6.2.2 Meio RPMI:

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

Tabela 3. Constituintes do meio RPMI-1640.

Constituinte	g/L	Constituinte	g/L
L-arginina	0,200	Biotina	0,0002
L-asparagina (anidro)	0,050	D-pantotênico	0,00025
Ácido L-aspártico	0,020	Cloreto de colina	0,003
L-cisteína 2HCl	0,0652	Ácido fólico	0,001
Ácido L-glutâmico	0,020	Mio-inositol	0,035
L-glutamina	0,0300	Niacinamida	0,001
Glicina	0,010	Ácido *ρ*-aminibenzóico	0,001
L-histidina	0,015	Piridoxina HCl	0,001
L-hidroxiprolina	0,020	Riboflavina	0,0002
L-isoleucina	0,050	Tiamina HCl	0,001
L-leucina	0,050	Vitmamina B12	0,000005
L-lisina	0,040	Nitrato de cálcio. H_2O	0,100
L-metionina	0,015	Cloreto de potássio	0,400
L-fenilalanina	0,015	Sulfato de magnésio (anidro)	0,04884
L-prolina	0,020	Cloreto de sódio	6,000
L-serina	0,030	L-serina	0,030
L-treonina	2,000	D-glicose	2,000
L-triptofano	0,005	Glutationa	0,001
L-tirosina. 2Na	0,020	Vermelho de fenol	0,0053
L-valina	0,020		

6.3 Condições de cultivos:

6.3.1 Cultivo de *T. rubrum* em meio + antifúngicos

Primeiramente, o fungo foi cultivado em meio MEA por 21 dias. Posteriormente, foi feita a suspensão e contagem de conídios, que foram inoculados na concentração de 1 x 10^7 em 50 mL de meio RPMI por 96 horas. Os micélios foram transferidos para frascos contendo 100 ml de meio RPMI e concentrações sub-inibitórias de quatro fármacos: UDA, CASP, ITR e TRB. Os micélios foram coletados em 2 tempos distintos: 1h e 12h de cultivo na presença (tratado) ou ausência (controle pareado). Os cultivos foram filtrados após cada tempo de crescimento e os micélios foram utilizados para extração de RNA. Os experimentos foram realizados em triplicata biológica.

6.3.2 Ensaio de formação de biofilme:

O ensaio de formação de biofilme foi realizado como previamente descrito (Costa-Orlandi *et al.*, 2014), com algumas modificações. O fungo *T. rubrum* foi cultivado em meio MEA a 28°C por 10 dias. Provenientes desse cultivo, foram preparadas suspensões e contagens de conídios, que no final foram ajustadas para a concentração final de $1x10^6$conídios/mL que adicionados em placas de 24 poços e mantidos por 4 h a 37ºC para a pré-adesão. Posteriormente, o sobrenadante foi gentilmente removido dos poços, seguido da adição de 1 ml de meio RPMI (contendo 2% de glicose, tamponado com MOPS) e as placas foram mantidas a 37°C por 96 horas. Após esse tempo, o sobrenadante foi gentilmente removido, sem perturbar o biofilme formado e aderido ao fundo da placa. Então, foi adicionado meio RPMI fresco e os antifúngicos, no volume final para 1 mL, nas seguintes condições: **controle** (meio RPMI); **70%** e **100% da CIM da TRB** (meio RPMI + 0.14 µg/mL de TRB e meio RPMI + 0.20 µg/mL de TRB, respectivamente); e **70%** e **100% da CIM da CASP** (meio RPMI + 56 µg/mL de CASP e meio RPMI + 80 µg/mL de CASP, respectivamente). Todos foram mantidos a 37°C por 1 hora. Esses experimentos foram realizados em triplicata biológica.

Os biofilmes de cada condição foram utilizados para extração de RNA. Com o intuito de preparar essas amostras para a extração de RNA, o biofilme formado foi lavado, gotejando 1 mL de solução salina e removendo sutilmente o sobrenadante. Depois de lavado, o biofilme formado nos diferentes poços para cada condição foi ressuspendido em 500 µL de solução salina, transferido para um tubo de centrífuga de 15 mL e, posteriormente, submetido à centrifugação a 4.000 rpm por 10 min. O sobrenadante obtido foi descartado e o pellet foi ressuspendido com 500 µL de solução lítica (20 mg de lysing enzymes – Sigma, 3M KCl, pH 6,8), seguido de incubação por 1 h à 28ºC sob agitação 120 rpm, para a quebra enzimática da parede celular.

6.4 Extração de RNA total

A extração de RNA total foi realizada com materiais livres de RNAses, utilizando o *Illustra Spin RNA Isolation kit* (GE Healthcare), conforme instruções do fabricante. As amostras de RNAs foram tratadas com DNAse I da empresa SIGMA-ALDRICH. As concentrações das amostras de RNA extraídas foram analisadas por meio do NanoDrop ND-1000 spectrophotometer. As amostras foram mantidas em -80°C até a conversão em cDNA.

6.5 Síntese de cDNA

Para os experimentos de PCR em tempo real (RT-qPCR) e RT-PCR, os RNAs foram convertidos em cDNA utilizando o *High capacity cDNA synthesis kit* (Applied Biosystems), segundo recomendações do fabricante. Para fazer a reação de conversão em cDNA, utilizamos 1000 ng/µL de RNA tratado com DNAse de cada amostra, 2 µL de tampão [10X], 0,8 µl de DNTP mix [2,5X], 2,0 µL de random primers [10X] e 1 µL da enzima transcriptase reverse. O volume final de 10 µL por reação foi ajustado com água ultra pura e a incubação utilizada para as reações no termociclador foram 10 min a 25°C, seguida de 2 horas a 37°C e 5 min a 85°C. Com o intuito de validar a conversão em cDNA dessas amostras de RNAs, foi feita uma PCR utilizando oligonucleotídeos que amplificariam uma região de um gene constitutivo que codifica para a β-tubulina.

6.6 Desenho de Oligonucleotídeos para RT-PCR e RT-qPCR

Para a construção e análise da qualidade dos oligonucleotídeos inciadores utilizados em ensaios de RT-PCR e RT-qPCR, foi utilizada a ferramenta Oligoanalyzer (https://www.idtdna.com/calc/analyzer). Adicionalmente, os alinhamentos dos oligonucleotídeos com as sequências alvos foram realizados através do pacote de ferramentas Blast (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). As sequências dos genes de estudo foram obtidas no banco de dados do Ensembl Fungi (https://fungi.ensembl.org/index.html). Os oligonucleotídeos utilizados na validação da retenção de íntrons (RT-PCR) foram confeccionados de modo que o *forward* e *reverse* de cada par de oligonucleotídeos ficassem anelados a diferentes éxons que flanqueassem o íntron analisado. E os oligonucleotídeos utilizados na validação quantificação das isoformas (RT-qPCR) que contém os íntrons retidos foram confeccionados de modo que o *forward* e *reverse* de cada par de oligonocleotídeos ficassem anelados dentro do íntron analisado. Os oligonucleotídeos desenhados para RT-PCR e RT-qPCR estão apresentados na tabela 4 e 5, respectivamente

Tabela 4: Primers usados nos ensaios de RT-PCR.

Gene (Número de acesso)	Sequência (5'-3')	Amplicom (pb)
Beta-tubulina (TERG_07904)	**F**: CCGTATGATGGCCACTTTCT R: AAGATGGCAGAGCAGGTAAGGT	**527 pb** com retenção **468 pb** sem retenção
Transportador ABC Íntron-3 (TERG_04309)	**F**: TACGATCCTGTTGGTGGATC **R**: TACGTTGTTTCTGACCTCCTGA	**409** pb com retenção **217 pb** sem retenção
Transportador ABC Íntron-4 (TERG_04309)	**F**: CTTCTCTCAGGAGGTCAGAAAC **R**: CTGAGGTTCTTCTCCCTCATC	**440 pb** com retenção **249 pb** sem retenção

Tabela 5: Primers usados nos ensaios de RT-qPCR

Gene	Primers	Amplicom	Concentração
gapdh TERG_04402	**F**:GCGTGACCCAGCGATGTAGT **R**: CGGTGGACTCGACGATGTAGT	**62 pb**	**200 nm**
rpb2 TERG_05742	**F**: TGCAGGAGGTTTGATGAAGA **R**: GCTGGGAGGTACTGTTTGATCAA	**59 pb**	**300 nm**
Transportador ABC Éxon TERG_04309	**F:** GGGTATCGTGTTGAAGCTAAGA **R:** CATCCAGAAAGACAGGCCATAA	**207 pb**	**100 nm**
Transportador ABC Íntron-3 TERG_04309	**F:** ACACGGATTAATCGGAACACC **R:** AGCACAGGTATACTCACGTTTG	**101 pb**	**100 nm**
Transportador ABC Íntron-4 TERG_04309	**F**: ACTCGATTAAAGAGCGAAGGA **R**: CCGCATTCTTGATAGGAGAGA	**106 pb**	**300 nm**
Transportador ABC Éxon TERG_04224	**F:** CTCTTCACGGACAAATGTGG **R:** TCGACGACAAGACGGTAA	**125 pb**	**100 nm**
***Ste14p* O-methyltransferase** Éxon TERG_03468	**F:** CAACTGCTCTCCGTTCTT **R:** CTTCCGTCGATAGAGAATCG	**100 pb**	**400 nm**
***Ste2* Receptor de Feromônio** TERG_00588	**F**: TCGAGCTATCCCTACTCATC **R**: AATTGGAACCGCTGCTAC	**107 pb**	**100 nm**

6.7 Concentração inibitória mínima utilizada:

Os valores das CIMs (Concentração inibitória Mínima) dos fármacos utilizados já foram anteriormente estabelecidos para CASP, (Silva, 2014), TRB, ITR (Coelho *et al.*, 2008) e - UDA (Mendes *et al.*, 2018) (Tabela 6).

Tabela 6. Concentração inibitória mínima dos fármacos utilizados.

Droga	MIC (µg/ml)	70% do MIC
UDA	**25.0**	**17.5 µg/mL**
CASP	**80**	**56 µg/mL**
ITR	**0.80**	**0.56 µg/mL**
TRB	**0.20**	**0.14 µg/mL**

6.8 Técnicas de validação (RT-PCR, RT-qPCR)

Para validação e quantificação de isoformas geradas através de *Splicing* alternativo (retenção de íntron), foram utilizadas as metodologias de RT-PCR e RT-qPCR, com as plataformas Thermal Cicler 96-well (Applied Biosystems) e StepOnePlus (Life Tecnologies) respectivamente. Os experimentos de RT-qPCR foram realizados utilizando o kit SYBER green PCR mastermix (Life Technologies). O algoritmo de quantificação relativa ΔΔCt foi utilizado para as análises de expressão gênica e os gráficos foram gerados utilizando o GraphPad Prism.5.

6.9 Análise *in silico* das consequências das isoformas utilizando ferramentas de bioinformática

Para análise *in silico* das proteínas resultantes das diferentes isoformas dos genes validados, os seguintes parâmetros foram analisados: predição de domínios, de quadros de leitura, representações gráficas, tridimensionais, sendo utilizados os softwares Interpro database (https://www.ebi.ac.uk/interpro/), Expasy translate tool (https://web.expasy.org/translate/), IBS 1.0 (Liu *et al.*, 2015), e I-Tasser (https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/).

6.10 Análise *in silico* da formação de rede de interação

Para análise *in silico* de genes que possivelmente estabelecem relação com o gene de interesse, seu ID foi utilizado como *input* na plataforma STRING (https://string-db.org/)

Resultados e discussão

7 Resultados e discussão

7.1 Análises de Bioinformática:

7.1.1 Análise *in silico* dos genes que codificam para transportadores de fármacos e caracterização de suas diferentes isoformas proteicas

Dados de RNA-seq de *T. rubrum* exposto aos antifúngicos UDA e acriflavina revelaram o acúmulo de *reads* alinhadas em regiões de íntrons do mRNA de diversos genes que codificam proteínas de transportadores de fármacos, o que sugere a ocorrência de *splicing* alternativo do tipo retenção de íntron como mecanismo adaptativo para a resposta antifúngica (Persinoti *et al.*, 2014; Mendes *et al.*, 2018). Dentre esses genes, se destaca a TERG_04309, que codifica para uma proteína transportadora de droga do tipo ABC, que tem como característica a presença de domínio TMD e domínio NBD. Este gene possui 7 éxons e 6 íntrons (**Figura 10**).

Figura 10. Representação esquemática do gene TERG_04309. Em azul encontram-se representados os éxons e em linhas finas encontram-se os íntrons.

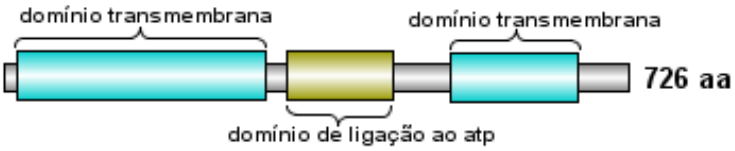
Para o gene TERG_04309, foram observadas *reads* alinhadas no Íntron-3 somente em 12 horas de exposição ao UDA. No entanto, para o Íntron-4, são observados alinhamentos de *reads* tanto em 3 quanto em 12 horas (Mendes *et al.*, 2018). A ocorrência de *splicing* alternativo no gene TERG_04309, sugere a produção dessas isoformas na presença desse composto antifúngico, em diferentes tempos de exposição.

Os resultados obtidos *in silico* indicaram que a isoforma do gene TERG_04309 que possui o íntron-3 retido, bem como a isoforma que possui o íntron-4 retido, originam proteínas putativas menores contendo 426 e 451 aminoácidos, respectivamente, por causa do stop códon existente na região dos íntrons. Essas proteínas têm como consequência a perda de um domínio transmembrana, assim como parte do domínio de ligação ao ATP. Por outro lado, a proteína resultante da isoforma convencional possui 726 aminoácidos e apresenta dois domínios TMD e um domínio NBD (**Figuras 11 e 12**)

A) Processamento convencional

A.1) Transcrito processado

A.2) Proteína

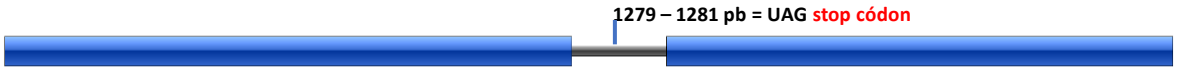


A.3) Sequência de aminoácidos

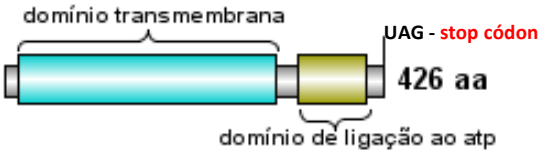
```
MALYRYAIRNDKIVLVLASVAAIIAGALMPMMTVLFGGLAGTFRSFLLGDISDSKFNDELATFSLYFVYLAI
GEFAMVYIATVGFVYSGEHIIAKIREQFLAAILRQNIAFFDELGAGEITTRIIADTNLVQEGISEKVGLTLT
AITTFVAALVISFIRYWKLALILCSSIVAIVVTFGLVGTFVAKLNKKYLGHSAEGGTVVEEVISSTRNPVAF
NTQEKLARRYDGYRVEAKKSGFKLKSATSSMIGFLFLYIYPNYGLSFWMGSRFLVDGSVGLAQILTIQMAIM
MGAFALGNITSNVQAITTAVATANKIYATIDRVSPLDPLSNDADKSTALVGASGSGKSTIVGLIERFYDPVG
GSLYIDGHNIKGLKLRWLRQQISLYTYKRGSGFLVFRAHDFISSLPERYETNIGERGILLSGGQKQRIAIAR
AIGTHDELPQKKATYCNLVEAQQIATKQESTTQDNDHISPETEYDLPQAEYNNEKRDSLSQLDEGEEPQDLL
IHFVAGLNKQEWKYMVFGISLGIVCGGGSPTQTVFFSKCITALSLPLSESSEIRRQVNFWSLMYLMLAFVQL
LALIAQGITFSYCAERLTYRVRYQAFRHILRQDIAYFDKRSGGTLTFFLSPETSQLAGLSGITPMAILLMVA
TLLAASAIGLAVGWKATLAIRTVASLTREGDICSHYHAQLLSQGRSLVWSVLTSPILYAASQSLQFLCMALG
FWYGVT
```

B) *Splicing* alternativo (Retenção do íntron-3)

B.1) Transcrito processado



B.2) Proteína



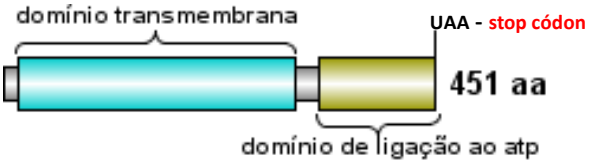
B.3) Sequência de aminoácidos

```
MALYRYAIRNDKIVLVLASVAAIIAGALMPMMTVLFGGLAGTFRSFLLGDISDSKFNDELATFSLYFVYL
AIGEFAMVYIATVGFVYSGEHIIAKIREQFLAAILRQNIAFFDELGAGEITTRIIADTNLVQEGISEKVG
LTLTAITTFVAALVISFIRYWKLALILCSSIVAIVVTFGLVGTFVAKLNKKYLGHSAEGGTVVEEVISST
RNPVAFNTQEKLARRYDGYRVEAKKSGFKLKSATSSMIGFLFLYIYPNYGLSFWMGSRFLVDGSVGLAQI
LTIQMAIMMGAFALGNITSNVQAITTAVATANKIYATIDRVSPLDPLSNDADKSTALVGASGSGKSTIVG
LIERFYDPVGGSLYIDGHNIKGLKLRWLRQQISLVSQEPTLFATTIFGNIKHGLIGTPHEHALKKRLLRL
LSVLLE
```

C) *Splicing* alternativo (Retenção do íntron-4)

C.1) Transcrito processado

C.2) Proteína



C.3) Sequência de aminoácidos

```
MALYRYAIRNDKIVLVLASVAAIIAGALMPMMTVLFGGLAGTFRSFLLGDISDSKFNDELATFSLYFVYL
AIGEFAMVYIATVGFVYSGEHIIAKIREQFLAAILRQNIAFFDELGAGEITTRIIADTNLVQEGISEKVG
LTLTAITTFVAALVISFIRYWKLALILCSSIVAIVVTFGLVGTFVAKLNKKYLGHSAEGGTVVEEVISST
RNPVAFNTQEKLARRYDGYRVEAKKSGFKLKSATSSMIGFLFLYIYPNYGLSFWMGSRFLVDGSVGLAQI
LTIQMAIMMGAFALGNITSNVQAITTAVATANKIYATIDRVSPLDPLSNDADKSTALVGASGSGKSTIVG
LIERFYDPVGGSLYIDGHNIKGLKLRWLRQQISLYTYKRGSGFLVFRAHDFISSLPERYETNIGERGILL
SGGQKQRIAIARAIVSDLKILLLDEATSALD
```

Figura 11. Isoformas proteicas do gene TERG_04309 de *T. rubrum*. A) Transcrito processado, proteína e sequência de aminoácidos resultantes da isoforma convencional do gene TERG_04309. **B)** Transcrito processado, proteína e sequência de aminoácidos resultantes da isoforma com o íntron-3 retido. **C)** Transcrito processado, proteína e sequência de aminoácidos resultantes da isoforma com íntron-4 retido. O íntron retido nos transcritos das isoformas está representado por linhas mais finas.

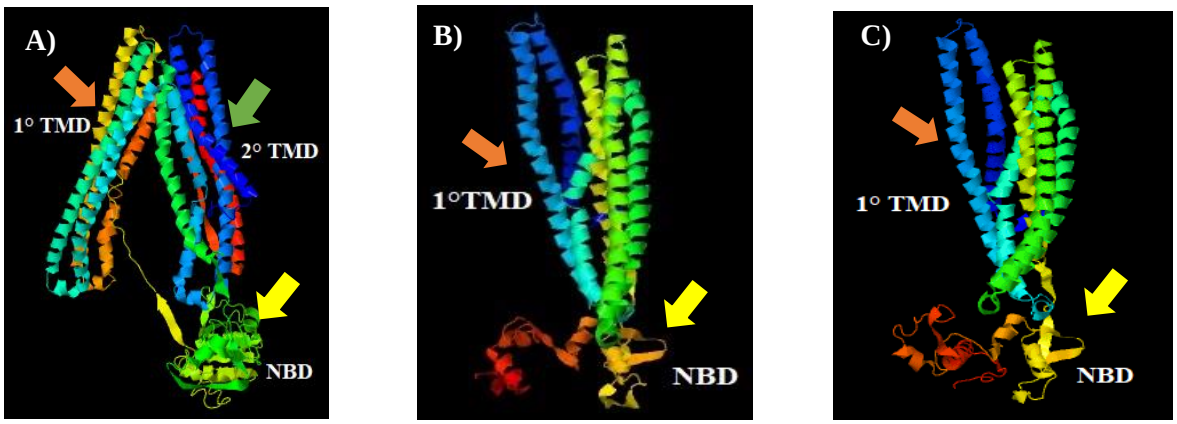


Figura 12. Representação tridimensional das proteínas putativas codificadas pelo gene TERG_04309. A) Proteína codificada pela isoforma convencional. **B)** Proteína codificada pela isoforma com íntron-3 retido. **C)** Proteína codificada pela isoforma com íntron-4 retido. Nas isoformas alternativas geradas a partir da retenção do íntron-3 e íntron-4, o segundo domínio TMD e parte do domínio de ligação ao ATP foram perdidos. Todas as isoformas se referem a proteínas predominantemente de conformação alfa-helice. As setas apontam para os diferentes domínios das isoformas. As setas de cores laranja, verde e amarela apontam para o primeiro, segundo domínio TMD e domínio de ligação ao ATP, respectivamente.

Os dados *in sílico* mostram que a proteína oriunda do processamento convencional da TERG_04309 possui 726 aminoácidos de extensão, totalizando 3 domínios: um domínio de ligação ao ATP (NBD) e dois domínios TMD. Curiosamente, a configuração de domínios apresentada para essa proteína, se difere da topologia relacionada com as diferentes subfamílias

mais comuns de transportadores ABC, onde a configuração de domínios se dá pela presença de dois TMD e dois NBD (**Figura 7**). Fazendo um BLAST-P utilizando a sequência de aminoácidos dessa proteína contra algumas espécies de fungos dermatófitos e não dermatófitos foi observado que as proteínas ortólogas à TERG_04309 de *T. rubrum*, apresentam importantes diferenças nas organizações estruturais, tanto para a extensão da proteína como para a presença de domínios funcionais **(Figura 13)**. Curiosamente, essa proteína também se apresenta de diferente tamanho bem como diferente organização de domínios em *Neurospora crassa* str. 73, *Saccharomyces cerevisiae* (GCA_001634645), *C. albicans* 12C e *C. auris* str. 6684. Diante do fato de algumas proteínas ortólogas apresentarem diferenças consideráveis na organização de domínios e na extensão da proteína e que poderiam se assemelhar de alguma forma com as isoformas alternativas oriundas da retenção de íntrons na TERG_04309, nós alinhamos essas isoformas com as demais proteínas (**Figura 13**). Esta Figura mostra a presença de pelo menos um NBD e um TMD em cada proteína das diferentes espécies.

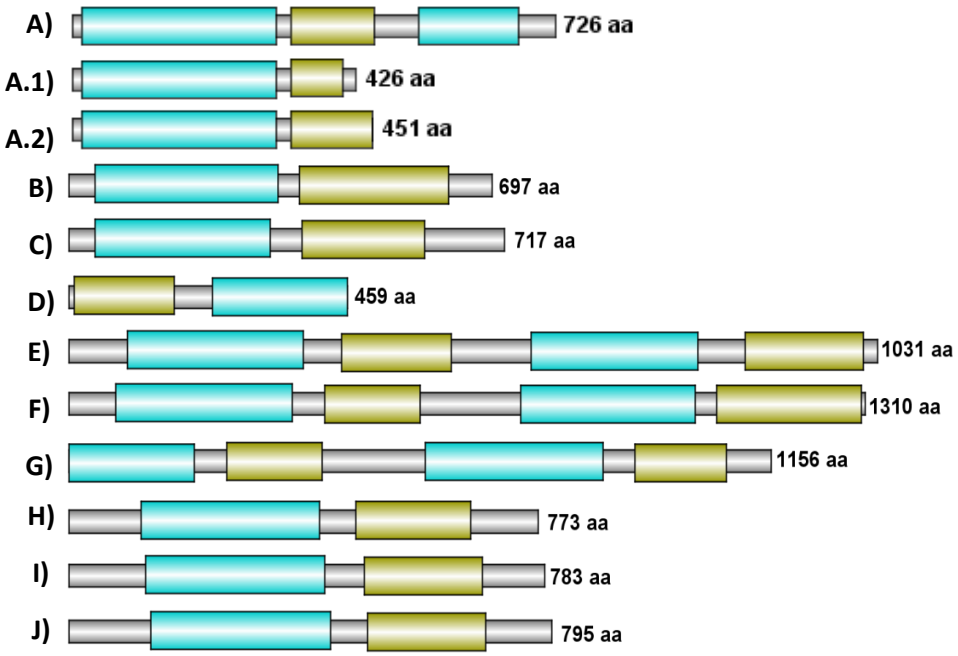


Figura 13. Proteína oriunda do gene TERG_04309 de *T. rubrum* e seus ortólogos em diferentes fungos. A) *T. rubrum* (TERG_04309). **A.1)** *T. rubrum* (Isoforma proteica oriunda do gene TERG_04309 com a retenção do íntron-3). **A.2** *T. rubrum* (Isoforma proteica oriunda do gene TERG_04309 com a retenção do íntron-4 **B)** *T. interdigitale* MR816 18 (H109_06718). **C)** *T. mentagrophytes* TIMM 2789 (TMEN_7207). **D)** *Trichophyton soudanense* CBS 452.61 (H105_04551). **E)** *Nannizzia gypsea* CBS 118893 (MGYG_04329). **F)** *Microsporum canis* CBS 113480 (MCYG_07490) **G)** *N. crassa* str. 73. (GE21DRAFT_4932) **H)** *S. cerevisiae* (GCA_001634645) (WN66_06259). **I)** *C. albicans* 12C (MEK_04790). **J)** *C. auris* str. 6684 (QG37_04886). Em azul estão representados os domínios transmembranas (TMD) e em verde os domínios de ligação ao ATP (NBD).

Essa comparação (**Figura 13**) reitera que as proteínas provenientes dessas isoformas alternativas realmente apresentam um perfil particular, sendo as menores proteínas desse alinhamento. No entanto, mesmo sendo menores, são observadas semelhanças em relação a quantidade de domínios com as proteínas de *T. soudanense* (**Figura 13.D),** *S. cerevisiae* **(Figura 13.H),** *C. albicans* (Figura **13.I)** e *C. auris* **(Figura 13.J).** Dessa forma, é possível que as isoformas alternativas ainda exerçam funções na extrusão de compostos, porém supõe-se que haja diferenças na afinidade e/ou efetividade desse mecanismo.

De fato, os esquemas demonstram a heterogeneidade dessa proteína entre diferentes fungos (**Figura 13**), bem como entre diferentes linhagens de *T. rubrum* (**Figura 14**) e revelam um perfil particular na organização estrutural na linhagem CBS118296. Diferenças estruturais dessa proteína em diferentes linhagens de *T. rubrum* levanta a possibilidade de estarem exercendo outra função ainda desconhecida.

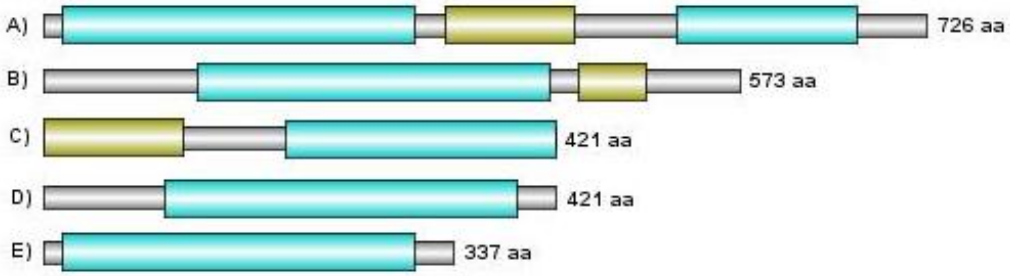


Figura 14. Proteína codificada pelo gene TERG_04309 na linhagem CBS118296 de *T. rubrum* e em outras diferentes linhagens da mesma espécie. **A)** *T. rubrum* CBS118296 (TERG_04309). **B)** *T. rubrum* str. CMCC(F)T1i) (A7C99_2094). **C)** *T. rubrum* CBS 735.88 (H106_04355). **D)** *T. rubrum* CBS 288.86 (H103_04538) **E)** *T. rubrum* CBS 202.88 (H107_04663). Em azul estão representados os domínios transmembranas (TMD) e em verde os domínios de ligação ao ATP (NBD).

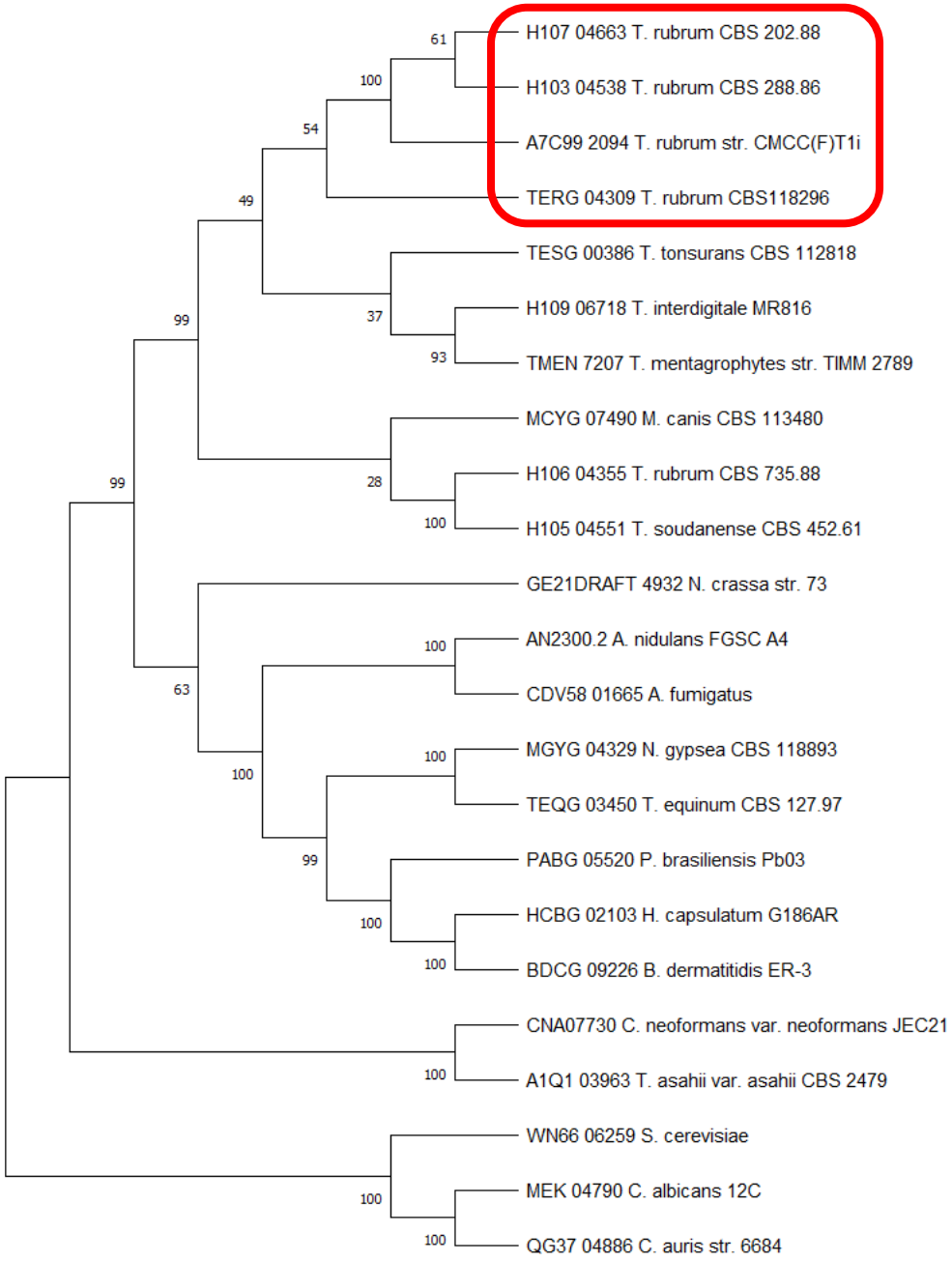


Figura 15. Análise filogenética da proteína codificada pelo gene TERG_04309 em diferentes linhagens de *T. rubrum* e em fungos de diferentes espécies.

Os dados obtidos da filogenia da proteína TERG_04309 de *T rubrum* e de seus ortólogos em outros fungos (**Figura 15**) demonstram a formação de um agrupamento entre as linhagens de *T. rubrum* como em *T. rubrum* CBS 202.88, *T. rubrum* 288.86, *T. rubrum* CMCC(F)T1i, e *T. rubrum* CBS 118893, reforçando o perfil particular dessa proteína nas linhagens dessa espécie.

Dados provenientes de BLASTp demonstram que o ortólogo dessa proteína em *M. canis* é codificado pelo gene MCYG_07490 (*mdr*1-like) possuindo 1310 aminoácidos, com os 4 domínios que são comumente encontrados nos transportadores do tipo ABC, dois domínios TMD e dois domínios de ligação ao ATP (Gadzalski *et al.*, 2016; Víglaš, J. and Olejníková, P., 2021) , da mesma forma que proteína ortóloga em *A. fumigatus*, que é codificada pelo gene CDV58_01665 e possui 1349 aminoácidos e também apresenta os domínios característicos de transportadores ABC (Gadzalski *et al.*, 2016; Víglaš, J. and Olejníková, P., 2021). Dessa forma, ambas proteínas diferem das proteínas encontradas nas linhagens de *T. rubrum*.

Dados demonstram que a super expressão desse gene *MDR1* e de outros, como *PDR1, MDR2 e MDR3* em uma linhagem de *M. canis* está associada a resistência a TRB (Kano *et al.*, 2018). Da mesma forma, esse gene em *N. gypsea* é denominado *pmd1* e codifica um transportador ABC de 1336 aminoácidos. Na levedura *Schizosaccharomyces pombe* esse gene também é denominado *pmd1* e está relacionado com a resistência a múltiplas drogas (Kovalchuk *et al.*, 2013). No dermatófito *T. equinum*, essa proteína é codificada pelo gene TEQG_03450, que é super expresso quando o fungo é exposto a diferentes drogas antifúngicas, principalmente na presença do ITR, reiterando o seu envolvimento nessas condições de estresse (Martins *et al.*, 2016).

Realmente, a literatura relata uma diversidade na topologia entre as diferentes subfamílias de transportadores ABC, os quais podem divergir em tamanho de proteínas, organização de domínios e nas funções exercidas (Gadzalski *et al.*, 2016; Víglaš, J. and Olejníková, P., 2021). Aqui, nossos resultados mostraram uma heterogeneidade de tamanho e organização de domínios proteicos de proteínas ortólogas nos diferentes fungos.

7.1.2 Análise de rede de interações gênicas:

Análise *in silico* utilizando do *software* STRING (https://string-db.org/) mostrou uma rede de interação do gene identificado pela TERG_04309 com pelo menos outros 10 genes. Os genes TERG_00588 (Proteína GPCR –ste2) e TERG_03468 (S-isoprenilcisteína O-metiltransferase) tem maior probabilidade de interagir com o gene de interesse (TERG_04309) em função de possuírem os maiores valores (*score*), sendo 0,636 e 0,319, respectivamente (**Figura 16**). Curiosamente, também é mostrado que um outro transportador ABC, codificado pelo gene TERG_04224, com possibilidade de interagir com o transportador ABC codificado pelo gene TERG_04309, apresentando um score de 0,280 nessa análise. Realmente, já foi relatado a atuação conjunta de transportadores de fármacos quando diferentes fungos são

expostos aos antifúngicos (Martins *et al.*, 2016; Kano *et al.*, 2018), o que poderia corroborar com os resultados obtidos *in silico* **(Figura 16).**

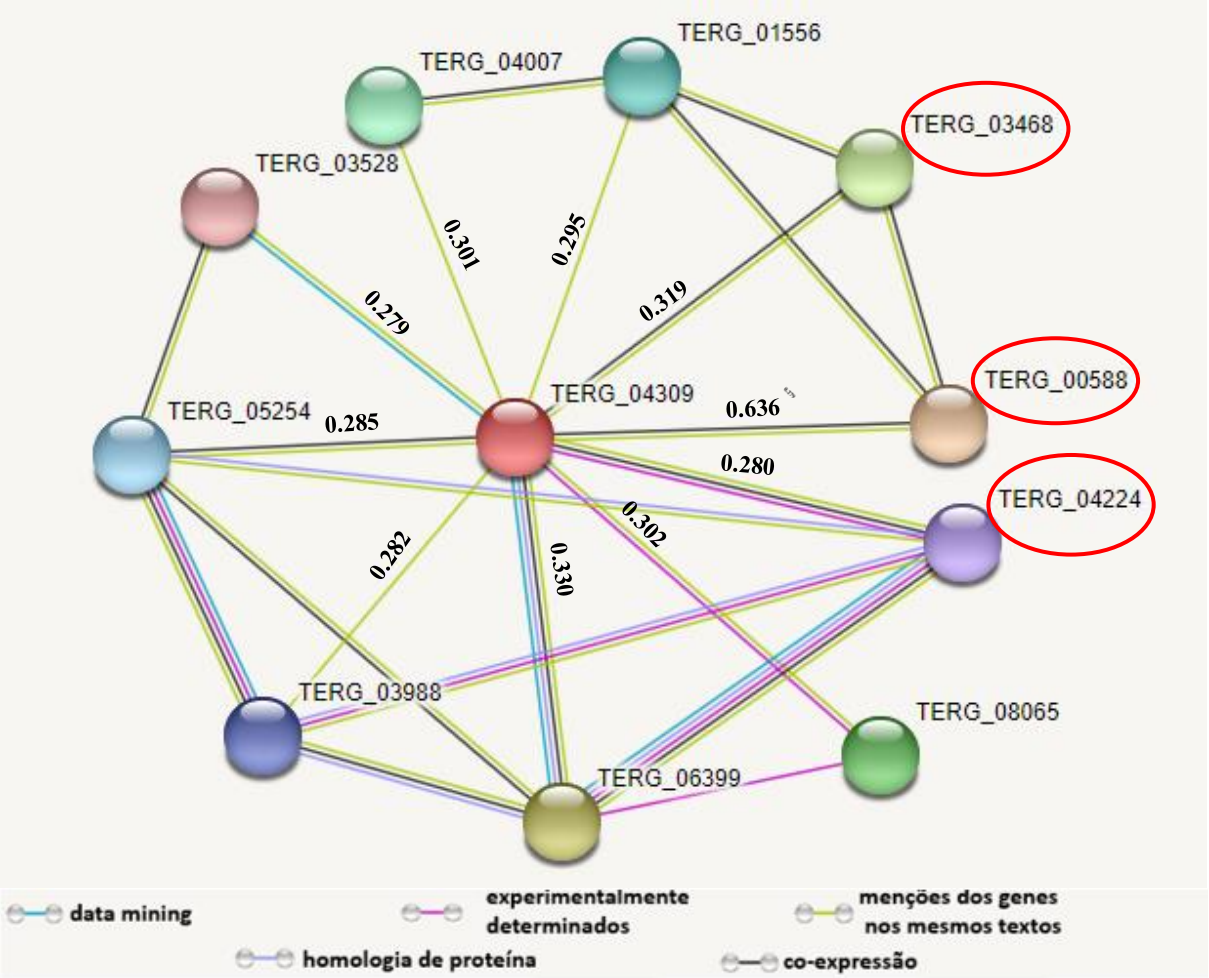


Figura 16. Rede de interação do gene TERG_04309 (Transportador ABC) de *T. rubrum* com outros genes. Nas linhas de interação são informados os *scores* obtidos entre dois genes**.** As cores das linhas de interação se referem as diferentes formas putativas dessa interação, indicadas na legenda.

Os fungos sensoriam o ambiente e com isso regulam diferentes respostas aos mais diversificados estímulos, como disponibilidade de nutrientes, presença de estressores, transições morfológicas, dentre outros (Brown *et al.*, 2018). A percepção dos estímulos é, em grande parte, mediada pelas vias de sinalização GPCR (Receptores acoplados à proteína G) que são a maior classe de receptores em fungos, e são constituídos por proteínas receptoras caracterizadas pela presença de domínios TMD e sua associação com proteínas G intracelulares (Brown *et al.*, 2018). A *ste2* é uma dessas proteínas receptoras e, em fungos com reprodução sexuada pode atuar no sensoriamento de feromônio, como descrito para *S. cerevisiae* (Versele *et al.*, 2001).

Outros trabalhos também relatam o envolvimento desse receptor com o sensoriamento envolvido em outras funções biológicas, como o quimiotropismo que é o crescimento direcionado do fungo em direção a algum estímulo químico, como no fungo *Fusarium graminearum.* Nesse trabalho, foi mostrado que a deleção do gene *ste2* faz com que o fungo perca o quimiotropismo relacionado ao composto químico-estimulante testado, proveniente do trigo (*Triticum aestivum*). Também diminui significantemente a infecção desse fungo em coleótipo de trigo em germinação, revelando a relação entre *ste2*, quimiotropismo e infecção em *F. graminearum* (Sridhar *et al.*, 2020). De forma similar, foi demonstrado que uma linhagem mutante de *Fusarium oxysporum* para o gene *ste2* teve seu quimiotropismo prejudicado, diminuindo a virulência desse fungo em plantas de tomate (Turrà *et al.*, 2015).

Realmente, os fungos possuem sofisticadas cascatas de sinalização para sensoriar e responder também a diferentes tipos de estresses, como o osmótico, de temperatura, sais, irradiação UV, oxidativo, e também exposição à antifúngicos (Bahn *et al.*, 2007). Dessa forma, os dados *in silico* obtidos da rede de interação formada (**Figura 16**) sugerem uma interação da proteína GPCR – ste2 codificada pelo gene TERG_00588 com o transportador ABC codificado pelo gene TERG_04309. Uma possibilidade de interação entre estes genes seria ao nível de membrana celular, onde haveria o sensoriamento do antifúngico pelo receptor, desencadeando o processo de aumento da expressão do gene que codifica a bomba de efluxo de fármacos.

Uma outra proteína que se destacou na rede de interação foi a codificada pelo gene TERG_03468, cuja anotação putativa é S-isoprenilcisteína O-metiltransferase e que também interage com o receptor de membrana– ste2 codificado pelo gene TERG_00588 (**Figura 16**). Em *S. cerevisae*, essa proteína é codificada pelo gene *ste14p*, que codifica a enzima ste14 metil-transferase. A atividade desta enzima é necessária para a produção e secreção do feromônio de acasalamento fator-a (Romano and Michaelis, 2001), uma vez que os fatores de feromônios são sintetizados como precursores cuja a maturação e secreção requerem diferentes processamentos pós-tradução (Boyartchuk and Rine, 1998), como as realizadas pela ste14p. Embora ambos os produtos dos genes TERG_00588 (proteína G, receptor de membrana– ste2) e TERG_03468 (S-isoprenilcisteína O-metiltransferase) estejam envolvidos no processo de acasalamento em fungos, como no sensoriamento de feromônios e no processamento de moléculas precursoras de feromônio, respectivamente, as suas funções em *T. rubrum* poderiam estar relacionadas com sensoriamento químico de compostos antifúngicos. No entanto, maiores esforços são requeridos para a compreensão dos mecanismos biológicos de associação dessas proteínas em fungos dermatófitos.

Em relação aos genes mostrados na rede de interação, uma busca nos dados de transcriptomas de *T. rubrum* exposto aos antifúngicos UDA (Mendes *et al.*, 2018) e acriflavina (Persinoti *et al.*, 2014) foi realizada e nenhum dos genes indicados na interação mostraram-se modulados, exceto o gene TERG_08065, que codifica para um transportador de membrana, que aparece induzido em 3 horas de exposição a acriflavina. Vale ressaltar que o próprio gene TERG_04309 não é modulado quando o fungo é exposto ao UDA ou a acriflavina, fato que pode ser decorrente dos tempos de cultivo empregados nesses estudos e das condições de análise e *cutoff* utilizados.

Apesar das limitações do *software* STRING, principalmente por não informar com maior precisão as condições em que essas redes de interações são estabelecidas, utilizamos os dados obtidos nessa análise para nortear alguns pontos também investigados nesse estudo. Através de abordagens como RT-qPCR, maiores informações podem ser obtidas quanto a co-regulação desses genes e sua possível interação com os transportadores de drogas, inclusive com as isoformas obtidas.

7.2 Técnicas de validação de *splicing* alternativo:

7.2.1 Validação de *splicing* alternativo por RT-PCR dos genes estudados em resposta aos antifúngicos.

Os testes de RT-PCR para conferir a efetividade da conversão do RNA em cDNA, a qualidade dessas amostras e a ausência de DNA genômico, evidenciaram amplicons em todas as condições testadas, tanto do fungo na forma planctônica, quanto na forma de biofilme, demonstrando a formação de cDNAs de qualidade. Estes resultados estão apresentados na **Figuras 17 e 18.** Os resultados desse teste nos asseguraram que as amostras submetidas às análises de retenção de íntrons não apresentaram resquícios de DNA genômico que poderiam comprometer os resultados.

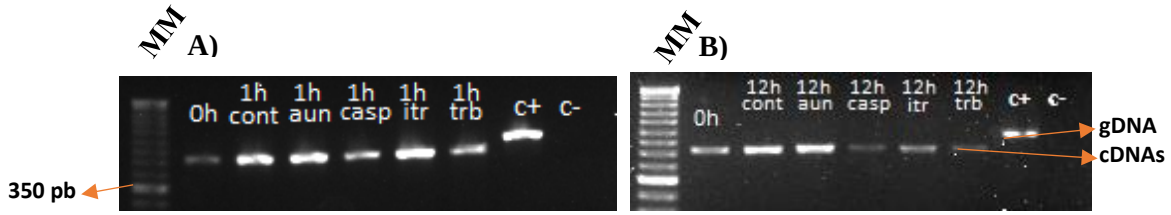


Figura 17. Amplificação do fragmento de 468 pb do gene β-tubulina nas amostras de cDNA do fungo cultivado na presença de antifúngicos ou de 527pb no DNA genômico utilizado como controle positivo. A) Amplificações das amostras de *T. rubrum* após 1h e B) amplificações das amostras de *T. rubrum* após 12h. MM: Marcador de 50 pb (Invitrogen).

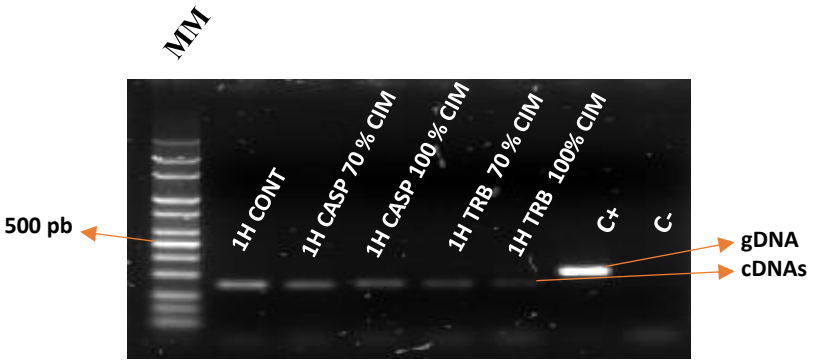


Figura 18. Amplificação do fragmento de 253 pb ou de 315pb do gene β-tubulina nas amostras de cDNA ou DNA genômico, respectivamente. O DNA genômico foi utilizado como controle positivo. Amplificações nas amostras de biofilme após 1h de exposição a diferentes compostos antifúngicos. Marcador de peso molecular MidRange 100pb (Cellco).

Após analisar as amostras obtidas quanto à qualidade e ausência de DNA genômico, reações de RT-PCR foram feitas para detectar os íntrons retidos. A partir das amplificações e visualização através da eletroforese em gel de agarose, foram evidenciados os amplicons de 409 pb referente à retenção do íntron-3 do gene TERG_04309 nos tempos de 1 e 12 horas, em todas as condições. Também foram detectados, de forma sutil, os amplicons de 217 pb, referentes à isoforma processada no tempo de 1 h. No tempo de 12 h, amplicons referentes à isoforma processada foram visualizados nas condições CONT, CASP e ITR. Esses resultados estão apresentados na **Figura 19.**

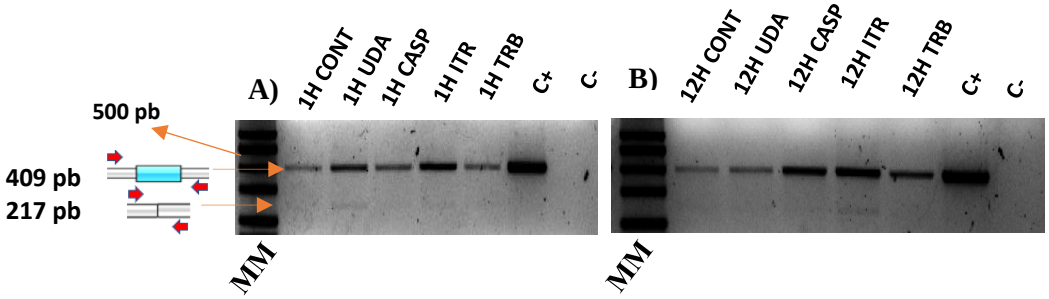


Figura 19: RT-PCR feito utilizando primers flanqueadores do íntron-3 do gene TERG_04309. As imagens **A** e **B** são referentes aos tempos de 1 e 12 h, respectivamente. Bandas de 409 pb referentes retenção do íntron-3 são mostradas em todas as condições. Bandas de baixa intensidade com 217 pb referentes à isoforma convencional são mostradas nas condições: 1h CONT, 1h UDA 1h CASP, 1h ITR, 1h TRB, 12h CONT e 12h ITR. C+: controle positivo constituído pelo DNA genômico, C- controle negativo. MM: Marcador de peso molecular MidRange 100pb (Cellco).

Para a retenção do íntron-4, os resultados de RT-PCR evidenciaram amplicons de 440 pb em todas as condições, nos tempos de 1 e 12 h. Não foram detectados amplicons referentes à isoforma processada. Esses resultados estão apresentados na **Figura 20.**

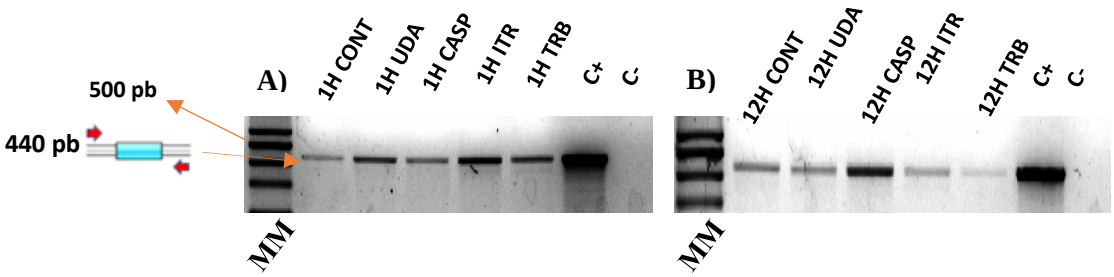


Figura 20. RT-PCR feito utilizando primers flanqueadores do íntron-4 do gene TERG_04309. As imagens **A** e **B** são referentes aos tempos de 1 e 12 h, respectivamente. Bandas de 440 pb referentes a retenção do íntron-4 são mostradas em todas as condições. C+: controle positivo referente ao DNA genômico, C- controle negativo. Marcador de peso molecular MidRange 100pb (Cellco).

Esses dados sugerem que nas condições utilizadas as diferentes isoformas provenientes do gene TERG_04309, tanto a com o íntron-3 retido quanto a com o íntron-4 retido são predominantes em *T. rubrum* e a isoforma resultante do processamento convencional se apresenta em níveis basais. Por outro lado, outros trabalhos do nosso grupo de pesquisa mostram uma maior abundância da isoforma convencional pela metodologia de RT-PCR, para diferente genes, como para os genes *impdh* (Mendes *et al.*, 2018), chaperona *hsp7* (Neves-Da-Rocha *et al.*, 2019) e a quinase *pakA*/*Ste20* (Gomes *et al.*, 2018). Dessa forma, a regulação gênica mediada por AS é dependente das funções biológicas exercidas pelos produtos gênicos e das condições a que o fungo for submetido.

7.2.2 Modulação das diferentes isoformas produzidas pelos genes analisados por RT-qPCR em resposta aos antifúngicos.

Os resultados de RT-qPCR demonstram a indução da isoforma com o íntron-3 retido do gene TERG_04309 quando o fungo é exposto ao ITR no tempo de 12 h (**Figura 21. A**).

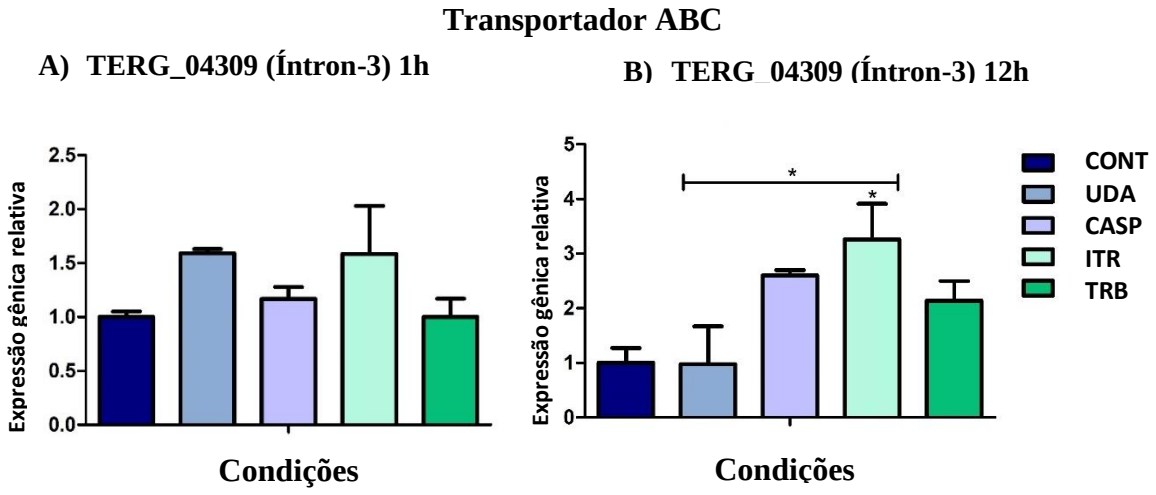


Figura 21. Análise de RT-qPCR dos níveis de retenção de íntron-3 do gene codificado pela TERG_04309 em *T. rubrum*. A) Dados de modulação gênica após 1 h de exposição aos antifúngicos. **B)** Dados de modulação gênica após 12 h de exposição aos antifúngicos. Análise estatística foi realizada pelo método t-test. Os asteriscos se referem a * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001. Como referência de modulação foi utilizado a condição de controles pareados de 1h e 12h.

Simultaneamente, é possível observar um aumento dos níveis de transcritos para a isoforma com íntron-4 retido, após exposição à CASP por 1 ou 12 h (**Figura 22.A** e **22.B**). A proteína putativa de 451 amino ácidos, formada a partir da retenção do íntron 4, poderia ter um papel no efluxo destes fármacos, principalmente se considerarmos as diferentes topologias apresentadas pelos ortólogos do gene TERG_04309 (**Fig. 11 e 13**).

Transportador ABC

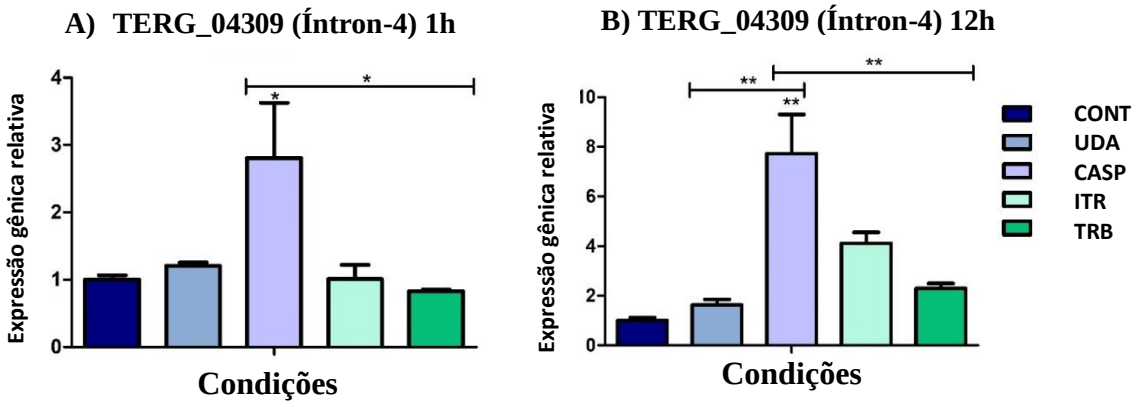


Figura 22. Análise de RT-qPCR dos níveis de retenção de íntron-4 do gene TERG_04309 de *T. rubrum*. A) Dados de modulação gênica após 1 h de exposição aos antifúngicos. **B)** Dados de modulação gênica pós 12 h de exposição aos antifúngicos. Análise estatística foi realizada pelo método t-test. Os asteriscos se referem a * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001. Como referência de modulação foi utilizado a condição de controles pareados de 1h e 12h.

Em relação aos dados de expressão gênica para a isoforma convencional, foi observado um aumento proeminente nos níveis de transcritos após exposição a TRB por 1 h (**Figura 23. A**) e, em 12 h, esse aumento é mais evidenciado após a exposição à ITR e TRB (**Figura 23. B**).

Transportador ABC

A) TERG_04309 (Expressão total) 1h **B) TERG_04309 (Expressão total) 12h**

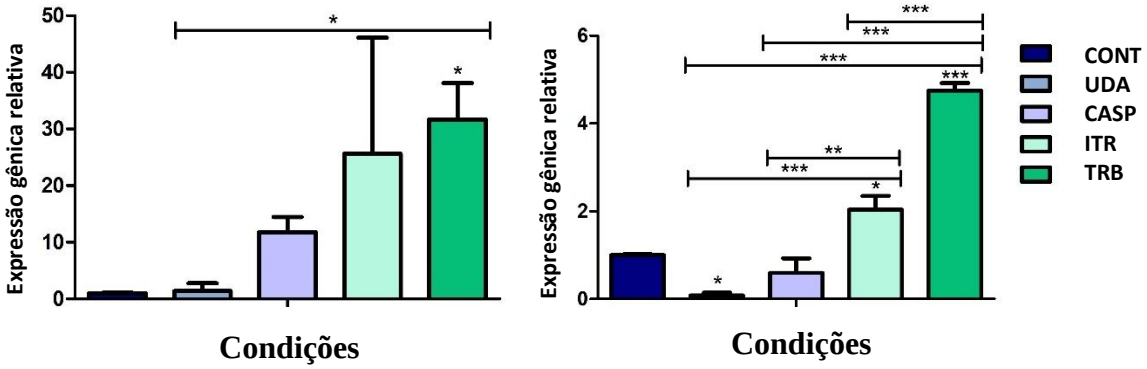


Figura 23. Análise de RT-qPCR dos níveis de expressão total do gene TERG_04309 do *T. rubrum*. A) Dados de modulação gênica após 1 h de exposição a antifúngicos. **B**) Dados de modulação gênica após 12 h de exposição aos antifúngicos. Análise estatística foi realizada pelo método t-test. Os asteriscos se referem a * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001. Como referência de modulação foi utilizado a condição de controles pareados de 1h e 12h.

A produção diferente dessas isoformas sugere que a regulação do transportador TERG_04309 é mediada por mecanismo de *splicing* alternativo e modulado de maneira tempo e droga-dependentes. Apesar destas isoformas alternativas apresentarem a possibilidade de manterem a sua função de transporte ou funções adicionais, conforme discutido acima, não podemos descartar a possibilidade de serem versões não funcionais, codificando proteínas truncadas quando o fungo é exposto à antifúngicos que não são substrato para esse transportador. Esse fenômeno já foi sugerido para outros genes do mesmo fungo, como na *hsp7* (Neves-Da-Rocha *et al.*, 2019) e *impdh* (Mendes *et al.*, 2018). A retenção de íntrons em mRNAs desses genes conduzem para uma mudança no quadro de leitura da proteína, tendo como consequência a adição de *stop códons* prematuros na tradução, resultando na formação de proteínas truncadas e possivelmente não funcionais.

Além disso, foi observada a indução da expressão da isoforma convencional após exposição do fungo a ITR e TRB, o que pode sugerir afinidade dessa isoforma com esse composto, uma vez que os MDRs possuem afinidade à determinadas classes de antifúngicos (Prasad and Rawal, 2014).

Até o presente momento, a regulação de um transportador de drogas via SA não havia sido validada em dermatófitos. Contudo, um estudo prévio demonstrou a ocorrência da modulação compensatória em transportadores de drogas. Nesse estudo, observou-se que a linhagem mutante de *T. interdigitale* Δ*mdr2* apresentava um alto nível transcricional de *mdr4*, quando foi cultivado em meio contendo griseofulvina, comparado a linhagem selvagem,

sugerindo que o gene *mdr4* estaria compensando a inativação de *mdr2* (Martins *et al.*, 2016). Em conjunto, esses achados demonstram a complexidade da regulação de transportadores de drogas em dermatófitos.

Adicionalmente, avaliando a expressão dos genes que possivelmente interagem com o gene TERG_04309 (**Figura 16**), observou-se que um outro transportador ABC (TERG_04224) é induzido nas condições de CASP 1h e ITR 12h (**Figura 24**). Da mesma forma, o mesmo gene em *T. equinum*, que é codificado pelo gene TEQG_03450 foi super expresso quando o fungo foi exposto ao ITR, sugerindo assim, o envolvimento desse transportador com o efluxo desse composto (Martins *et al.*, 2016). Curiosamente, a expressão do transportador ABC TERG_04224 (**Figura 24**) é induzida após exposição a CASP por 1 h, mesma condição em que a isoforma com o íntron-4 retido do transportador ABC TERG_04309 é induzida (**Figura 22**), corroborando com os resultados *in silico* que indicaram a co-expressão dos genes Transportador ABC (TERG_04309) e Transportador ABC (TERG_04224) (**Figura 16**). Em conjunto, os dados obtidos acerca da modulação do transportador codificado pela TERG_04224 e da isoforma alternativa oriunda do gene TERG_04309 sugerem que a expressão do transportador TERG_04224 poderia compensar uma perda ou desvio de função da isoforma com íntron-4 retido, durante a exposição a CASP, ou mesmo auxiliar sinergicamente no efluxo deste fármaco.

Os compostos que são substratos para esses transportadores podem apresentar maior ou menor seletividade, como anteriormente demonstrado (Monod *et al.*, 2019). Esse estudo evidenciou a modulação da expressão de diferentes transportadores de fármacos (*TruMDR1*, *TruMDR2*, *TruMDR3* e *TruMDR5 e TruMFS2*) em uma linhagem de *T. rubrum* (TIM20092) isolada de paciente com *tinea pedis* resistente ao tratamento com azóis. Foi observado que a expressão do gene *TruMDR3* ocorreu de modo droga-dependente, uma vez que esse gene foi super-expresso quando o fungo foi exposto aos antifúngicos ITR e voriconazol. Além disto, a deleção desse gene anula e diminui a resistência dessa linhagem a voriconazol e ITR, respectivamente, demonstrando a participação de *TruMDR3* na resistência a estes fármacos através do efluxo celular.

Transportador ABC

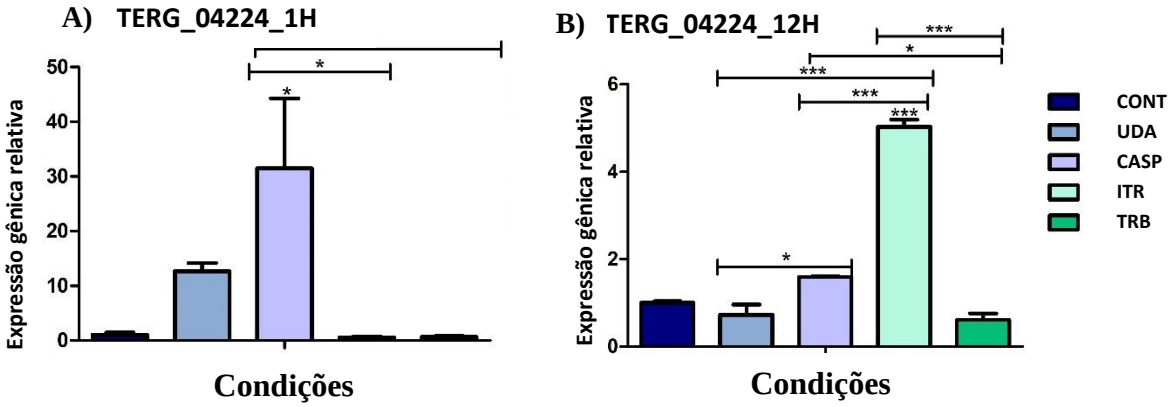


Figura 24. Análise de RT-qPCR dos níveis de expressão total do gene TERG_04224 do *T. rubrum*. A) Dados de modulação gênica após 1 h de exposição a antifúngicos. **B**) Dados de modulação gênica após 12 h de exposição aos antifúngicos. Análise estatística foi realizada pelo método t-test. Os asteriscos se referem a * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001. Como referência de modulação foi utilizado a condição de controles pareados de 1h e 12h.

Avaliamos também a expressão de outros dois genes cujas proteínas poderiam interagir com o Transportador ABC (TERG_04309), segundo a rede de interação obtida pelo STRING (**Figura 16**). A expressão do gene TERG_03468 (isoprenilcisteína O-metiltransferase – *ste14p*) não apresentou significativa modulação para as condições analisadas. (**Figura 25**). Realmente, os dados da literatura não relatam relação entre bombas de efluxo de fármacos com a enzima isoprenilcisteína O-metiltransferase, que parece estar relacionada com produção e secreção do feromônio de acasalamento fator-a (Romano and Michaelis, 2001), realizando modificações de pós-tradução, como a metilação, nos peptídeos que atuam como feromônio em fungos (Boyartchuk and Rine, 1998). Portanto, os dados de expressão gênica aqui obtidos não mostram co-expressão entre os genes TERG_04309 e TERG_03468, diferindo dos dados de interação *in silico* obtidos (**Figura 16**).

Um outro gene cuja proteína poderia interagir com o Transportador ABC (TERG_04309) é o TERG_00588 (Proteína GPCR – ste2). A avaliação desse gene mostrou a sua expressiva indução em 12 h quando o fungo foi exposto a CASP (**Figura 26**), o que sugere o envolvimento do produto desse gene na sinalização para o efluxo deste fármaco. Esse dado reitera a co-expressão dessa proteína G com o gene TERG_04309.

S-isoprenilcesteína O-metiltransferase – *ste14p*

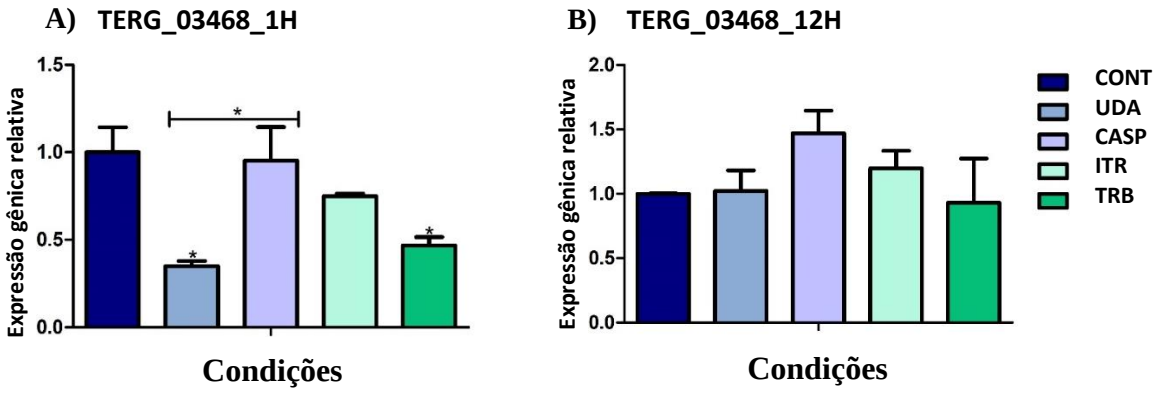


Figura 25. Análise de RT-qPCR dos níveis de expressão total do gene TERG_03468 de *T. rubrum*. A) Dados de modulação gênica após 1 h de exposição a antifúngicos. **B**) Dados de modulação gênica após 12 h de exposição aos antifúngicos. Análise estatística foi realizada pelo método t-test. Os asteriscos se referem a * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001. Como referência de modulação foi utilizado a condição de controles pareados de 1h e 12h.

Receptor de feromônio - *Ste2*

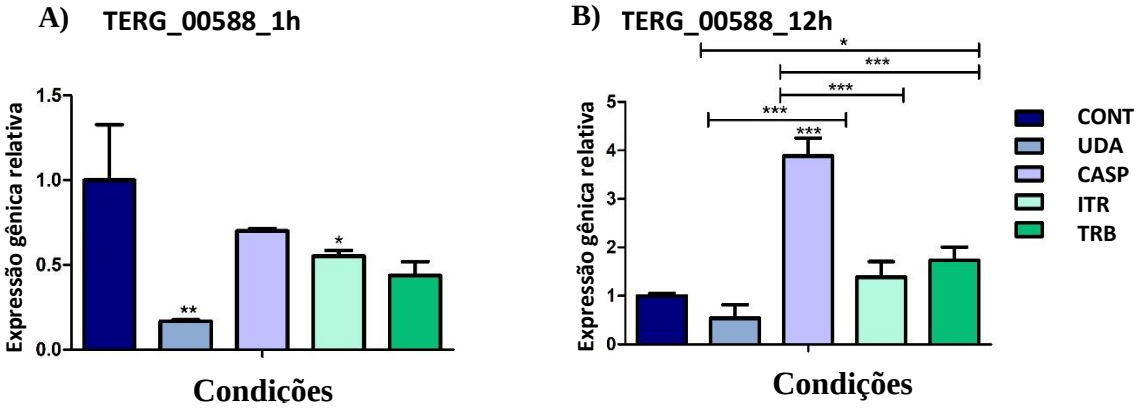


Figura 26. Análise de RT-qPCR dos níveis de expressão total do gene TERG_00588 de *T. rubrum*. A) Dados de modulação gênica após 1 h de exposição a antifúngicos. **B**) Dados de modulação gênica após 12 h de exposição aos antifúngicos. Análise estatística foi realizada pelo método t-test. Os asteriscos se referem a * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001. Como referência de modulação foi utilizado a condição de controles pareados de 1h e 12h.

Adicionalmente, as análises de RT-qPCR também foram conduzidas para avaliar a modulação das diferentes isoformas do gene TERG_04309 no biofilme maduro de *T. rubrum* após a exposição aos compostos antifúngicos CASP e TRB em concentrações correspondentes a CIM_{70} e CIM_{100} (**Figura 27**). A utilização do CIM_{100} ocorreu em função das características inerentes ao biofilme de apresentar menor susceptibilidade a compostos antifúngicos.

Transportador ABC

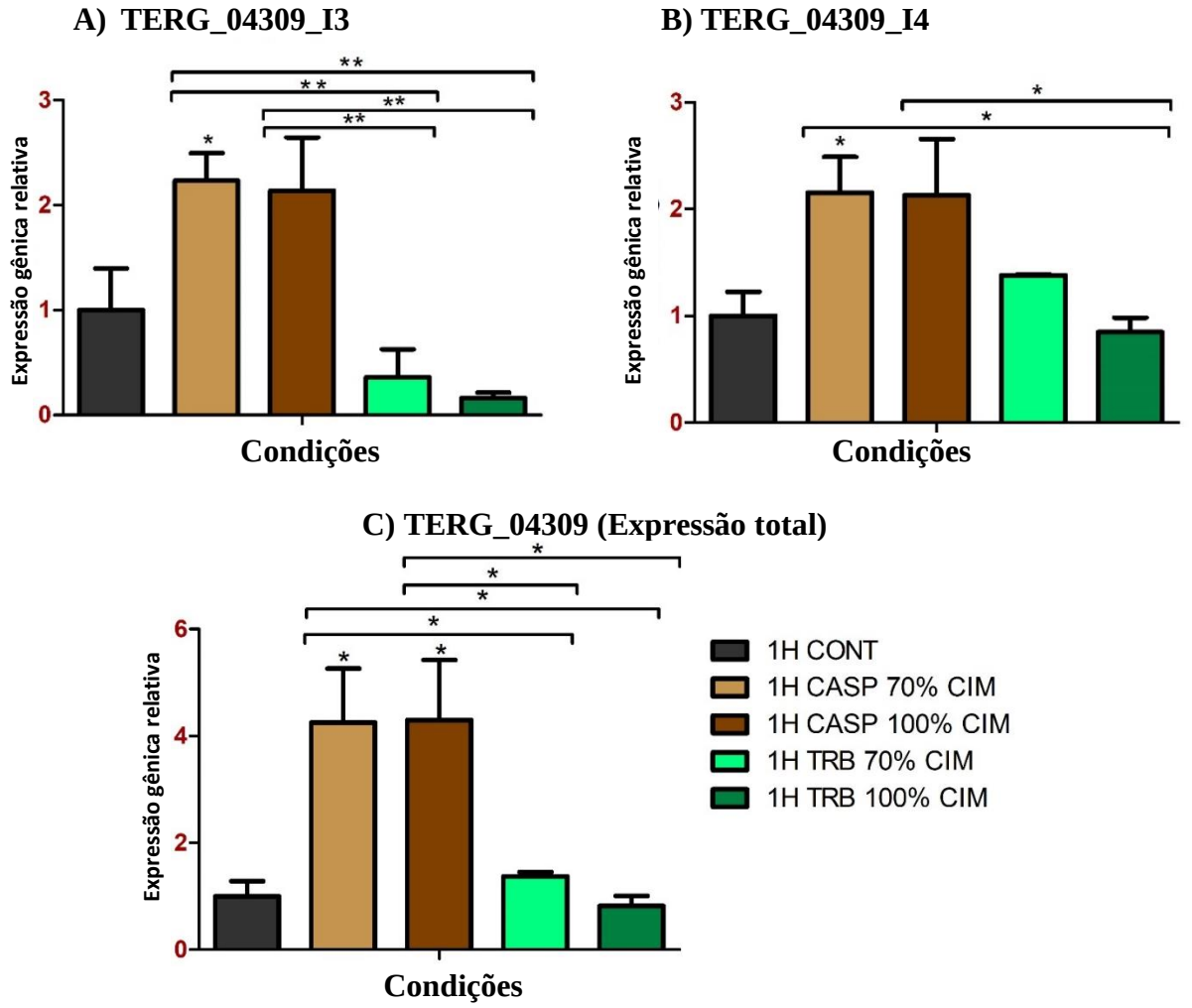


Figura 27. Análise de RT-qPCR dos níveis expressão das diferentes isoformas do gene TERG_04309 de *T. rubrum* após 1 h de exposição do biofilme aos antifúngicos. A) Níveis de expressão da retenção do íntron-3 do gene TERG_04309. **B)** Níveis de expressão da retenção íntron-4 do gene TERG_04309. **C)** Níveis de expressão total do gene TERG_04309. Análise estatística foi realizada pelo método t-test. Os asteriscos se referem a * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001. Como referência de modulação foi utilizado a condição de controles pareados de 1h e 12h.

Curiosamente, os resultados de RT-qPCR demonstram a indução tanto da isoforma com o íntron-3 retido (**Figura 27. A**), quanto a isoforma com o íntron-4 retido do gene TERG_04309 (**Figura 27. B**), quando o biofilme foi exposto a CASP. Esses dados corroboram parcialmente com avaliação feita anteriormente em micélio (crescimento planctônico), na qual a isoforma com o íntron-4 retido apresentou aumento dos níveis de transcritos após a exposição a CASP (**Figura 22. B**). Análise dos biofilmes de *T. rubrum* também mostrou a indução da expressão do total do gene TERG_04309 (**Figura 27. C**), pressupondo-se a possível modulação das três isoformas em presença de CASP. Dessa forma, empregando esse segundo modelo de

estudo, mostramos que a regulação da expressão de genes envolvidos com efluxo de fármacos é complexa e influenciada pela condição de cultivo e por eventos de SA. Os dados de modulação apresentados na condição de biofilme sugerem a participação de pelo menos duas isoformas do transportador codificado pela TERG_04309 na resposta a exposição a CASP, o que pode contribuir para o traço de maior resistência dessa estrutura.

Diferenças no perfil de modulação das isoformas entre as condições de crescimento estudadas, planctônico e biofilme, podem ser explicadas pelas particularidades que essas diferentes condições estão sujeitas, em termos de comunicação, e de regulação de expressão gênica. De fato, o ambiente do biofilme altera a modulação gênica dos fungos interferindo na quantidade e qualidade das proteínas e enzimas disponíveis, como as relacionadas com a ancoragem da parede celular, adesinas, fatores de transcrição (De Barros *et al.*, 2017; Kean *et al.*, 2018), bem como as bombas de efluxo.

A partir dos dados obtidos neste estudo, concluímos que o dermatófito *T. rubrum*, em ambiente de biofilme, responde a presença de CASP de um modo peculiar. Além do gene TERG_04309 ser superexpresso, ocorre uma maior expressão de ambas isoformas alternativas, produto da retenção dos íntrons 3 e 4, sugerindo que neste ambiente e em resposta ao fármaco atuem pelo menos 2 isoformas proteicas. Este resultado é original e pode ajudar a explicar a maior resistência dos fungos aos fármacos em ambiente de biofilme.

O biofilme fúngico é composto por uma estrutura complexa formada por populações celulares associadas a determinadas superfícies e inseridas em uma matriz celular e apresenta como característica importante a resistência aos antifúngicos (Martinez-Rossi *et al.*, 2018a). Nesse sentido, outros estudos destacaram o aumento das CIMs de diferentes fármacos em biofilmes comparado com a condição planctônica em dermatófitos como *M. canis* e *T. mentagrophytes* (Castelo-Branco *et al.*, 2020) e também em *C. auris* (Kean *et al.*, 2018). Entre os possíveis mecanismos associados à resistência estão a barreira física aos antifúngicos, que é conferida pela matriz de glucana que envolve as populações celulares e a sinalização celular que potencializa os mecanismos regulatórios nessa população (Robbins *et al.*, 2017).

A ocorrência desse novo mecanismo regulatório em biofilme fúngico sugere a atuação conjunta do arsenal fúngico genético-regulatório e fisiológico contra moléculas citotóxicas e nos permite expandir mais o entendimento acerca dos mecanismos adaptativos que são acionados pelos fungos para contrapor a toxicidade dos antifúngicos.

Conclusões

8 Conclusão

Em função dos dados aqui apresentados, conclui-se que:

Transportadores do tipo ABC apresentam uma diversidade de topologias e essa organização estrutural também pode ser influenciada por eventos de AS.

O transportador ABC codificado pela TERG_04309 apresenta 3 isoformas (retenção íntron-3, retenção íntron-4 e isoforma convencional), que foram validadas e se mostraram diferencialmente moduladas em função da classe de composto antifúngico e da condição de cultivo, culturas planctônicas e biofilmes.

No crescimento planctônico, ocorre a indução da isoforma convencional e da isoforma com íntron-3 retido, ambas codificadas pela TERG_04309, em resposta a exposição a ITR, sugerindo que um efeito sinérgico destas isoformas para resistência a este fármaco. Dado que é reiterado com a co-expressão do gene que codifica outra bomba de efluxo (TERG_04224), que também é induzido após exposição a ITR.

Efeito sinérgico é também sugerido entre o gene (TERG_04224) e a isoforma com íntron-4 retido, codificada pela TERG_04309, em resposta a CASP. Além disso, há a super expressão da isoforma convencional do gene TERG_04309 quando o fungo é exposto a TRB.

A consequência da retenção de íntrons do gene codificado pela TERG_04309 é a geração de proteínas menores com perda parcial de alguns domínios. A semelhança dessas isoformas com algumas proteínas ortólogas sugere a possibilidade da função ter sido preservada, com prováveis alterações quanto a afinidade e efetividade na extrusão.

Enquanto no ambiente planctônico o gene TERG_04309 tem sua expressão aumentada em resposta a CASP (isoforma alternativa íntron-4), ITR (isoforma convencional e isoforma alternativa íntron-3) e TRB (isoforma convencional), no ambiente de biofilme, ocorre a indução pronunciada de ambas as isoformas alternativas deste gene e possivelmente da isoforma convencional, em resposta a CASP. Dado que reitera a especificidade das bombas de efluxo pelos fármacos e também ao ambiente no qual o fungo está inserido.

Em suma, os dados produzidos nesse trabalho sugerem que a retenção de íntrons atua como um mecanismo regulatório em transportadores de drogas. A produção concomitante de isoformas em resposta a exposição aos fármacos produz um efeito sinérgico e potencializador nas respostas adaptativas ao estresse causado por antifúngicos. Esses mecanismos podem assegurar respostas rápidas e efetivas à diferentes condições de estresse mediante a produção de um vasto repertório de isoformas. Esse repertório de isoformas pode estar associado a maior resistência dos fungos a antifúngicos em biofilmes. Maiores investigações devem ser conduzidas para que se possa desvendar o complexo circuito regulatório e adaptativo ativado pelos fungos para se contrapor aos efeitos citotóxicos dos antifúngicos, afim de que novas estratégias terapêuticas possam ser utilizadas com sucesso.

Referências bibliográficas

8 Referências:

ATLAS, R. M. (1993). Handbook of microbiological media, CRC Press.

AJESH, K.; SREEJITH, K. Cryptococcus laurentii biofilms: structure, development and antifungal drug resistance. **Mycopathologia,** v. 174, n. 5-6, p. 409-419, 2012. ISSN 0301-486X.

AL-KHIKANI, F. H.; AYIT, A. S. Major challenges in dermatophytosis treatment: current options and future visions. **Egyptian Journal of Dermatology and Venerology,** v. 41, n. 1, p. 1, 2021. ISSN 1110-6530.

AL-KHIKANI, F. H. O. Dermatophytosis a worldwide contiguous fungal infection: Growing challenge and few solutions. **Biomedical and Biotechnology Research Journal (BBRJ),** v. 4, n. 2, p. 117, 2020. ISSN 2588-9834.

BAHN, Y. S. et al. Sensing the environment: lessons from fungi. **Nat Rev Microbiol,** v. 5, n. 1, p. 57-69, Jan 2007. ISSN 1740-1534. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17170747 >.

BAO, Y.-Q.; WAN, Z.; LI, R.-Y. In vitro antifungal activity of micafungin and caspofungin against dermatophytes isolated from China. **Mycopathologia,** v. 175, n. 1-2, p. 141-145, 2013. ISSN 0301-486X.

BARAL, B. Evolutionary trajectories of entomopathogenic fungi ABC transporters. **Advances in genetics,** v. 98, p. 117-154, 2017. ISSN 0065-2660.

BITENCOURT, T. A. et al. HacA Governs Virulence Traits and Adaptive Stress Responses in. **Front Microbiol,** v. 11, p. 193, 2020. ISSN 1664-302X. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32153523 >.

BORGES-WALMSLEY, M. I.; MCKEEGAN, K. S.; WALMSLEY, A. R. Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs. **Biochem J,** v. 376, n. Pt 2, p. 313-38, Dec 1 2003. ISSN 1470-8728 (Electronic)0264-6021 (Linking). Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=13678421 >.

BOUCHARA, J. P.; MIGNON, B.; CHATURVEDI, V. Dermatophytes and Dermatophytoses: A Thematic Overview of State of the Art, and the Directions for Future Research and Developments. **Mycopathologia,** v. 182, n. 1-2, p. 1-4, Feb 2017. ISSN 1573-0832. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28138872 >.

BOYARTCHUK, V. L.; RINE, J. Roles of prenyl protein proteases in maturation of Saccharomyces cerevisiae a-factor. **Genetics,** v. 150, n. 1, p. 95-101, Sep 1998. ISSN 0016-6731. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9725832 >.

BRITO-MADURRO, A. G. et al. A single amino acid substitution in one of the lipases of Aspergillus nidulans confers resistance to the antimycotic drug undecanoic acid. **Biochem Genet,** v. 46, n. 9-10, p. 557-65, Oct 2008. ISSN 0006-2928. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18516670 >.

BROWN, N. A. et al. Fungal G-protein-coupled receptors: mediators of pathogenesis and targets for disease control. **Nat Microbiol,** v. 3, n. 4, p. 402-414, 04 2018. ISSN 2058-5276. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29588541 >.

CAMPOY, S.; ADRIO, J. L. Antifungals. **Biochem Pharmacol,** v. 133, p. 86-96, 06 2017. ISSN 1873-2968. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27884742 >.

CASTELO-BRANCO, D. D. S. C. M. et al. In vitro and ex vivo biofilms of dermatophytes: a new panorama for the study of antifungal drugs. **Biofouling,** v. 36, n. 7, p. 783-791, 2020. ISSN 0892-7014.

CAZEDEY, E. C. L. et al. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de itraconazol em produtos farmacêuticos por CLAE. **Química Nova,** v. 30, n. 4, p. 774-776, 2007. ISSN 0100-4042.

CERVELATTI, E. P. et al. Molecular cloning and characterization of a novel ABC transporter gene in the human pathogen Trichophyton rubrum. **Medical mycology,** v. 44, n. 2, p. 141-147, 2006. ISSN 1460-2709.

COELHO, L. M. et al. *In vitro* antifungal drug susceptibilities of dermatophytes microconidia and arthroconidia. **J Antimicrob Chemother,** v. 62, p. 758-761, 2008.

COSTA-ORLANDI, C. B. et al. In vitro characterization of Trichophyton rubrum and T. mentagrophytes biofilms. **Biofouling,** v. 30, n. 6, p. 719-27, 2014. ISSN 1029-2454. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24856309 >.

DAS, S. K.; BANERJEE, A. B. Effect of undecanoic acid on lipid composition of Trichophyton rubrum. **Mycopathologia,** v. 83, n. 1, p. 35-9, 1983. ISSN 0301-486X. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6633633 >.

DE BARROS, P. P. et al. Temporal Profile of Biofilm Formation, Gene Expression and Virulence Analysis in Candida albicans Strains. **Mycopathologia,** v. 182, n. 3-4, p. 285-295, Apr 2017. ISSN 1573-0832. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27830437 >.

DE DONCKER, P. et al. Itraconazole pulse therapy for onychomycosis and dermatomycoses: an overview. **Journal of the American Academy of Dermatology,** v. 37, n. 6, p. 969-974, 1997. ISSN 0190-9622.

_____. Itraconazole: What clinicians should know? **Indian Journal of Drugs in Dermatology,** v. 3, n. 1, p. 4, 2017. ISSN 2455-3972.

DE HOOG, G. S. et al. Toward a Novel Multilocus Phylogenetic Taxonomy for the Dermatophytes. **Mycopathologia,** v. 182, n. 1-2, p. 5-31, Feb 2017. ISSN 1573-0832 (Electronic)0301-486X (Linking). Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=27783317 >.

DENG, S. et al. In vitro antifungal susceptibility profiles of 12 antifungal drugs against 55 Trichophyton schoenleinii isolates from tinea capitis favosa patients in Iran, Turkey, and China. **Antimicrobial agents and chemotherapy,** v. 61, n. 2, 2017. ISSN 0066-4804.

DURDU, M. et al. Topical and systemic antifungals in dermatology practice. **Expert Rev Clin Pharmacol,** v. 10, n. 2, p. 225-237, Feb 2017. ISSN 1751-2441. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27868472 >.

GADZALSKI, M.; CIESIELSKA, A.; STĄCZEK, P. Bioinformatic survey of ABC transporters in dermatophytes. **Gene,** v. 576, n. 1 Pt 3, p. 466-75, Jan 2016. ISSN 1879-0038. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26524502 >.

GODOY-MARTINEZ, P. et al. Onychomycosis in São Paulo, Brazil. **Mycopathologia,** v. 168, n. 3, p. 111-6, Sep 2009. ISSN 1573-0832. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19424818 >.

GOMES, E. V. et al. STE20/PAKA Protein Kinase Gene Releases an Autoinhibitory Domain through Pre-mRNA Alternative *Splicing* in the Dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **Int. J. Mol. Sci.,** v. 19, n. 11, p. 11, Nov 20 2018. ISSN 1422-0067 (Electronic)1422-0067 (Linking). Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=30463281 >.

GOMEZ, C. et al. Regulation of gene expression in protozoa parasites. **J Biomed Biotechnol,** v. 2010, p. 726045, 2010. ISSN 1110-7251. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20204171 >.

GRAMINHA, M. A. et al. Terbinafine resistance mediated by salicylate 1-monooxygenase in Aspergillus nidulans. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 48, n. 9, p. 3530-5, Sep 2004. ISSN 0066-4804. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15328121 >.

GRÜTZMANN, K. et al. Fungal alternative splicing is associated with multicellular complexity and virulence: a genome-wide multi-species study. **DNA Res,** v. 21, n. 1, p. 27-39, Feb 2014. ISSN 1756-1663. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24122896 >.

GULATI, M.; NOBILE, C. J. Candida albicans biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. **Microbes and infection,** v. 18, n. 5, p. 310-321, 2016. ISSN 1286-4579.

HAVLICKOVA, B.; CZAIKA, V. A.; FRIEDRICH, M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. **Mycoses,** v. 51 Suppl 4, p. 2-15, Sep 2008. ISSN 1439-0507. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18783559 >.

HEALEY, K. R.; PERLIN, D. S. Fungal Resistance to Echonocandins and the MDR Phenomenon in *Candida glabrata*. **Journal of Fungi,** v. 4, 2018.

HEIDRICH, D. et al. Dermatophytosis: a 16-year retrospective study in a metropolitan area in southern Brazil. **The Journal of Infection in Developing Countries,** v. 9, n. 08, p. 865-871, 2015. ISSN 1972-2680.

JACOB, T. R. et al. Heat Shock Protein 90 (Hsp90) as a Molecular Target for the Development of Novel Drugs Against the Dermatophyte Trichophyton rubrum. **Front Microbiol,** v. 6, p. 1241, 2015. ISSN 1664-302X. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26617583 >.

JIN, L. et al. Transcriptome analysis reveals the complexity of alternative splicing regulation in the fungus Verticillium dahliae. **BMC Genomics,** v. 18, n. 1, p. 130, 02 2017. ISSN 1471-2164. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28166730 >.

KANO, R. et al. Resistance mechanism in a terbinafine-resistant strain of Microsporum canis. **Mycopathologia,** v. 183, n. 3, p. 623-627, 2018. ISSN 1573-0832.

KARYGIANNI, L. et al. Biofilm Matrixome: Extracellular Components in Structured Microbial Communities. **Trends Microbiol,** v. 28, n. 8, p. 668-681, 08 2020. ISSN 1878-4380. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32663461 >.

KEAN, R. et al. Transcriptome assembly and profiling of Candida auris reveals novel insights into biofilm-mediated resistance. **Msphere,** v. 3, n. 4, 2018. ISSN 2379-5042.

KEMPKEN, F. Alternative splicing in ascomycetes. **Appl Microbiol Biotechnol,** v. 97, n. 10, p. 4235-41, May 2013. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=23515838 >.

KLEPIKOVA, A. V. et al. A high resolution map of the Arabidopsis thaliana developmental transcriptome based on RNA-seq profiling. **The Plant Journal,** v. 88, n. 6, p. 1058-1070, 2016. ISSN 0960-7412.

KOVALCHUK, A.; LEE, Y. H.; ASIEGBU, F. O. Diversity and evolution of ABC proteins in basidiomycetes. **Mycologia,** v. 105, n. 6, p. 1456-70, 2013 Nov-Dec 2013. ISSN 0027-5514. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23928421 >.

LAKSMIPATHY, D. T.; KANNABIRAN, K. Review on dermatomycosis: pathogenesis and treatment. **Natural Science,** v. 2, n. 7, p. 6, March 2010. ISSN 726-731.

LANG, E. A. S. et al. The stuA gene controls development, adaptation, stress tolerance, and virulence of the dermatophyte Trichophyton rubrum. **Microbiol Res,** v. 241, p. 126592, Dec 2020. ISSN 1618-0623. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33002720 >.

LAW, C. J.; MALONEY, P. C.; WANG, D. N. Ins and outs of major facilitator superfamily antiporters. **Annu Rev Microbiol,** v. 62, p. 289-305, 2008. ISSN 0066-4227. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18537473 >.

LIU, W. et al. IBS: an illustrator for the presentation and visualization of biological sequences. **Bioinformatics,** v. 31, n. 20, p. 3359-61, Oct 2015. ISSN 1367-4811. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26069263 >.

LIU, Y. et al. Impact of alternative splicing on the human proteome. **Cell reports,** v. 20, n. 5, p. 1229-1241, 2017. ISSN 2211-1247.

LUPETTI, A. et al. Molecular basis of resistance to azole antifungals. **Trends Mol Med,** v. 8, n. 2, p. 76-81, Feb 2002. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11815273 >.

MARTINEZ, D. A. et al. Comparative genome analysis of *Trichophyton rubrum* and related dermatophytes reveals candidate genes involved in infection. **MBio,** v. 3, n. 5, 2012. ISSN 2150-7511 (Electronic). Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22951933 >.

MARTINEZ, R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. **Jornal Brasileiro de Pneumologia,** v. 32, n. 5, p. 449-460, 2006. ISSN 1806-3713.

MARTINEZ-ROSSI, N. M. et al. Dermatophyte Resistance to Antifungal Drugs: Mechanisms and Prospectus. **Front Microbiol,** v. 9, p. 1108, 2018a. ISSN 1664-302X. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29896175 >.

MARTINEZ-ROSSI, N. M.; PERES, N. T.; ROSSI, A. Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. **Mycopathologia,** v. 166, n. 5-6, p. 369-83, 2008 Nov-Dec 2008a. ISSN 0301-486X. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18478356 >.

MARTINEZ-ROSSI, N. M.; PERES, N. T. A.; ROSSI, A. Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. **Mycopathologia,** v. 166, p. 369-383, 2008b.

MARTINS, M. P. et al. Compensatory expression of multidrug-resistance genes encoding ABC transporters in dermatophytes. **J Med Microbiol,** v. 65, p. 605-610, Jul 2016. ISSN 0022-2615. Available at: < <Go to ISI>://000382412900004 >.

MCCARTHY, M. W. et al. Novel Agents and Drug Targets to Meet the Challenges of Resistant Fungi. **J Infect Dis,** v. 216, n. suppl_3, p. S474-S483, 08 2017. ISSN 1537-6613. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28911042 >.

MEINERZ, A. R. M. et al. Efeitos de doses elevadas da terbinaina e itraconazol em ratos wistar. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas,** v. 43, 2007.

MENDES, N. S. et al. Transcriptome-wide survey of gene expression changes and alternative splicing in Trichophyton rubrum in response to undecanoic acid. **Sci Rep,** v. 8, n. 1, p. 2520, 02 2018. ISSN 2045-2322. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29410524 >.

MONOD, M. et al. Trichophyton rubrum Azole Resistance Mediated by a New ABC Transporter, TruMDR3. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 63, n. 11, 11 2019. ISSN 1098-6596. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31501141 >.

MUSZKIETA, L. et al. Investigation of Aspergillus fumigatus biofilm formation by various “omics” approaches. **Frontiers in microbiology,** v. 4, p. 13, 2013. ISSN 1664-302X.

NENOFF, P. et al. Mycology - an update. Part 1: Dermatomycoses: causative agents, epidemiology and pathogenesis. **J Dtsch Dermatol Ges,** v. 12, n. 3, p. 188-209; quiz 210, 188-211; quiz 212, Mar 2014. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=24533779 >.

NEVES-DA-ROCHA, J. et al. Alternative Splicing in Heat Shock Protein Transcripts as a Mechanism of Cell Adaptation in Trichophyton rubrum. **Cells,** v. 8, n. 10, Oct 5 2019. ISSN 2073-4409 (Electronic)2073-4409 (Linking). Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=31590387 >.

PANAHI, B.; HEJAZI, M. A. Integrative analysis of gene expression and alternative splicing in microalgae grown under heterotrophic condition. **PloS one,** v. 15, n. 6, p. e0234710, 2020. ISSN 1932-6203.

PANDAY, M. et al. 2020 Terbinafine Preferred Antifungal with a Focus on Dermatophytes (A Review). **Acta Scientific Microbiology,** v. 3, n. 7, p. 65-72, 2020. ISSN 2581-3226.

PAO, S. S.; PAULSEN, I. T.; SAIER, M. H. Major facilitator superfamily. **Microbiol Mol Biol Rev,** v. 62, n. 1, p. 1-34, Mar 1998. ISSN 1092-2172. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9529885 >.

PERCIVAL, S. L. et al. Microbiology of the skin and the role of biofilms in infection. **International wound journal,** v. 9, n. 1, p. 14-32, 2012. ISSN 1742-4801.

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

PERSINOTI, G. F. et al. RNA-sequencing analysis of Trichophyton rubrum transcriptome in response to sublethal doses of acriflavine. **BMC Genomics,** v. 15 Suppl 7, p. S1, 2014. ISSN 1471-2164. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25573029 >.

PITANGUI, N. et al. Adhesion of Histoplasma capsulatum to pneumocytes and biofilm formation on an abiotic surface. **Biofouling,** v. 28, n. 7, p. 711-718, 2012. ISSN 0892-7014.

POHL, C. H.; KOCK, J. L. F.; THIBANE, V. S. Antifungal free fatty acids: A Review. **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances** v. 3, p. 61-71, 2011.

PRASAD, R.; RAWAL, M. K. Efflux pump proteins in antifungal resistance. **Front Pharmacol,** v. 5, p. 202, 2014. ISSN 1663-9812 (Print) 1663-9812 (Linking). Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=25221515 >.

PRASAD, R.; SHARMA, M.; RAWAL, M. K. Functionally relevant residues of Cdr1p: a multidrug ABC transporter of human pathogenic Candida albicans. **Journal of amino acids,** v. 2011, 2011.

RABIN, N. et al. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. **Future Med Chem,** v. 7, n. 4, p. 493-512, 2015. ISSN 1756-8927. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25875875 >.

ROBBINS, N.; CAPLAN, T.; COWEN, L. E. Molecular Evolution of Antifungal Drug Resistance. **Annu Rev Microbiol,** v. 71, p. 753-775, 09 2017. ISSN 1545-3251. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28886681 >.

ROCHA, E. M. et al. A Phe389Leu substitution in ergA confers terbinafine resistance in Aspergillus fumigatus. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 50, n. 7, p. 2533-6, Jul 2006. ISSN 0066-4804. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16801438 >.

ROMANO, J. D.; MICHAELIS, S. Topological and mutational analysis of Saccharomyces cerevisiae Ste14p, founding member of the isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase family. **Mol Biol Cell,** v. 12, n. 7, p. 1957-71, Jul 2001. ISSN 1059-1524. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11451995 >.

ROSSI, A. et al. Reassessing the Use of Undecanoic Acid as a Therapeutic Strategy for Treating Fungal Infections. **Mycopathologia**, Apr 2021. ISSN 1573-0832. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33835367 >.

SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; LASS-FLÖRL, C. Antifungal drug resistance among Candida species: mechanisms and clinical impact. **Mycoses,** v. 58, p. 2-13, 2015. ISSN 0933-7407.

SANTOS, H. L. et al. Terbinafine resistance conferred by multiple copies of the salicylate 1-monooxygenase gene in Trichophyton rubrum. **Med Mycol,** v. 56, n. 3, p. 378-381, Apr 2018. ISSN 1460-2709. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28582544 >.

SIEBER, P. et al. Comparative Study on Alternative Splicing in Human Fungal Pathogens Suggests Its Involvement During Host Invasion. **Front Microbiol,** v. 9, p. 2313, 2018. ISSN 1664-302X. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30333805 >.

SILVA, L. G. **Perfil transcricional de *ace2*, *pacC* e dos componentes da via RAM no dermatófito *Trichophyton rubrum* em resposta a condições de estresse e na interação com o hospedeiro.** 2014. Genética., Universidade de São Paulo., Ribeirão Preto.

SILVA-ROCHA, W. P.; DE AZEVEDO, M. F.; CHAVES, G. M. Epidemiology and fungal species distribution of superficial mycoses in Northeast Brazil. **J Mycol Med,** v. 27, n. 1, p. 57-64, Mar 2017. ISSN 1773-0449. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27663203 >.

SLAIN, D. et al. Intravenous itraconazole. **Annals of pharmacotherapy,** v. 35, n. 6, p. 720-729, 2001. ISSN 1060-0280.

SONG, J. C.; STEVENS, D. A. Caspofungin: Pharmacodynamics, pharmacokinetics, clinical uses and treatment outcomes. **Crit Rev Microbiol,** v. 42, n. 5, p. 813-46, Sep 2016. ISSN 1549-7828. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26369708 >.

SRIDHAR, P. S. et al. Ste2 receptor-mediated chemotropism of Fusarium graminearum contributes to its pathogenicity against wheat. **Sci Rep,** v. 10, n. 1, p. 10770, 07 2020. ISSN 2045-2322. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32612109 >.

TURRÀ, D. et al. Fungal pathogen uses sex pheromone receptor for chemotropic sensing of host plant signals. **Nature,** v. 527, n. 7579, p. 521-4, Nov 2015. ISSN 1476-4687. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26503056 >.

VANDEPUTTE, P.; FERRARI, S.; COSTE, A. T. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. **International journal of microbiology,** v. 2012, 2012. ISSN 1687-918X.

VERSELE, M.; LEMAIRE, K.; THEVELEIN, J. M. Sex and sugar in yeast: two distinct GPCR systems. **EMBO Rep,** v. 2, n. 7, p. 574-9, Jul 2001. ISSN 1469-221X. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11463740 >.

VIEIRA, F.; NASCIMENTO, T. Resistência a fármacos antifúngicos por Candida e abordagem terapêutica. **Revista Portuguesa De Farmacoterapia,** v. 9, p. 29-36, 2017. ISSN 1647-354X.

VÍGLAŠ, J.; OLEJNÍKOVÁ, P. An update on ABC transporters of filamentous fungi - from physiological substrates to xenobiotics. **Microbiol Res,** v. 246, p. 126684, Jan 2021. ISSN 1618-0623. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33529790 >.

WANG, Y. et al. Mechanism of alternative splicing and its regulation. **Biomed Rep,** v. 3, n. 2, p. 152-158, Mar 2015. ISSN 2049-9434. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25798239 >.

WASI, M. et al. ABC transporter genes show Upregulated expression in drug-resistant clinical isolates of Candida auris: a genome-wide characterization of ATP-binding cassette (ABC) transporter genes. **Frontiers in microbiology,** v. 10, p. 1445, 2019. ISSN 1664-302X.

WHITE, T. C. et al. Generating and testing molecular hypotheses in the dermatophytes. **Eukaryot Cell,** v. 7, n. 8, p. 1238-45, Aug 2008. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18539886 >.

WILL, C. L.; LÜHRMANN, R. Spliceosome structure and function. **Cold Spring Harb Perspect Biol,** v. 3, n. 7, Jul 2011. ISSN 1943-0264. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21441581 >.

YAN, N. Structural advances for the major facilitator superfamily (MFS) transporters. **Trends Biochem Sci,** v. 38, n. 3, p. 151-9, Mar 2013. ISSN 0968-0004. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23403214 >.

YEOH, L. M. et al. Alternative Splicing in Apicomplexan Parasites. **mBio,** v. 10, n. 1, 02 2019. ISSN 2150-7511. Available at: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30782661 >.