

**UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO - UNAERP**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**“Avaliação da atividade antifúngica de licochalcona e ácido cafeico contra  
*Trichophyton rubrum* e estudo do modo de ação”**

**Bruna Aline Michelotto Cantelli**

**Ribeirão Preto-SP**

**2016**

Bruna Aline Michelotto Cantelli

“Avaliação da atividade antifúngica de licochalcona e ácido cafeico contra  
*Trichophyton rubrum* e avaliação do modo de ação”

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto-UNAERP para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia aplicada à saúde.

**Orientador:** Prof<sup>ª</sup> Dra. Ana Lúcia Fachin Saltoratto

Ribeirão Preto-SP

2016

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

Cantelli, Bruna Aline Michelotto, 1988-  
C229a “Avaliação da atividade antifúngica de licochalcona e ácido  
cafeico contra *Trichophyton rubrum* e estudo do modo de ação” /  
Bruna Aline Michelotto Cantelli. - - Ribeirão Preto, 2016.  
42 f.: il. color.

Orientadora: Prof<sup>ra</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Lúcia Fachin Saltoratto.

Dissertação (mestrado) - Universidade de Ribeirão Preto,  
UNAERP, Biotecnologia. Ribeirão Preto, 2016.

1. *Trichophyton rubrum*. 2. Ácido cafeico. 3. Membrana celular.  
I. Título.

**Termo de autorização para publicação de monografias, dissertações e teses eletrônicas  
no sistema Pergamum da Biblioteca UNAERP**

Na qualidade de titular dos direitos de autor da publicação, autorizo a Biblioteca da UNAERP a disponibilizar através do site <http://pergamum.unaerp.br/biblioteca>, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o texto integral da obra abaixo citada, arquivo em formato digital PDF, para publicação total sem prazo determinado, conforme permissões assinaladas, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica, a partir de 21 de junho de 2017.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação**

2. Identificação da monografia, dissertação ou tese

**Título e subtítulo do trabalho:** "Avaliação da atividade antifúngica de licochalcona e ácido cafeico contra *Trichophyton rubrum* e estudo do modo de ação"

**Docente orientador:** Profª Dra. Ana Lúcia Fachin Saltoratto

**Nome do curso:** Biotecnologia

**Titulação:** Mestrado

**Data de apresentação/defesa:** 19 de maio de 2016

**Nota atribuída pela banca examinadora:** Aprovada

*ALF saltoratto*

Assinatura do Orientador / Coordenador do curso

3. Identificação do autor (aluno)

**Autor:** Bruna Aline Michelotto Cantelli

**RG:** 44.817.686-2

**E-mail:** brucantelli@hotmail.com

**CPF:** 381.102.998-30

**Telefone(s):** (16)993344114/ 39541172

*Bruna A. M. Cantelli*

Assinatura do autor (aluno)

Ribeirão Preto, 22 de junho de 2016

BRUNA ALINE MICHELOTTO CANTELLI

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE LICOCHALCONA E ÁCIDO  
CAFÉINICO CONTRA *T. RUBRUM* E ELUCIDAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Biotecnologia da Universidade de Ribeirão  
 Preto, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde

Data da defesa: 19 de maio de 2016

Resultado: Aprovada

BANCA EXAMINADORA



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



Profa. Dra. Tamires Aparecida Bitencourt  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP



Prof. Dr. Renê de Oliveira Beleboni  
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP

RIBEIRÃO PRETO  
2016

**Dedico a minha família pelo incentivo,  
paciência e amor recebido por todo esse período e  
pela compreensão nas fases mais difíceis.**

## **AGRADECIMENTOS:**

- Primeiramente a Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades.
- A Universidade de Ribeirão Preto, pela oportunidade de fazer esse mestrado.
- Aos meus professores por me proporcionar o conhecimento e principalmente a minha orientadora Professora Dr. Ana Lúcia Fachin Saltorato pelo apoio, dedicação, confiança e paciência.
- A minha família pelo amor, incentivo, apoio, paciência e acompanhamento de cada etapa deste trabalho.
- Meu sincero agradecimento a Dr. Tamires Aparecida Bitencourt que além de minha amiga, foi essencial para essa formação.
- Aos amigos de laboratório que fizeram parte da minha formação e que vão continuar presentes em minha vida, principalmente Yasmim Dantas Crivelenti, Thais Baltazar Mesquita e Vitor Caressato Pinhanelli que iniciaram comigo essa caminhada e sempre estiveram presentes em todos os passos.
- A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, meu muito obrigado.

## RESUMO

*Trichophyton rubrum* (*T. rubrum*) é o agente causador mais frequente de dermatomicoses superficiais em todo o mundo. Apesar da crescente incidência de infecções fúngicas, há um número reduzido de drogas no mercado e seus alvos são limitados em virtude das semelhanças compartilhadas entre células fúngicas e de mamíferos. A síntese do ergosterol é um alvo explorado pelos antifúngicos atuais, mas há registros de linhagens resistentes a essas drogas. Além disso, a via metabólica do ciclo do glioxilato vem despertando interesse, para ser explorado como alvo antifúngico, devido sua exclusividade em células fúngicas. Os produtos naturais de diferentes origens, representam uma nova fonte para a descoberta de antifúngicos mais eficazes e menos tóxicos. Desta forma, este trabalho avaliou o potencial antifúngico de compostos naturais com possível atuação sobre estas vias metabólicas, como a licochalcona, apigenina, ácido cafeico e ácido itacônico contra *T. rubrum*. Posteriormente, o modo de ação dos compostos que apresentaram potencial atividade antifúngica foi avaliado por meio de ensaios moleculares, celulares e bioquímicos. A susceptibilidade de *T. rubrum* aos compostos naturais antifúngicos foi realizada através do ensaio de determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Os resultados demonstraram que a licochalcona e o ácido cafeico foram os compostos mais ativos contra *T. rubrum* apresentando CIM de 11,52  $\mu\text{M}$  e 86,59  $\mu\text{M}$ , respectivamente. O ácido itacônico e apigenina não apresentaram atividade antifúngica (CIM = > 3943,19 e 1850,20  $\mu\text{M}$  respectivamente), enquanto que o ácido 3-nitropropiónico apresentou moderada atividade antifúngica com CIM de 2379,36  $\mu\text{M}$ . A licochalcona apresentou atividade fungistática com valor de concentração fungicida mínima (CFM) 23,04  $\mu\text{M}$  e o ácido cafeico apresentou atividade fungicida com CFM de 86,59  $\mu\text{M}$ . A fim de avaliar os danos causados pelos compostos na membrana celular foi realizado o ensaio de regeneração de protoplastos de *T. rubrum*, sendo que o ácido cafeico inibiu totalmente a regeneração e a licochalcona não causou nenhuma inibição de regeneração. Além disso, a quantificação do conteúdo de ergosterol mostrou que o ácido cafeico também se destacou, reduzindo 36,24%, enquanto o composto licochalcona reduziu somente 2,63%. Ademais, o ácido cafeico apresentou moderada citotoxicidade comparada ao MIC, com valor de  $\text{IC}_{50}=110,52 \mu\text{M}$  em células de queratinócitos humanos (HaCat). O co-cultivo de *T. rubrum* em células HaCat expostas à concentrações sub-inibitórias de ácido cafeico mostrou que o composto afeta o desenvolvimento das hifas, que se apresentaram escassas e fragmentadas, enquanto que pequenas alterações como o não desenvolvimento de forma contínua e a fragmentação das hifas, foram observadas para o composto licochalcona. Experimentos de PCR quantitativa mostraram a indução de genes envolvidos no ciclo do glioxilato, síntese do ergosterol e parede celular durante a interação de *T. rubrum* com células de queratinócitos humanos HaCat, sugerindo a relevância desses genes para a virulência de *T. rubrum*. Após o tratamento com as drogas ácido cafeico e licochalcona, estes mesmos genes foram reprimidos, demonstrando a interferência dessas drogas com esses alvos. Dessa forma, os resultados revelam que o ácido cafeico apresentou expressiva atividade antifúngica contra *T. rubrum*, e moderada citotoxicidade para células HaCat. Este composto parece atuar sobre a membrana celular, inibindo totalmente a regeneração de protoplastos, além de modular negativamente genes que codificam alvos potenciais envolvidos com sobrevivência e virulência de dermatófitos como a síntese de ergosterol, parede celular e ciclo do glioxilato.

Palavras-chave: *Trichophyton rubrum*, licochalcona, ácido cafeico, membrana celular, ciclo do glioxilato, co-cultivo.

## ABSTRACT

*Trichophyton rubrum* is the most common agent of superficial dermatomycoses in the worldwide. Despite the increasing incidence of fungal infections, there are a limited number of antifungal drugs available for clinical use, and their targets are limited because of similarities between fungal and mammalian cells. The synthesis of ergosterol is a target exploited by current antifungals, but there are studies that have shown resistant strains to these drugs. Furthermore, the metabolic pathway of the glyoxylate cycle is attractive, to be exploited as antifungal target, due to its exclusivity in fungal cells. Natural products of different origin can represent a new source for discovery of more effective and less toxic antifungals. The aim of study was evaluated the antifungal potential of natural compounds with possible action on these metabolic pathways, such as licochalcona, apigenin, caffeic acid and itaconic acid against *T. rubrum*. After, the action of the compounds that showed potential antifungal activity was evaluated by molecular, cellular and biochemical assays. Susceptibility of *T. rubrum* to the natural antifungal was determining by the evaluation of minimum inhibitory concentration (MIC). The results showed that licochalcone and caffeic acid were the most active compounds against *T. rubrum* showing MIC 11.52  $\mu\text{M}$  and 86.59  $\mu\text{M}$ , respectively. The itaconic acid and apigenin did not demonstrate any antifungal activity MIC = > 3943.19 and MIC=1850.20  $\mu\text{M}$  respectively, while the 3-nitropropionic acid showed moderate antifungal activity with MIC = 2379.36  $\mu\text{M}$ . The licochalcone exhibit fungistatic activity with minimum fungicidal concentration value (CFM) of 23.04  $\mu\text{M}$  and caffeic acid showed fungicidal activity with CFM = 86.59  $\mu\text{M}$ . In order to evaluate the damage caused by the compounds on the cell membrane was performed protoplast regeneration assay. The caffeic acid inhibited completely the regeneration, while the licochalcona caused no inhibition of regeneration. Furthermore, quantification of ergosterol showed that the caffeic acid reduced 36.24% of ergosterol content while the compound licochalcona reduced only 2.63%. Moreover, caffeic acid exhibit moderate cytotoxicity compared to the MIC, with  $\text{IC}_{50}$  = 110.52  $\mu\text{M}$  in human keratinocyte cell (HaCaT). *T. rubrum* co-cultured in HaCaT cells exposed to sub-inhibitory concentrations of caffeic acid showed that the compound affects the development of hyphae, while only small changes on the development and fragmentation of hyphae were observed for licochalcona compound. Quantitative PCR experiments showed the induction of genes involved in glyoxylate cycle, ergosterol synthesis and cell wall during interaction of *T. rubrum* cells with human keratinocytes HaCaT, suggesting the relevance of these genes to the virulence of *T. rubrum*. After treatment with the drug caffeic acid and licochalcona, these same genes were repressed, showing the interference of these drugs on these targets. These results revealed that the caffeic acid showed significant antifungal activity against *T. rubrum* and moderate cytotoxicity to HaCaT cells. This compound appears to act on the cell membrane, inhibiting completely the regeneration of protoplasts, and modulated negatively genes encoding potential targets involved with survival and virulence dermatophytes such as ergosterol synthesis, cell wall and the glyoxylate cycle.

Key-words: *Trichophyton rubrum*, licochalcone, caffeic acid, cell membrane, glyoxylate cycle, co-culture.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema da via de biossíntese do ergosterol.....	5
Figura 2: Mecanismos de múltipla resistência a drogas.....	10
Figura 3: Estruturas química dos compostos.....	15
Figura 4: Regeneração dos protoplastos.....	27
Figura 5: Co-cultivo das células HaCat com o fungo <i>T. rubrum</i> .....	30
Figura 6: Análise de modulação da expressão gênica durante o co-cultivo de conídios de <i>T. rubrum</i> em células HaCat.....	32
Figura 7: Análise de modulação da expressão gênica durante o co-cultivo de conídios germinados de <i>T. rubrum</i> em células HaCat na presença dos antifúngicos.....	34
Figura 8: Análise de modulação da expressão gênica durante o co-cultivo de conídios de <i>T. rubrum</i> em células HaCat na presença do antifúngico comercial terbinafina.....	36

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentração dos reagentes para tratamento com DNase .....	21
Tabela 2: Concentração dos reagentes para a síntese do cDNA .....	22
Tabela 3: Sequências dos “primers” para a PCR quantitativa.....	23
Tabela 4: As reações foram feitas da seguinte forma, para os iniciadores de 100-70 nM.....	24
Tabela 5: Concentração Inibitória Mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) em $\mu\text{g}/\text{mL}$ e $\mu\text{M}$ dos compostos antifúngicos avaliados contra a linhagem de <i>T. rubrum</i> .....	25

## LISTA DE ABREVIATURA

$\mu\text{M}$	Micro Molar
<i>A. nidulans</i>	Aspergillus nidulans
Botton ágar	Meio de cultivo
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. neoformans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
CAPE	Fenetil de éster do ácido cafeico
cDNA	DNA complementar
CFM	Concentração fungicida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
DHE	Composto Intermediário
DMSO	Dimetilsulfóxido
EUA	Estados Unidos da América
FAS	Enzima ácido graxo sintase
H	h
HaCat	Linhagem celular de queratinócitos humano
IC <sub>50</sub>	Concentração do antifúngico que mata 50% de células
ICL1	Enzima Isocitrato liase
KCl	Cloreto de potássio
M	Molar
<i>M. gypseum</i>	<i>Microsporum gypseum</i>
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de magnésio
Min	Minutos
MTT	Sal amarelo tetrazole
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
RPMI	Meio de cultura adequado para cultivo celular
SBF	Soro Bovino Fetal
SE	Esqualeno epoxidase
<i>T. rubrum</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>
Top ágar	Meio de cultivo
Tris-HCl	Tris-base (PM=121,14)

## SUMÁRIO

<b>I. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 <i>T. rubrum</i> .....	1
1.2 Processo de infecção provocado por dermatófitos .....	2
1.3 Queratinócitos .....	3
1.4. Mecanismo de ação de antifúngicos convencionais e procura por novos alvos específicos	3
1.4.1 Membrana Celular.....	4
1.4.1.1 Via Biossintética do Ergosterol.....	4
1.4.2 Parede celular .....	6
1.4.3. Ciclo do glioxilato.....	7
1.5. Busca por novos compostos com atividade antifúngica.....	8
1.6. Resistência aos antifúngicos atuais .....	9
1.7. Abordagens moleculares para avaliar a expressão de genes de <i>T. rubrum</i> em condições de cultivo in vitro que mimetizam as infecções na pele.....	11
<b>II. HIPÓTESE.....</b>	<b>122</b>
<b>III. OBJETIVOS .....</b>	<b>133</b>
3.1 Objetivo Geral.....	133
3.2 Objetivos específicos: .....	13
<b>IV. MATERIAIS E MÉTODOS: .....</b>	<b>144</b>
4.1 Produtos naturais utilizados .....	144
4.2. Linhagem de <i>T. rubrum</i> e condições de cultivo .....	15
4.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) .....	166
4.4. Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM).....	16
4.5. Testes de regeneração em protoplastos .....	16
4.6. Quantificação do conteúdo de ergosterol .....	17
4.7. Avaliação da citotoxicidade dos produtos naturais em cultura de queratinócitos pelo ensaio de viabilidade celular .....	18
4.8. Co-cultivo de <i>T. rubrum</i> em linhagem de queratinócitos humanos HaCat na presença ou ausência dos antifúngicos naturais .....	199
4.8.1. Preparação de Queratinócitos HaCat.....	199
4.8.2. Preparação de Suspensão de conídios de <i>T. rubrum</i> .....	19
4.8.3. Co-cultivo da linhagem HaCat e <i>T. rubrum</i> .....	19
4.9. Comprovação da infecção de <i>T. rubrum</i> em células HaCat por meio de coloração .....	20
4.10. Extração de RNA .....	20
4.11. Eletroforese desnaturante .....	21
4.12. Tratamento com DNase.....	21
4.13. Síntese de cDNA .....	22
4.14. Reação de PCR quantitativa.....	22
4.15. Desenho e eficiência dos inicializadores.....	22
4.16. Quantificação Relativa da expressão.....	244
4.17. Análise estatística .....	255
<b>V. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>25</b>
5.1. Ensaio de sensibilidade dos fungos .....	25
5.2. Ensaio de regeneração em protoplasto .....	26
5.3. Quantificação do conteúdo ergosterol.....	27

5.4. Ensaio de viabilidade celular (MTT) .....	28
5.5. Ensaio de Co-cultivo de <i>T. rubrum</i> na presença de compostos inibidores.....	29
5.6. Expressão de genes de <i>T. rubrum</i> envolvidos na relação fungo-hospedeiro em resposta ao efeito dos compostos naturais pela PCR quantitativa. ....	311
<b>VI. CONCLUSÃO.....</b>	<b>37</b>
<b>VII. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>38</b>

## I. INTRODUÇÃO

### 1.1 *T. rubrum*

Fungos dermatófitos são fungos queratinofílicos, que compreendem um conjunto de fungos que invadem tecidos queratinizados como cabelo, unha e pele, causando infecções conhecidas como dermatofitoses. São cerca de 40 espécies divididas em três gêneros *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton* (MOLINA, 2011).

As infecções causadas por dermatófitos são denominadas de *tineas*, seguida do seu local de ocorrência, por exemplo *tinea pedis*, *tinea unguium* e *tinea corporis*, para as infecções com ocorrência nos pés, nas unhas e no corpo, respectivamente (ACHTERMAN; WHITE, 2012). Apesar dessas infecções não serem potencialmente fatais ou incapacitantes são incômodas e recorrentes (PERES *et al.*, 2010), o fato da recorrência não está claro se é devido a uma nova aquisição ou reativação de uma infecção prévia (ACHTERMAN; WHITE, 2012). Há relatos sugerindo que a taxa hormonal entre homens e mulheres afetam a ocorrência das infecções (DA SILVA *et al.*, 2014).

As dermatofitoses afetam cerca de 30% da população mundial, somente nos EUA isto é traduzido em um impacto econômico no sistema de saúde público estimado em 500 milhões de dólares por ano para o tratamento dessas infecções (WHITE *et al.*, 2008). A prevalência de onicomicose nos EUA é estimada em cerca de 12% e aumenta em indivíduos com idade acima de 65 anos. (SCHER *et al.*, 2013).

A espécie antropofílica *T. rubrum* é clinicamente a mais observada em todos os casos de dermatofitoses no mundo. Embora as dermatofitoses mais comuns sejam as superficiais, esse microrganismo pode provocar infecções invasivas em pacientes que possuem o sistema imune debilitado, como ocorre para pacientes imunodeprimidos, causando infecções subcutâneas e profundas com quadros clínicos mais complexos como abscessos, granulomas e micetomas (DA SILVA *et al.*, 2014) (SANTIAGO *et al.*, 2014).

*T. rubrum* é o agente causador de mais de 69,5% de todas as infecções provocadas por dermatófitos no mundo (CHEN; FRIEDLANDER, 2001), inclusive no Brasil, com ocorrência de 33,2% só no estado de São Paulo (GODOY-MARTINEZ *et al.*, 2009). CHIACCHIO *et al.* (2013) mostrou maior prevalência de dermatomicoses em mulheres numa faixa etária de 60 anos em estudo realizado na cidade do Rio de Janeiro e em São José do Rio Preto. Outro dado importante, revelado por esse estudo, foi que a frequência de infecção foi maior em pacientes que apresentavam histórico familiar de dermatomicoses.

Em pacientes imunocomprometidos portadores de HIV e já diagnosticados com AIDS da cidade de São Paulo a ocorrência deste fungo é de 70,6% e 94,7% respectivamente (DA SILVA *et al.*, 2014). As infecções fúngicas sistêmicas e superficiais são a causa de grande morbidade-mortalidade em pacientes imunodeprimidos, pois estão mais susceptíveis a adquirir infecções. As dermatofitoses são consideradas um sério problema para a saúde das crianças dos países do Terceiro Mundo em virtude das precárias condições de saneamento (CAMBUIM *et al.*, 2011; MARQUES *et al.*, 2000).

Apesar do alto índice das infecções causadas pelo *T. rubrum*, os fatores envolvidos com a sua patogenicidade não são totalmente conhecidos (HUMAN *et al.*, 2016).

## **1.2 Processo de infecção provocado por dermatófitos**

O processo de infecção de dermatófitos envolve a sua adesão celular e ativação de atividade queratinolítica, considerando que durante a infecção, os dermatófitos secretam uma bateria de endo- e exo-proteases que degradam as estruturas queratinizadas da pele para usá-las como nutrientes. O pH da pele é ácido, dessa forma a secreção de proteases com atuação ótima em pH ácido são primeiramente ativadas, em consequência há a ativação das keratinases com atuação ótima em pH alcalino, de forma que ambas são consideradas fatores importantes para a virulência de dermatófitos, e a sua regulação é determinante para a infecção. Por conseguinte, a capacidade de *T. rubrum* para infectar depende em grande medida da sua capacidade para alterar o seu transcriptoma em resposta as defesas do hospedeiro natural (PERES *et al.*, 2010). Para simular a infecção autores tem reportado a utilização de meio de cultura adicionado de substratos proteicos, como elastina e queratina (BITENCOURT *et al.*, 2016), soja (ZAUGG, C. *et al.*, 2009), cultura de queratinócitos (KOMOTO *et al.*, 2015) e pele humana ( PERES *et al.*, 2010).

Sabendo disto, o modelo de infecção utilizando os queratinócitos foi o escolhido para a realização deste trabalho, pois é o modelo muito aceitável pela literatura científica, e reproduz a infecção do fungo em célula de uma forma mais próxima da real e também já foi padronizado pelo nosso grupo de pesquisa (Universidade de Ribeirão Preto, unidade de biotecnologia).

### 1.3 Queratinócitos

As camadas que constituem a pele são: hipoderme, sendo a camada mais profunda, onde é encontrado o tecido adiposo; a derme ou cório é a camada intermediária onde se localiza estruturas vasculares, nervosas e órgãos anexos como: glândulas sebáceas, sudoríparas e folículo pilós; e como camada mais superficial a epiderme, que é formada por um epitélio estratificado, possuindo camadas celulares e majoritariamente constituída por células de queratinócitos que vão se diferenciando para se tornarem anucleadas e produzem queratina, a principal proteína encontrada na epiderme (SAMPAIO; RIVITTI, 2001; REHDER *et al.*, 2004 ;CURSONS *et al.*, 2015). Além dos queratinócitos, outras células são encontradas na epiderme, como os melanócitos, que se apresentam na camada basal entre os queratinócitos e as células de Langerhans, as quais apresentam papel de defesa celular. (SAMPAIO; RIVITTI, 2001). Por suas características, a epiderme desempenha um importante papel na proteção contra microrganismos presentes no ambiente.

Durante uma infecção superficial provocada por dermatófitos, a pele se torna a primeira barreira de defesa do organismo, podendo responder a estímulos como a proliferação de células locais e produção de citocinas, que são capazes de modular ações inflamatórias, estimulando a resposta imune (GRONE, 2002).

A linhagem celular HaCat é uma linhagem de queratinócitos humanos não-tumoral e imortalizada, que está sendo muito utilizada para ensaios de avaliação de citotoxicidade e simulação de infecção fúngica, por ser considerada um modelo simples (MAURO *et al.*, 2015, KOMOTO *et al.*, 2015).

### 1.4. Mecanismo de ação de antifúngicos convencionais e procura por novos alvos específicos

O tratamento clínico da infecção fúngica é demorado, caro e possui diversos desafios, tais como o surgimento de linhagens resistentes a drogas antifúngicas e a presença de um número limitado de alvos celulares fúngicos (MARTINEZ *et al.*, 2012). Associado a um número reduzido de drogas antifúngicas disponíveis atualmente no mercado (STURTEVANT, 2002), as quais são associados efeitos adversos em humanos. A terapia antifúngica visa explorar as diferenças estruturais entre células de fungos e mamíferos (DEBONO; GORDEE, 1994), entretanto, a similaridade dos dois tipos celulares limita o número de alvos (ZHAO *et al.*, 1997).

Os antifúngicos convencionais, tais como a anfotericina B e compostos de azóis são usados no tratamento de infecções fúngicas invasivas e continuam sendo utilizados em diversos casos clínicos. No entanto, a eficiência desses compostos fica cada vez mais limitada devido ao surgimento do fenótipo de resistência em linhagens fúngicas, além de casos reportados para efeitos adversos e interações cruzadas com outros fármacos. A consequência disto é a necessidade do desenvolvimento de novos antifúngicos que sejam mais seguros e eficazes (SHRESTHA *et al.*, 2014).

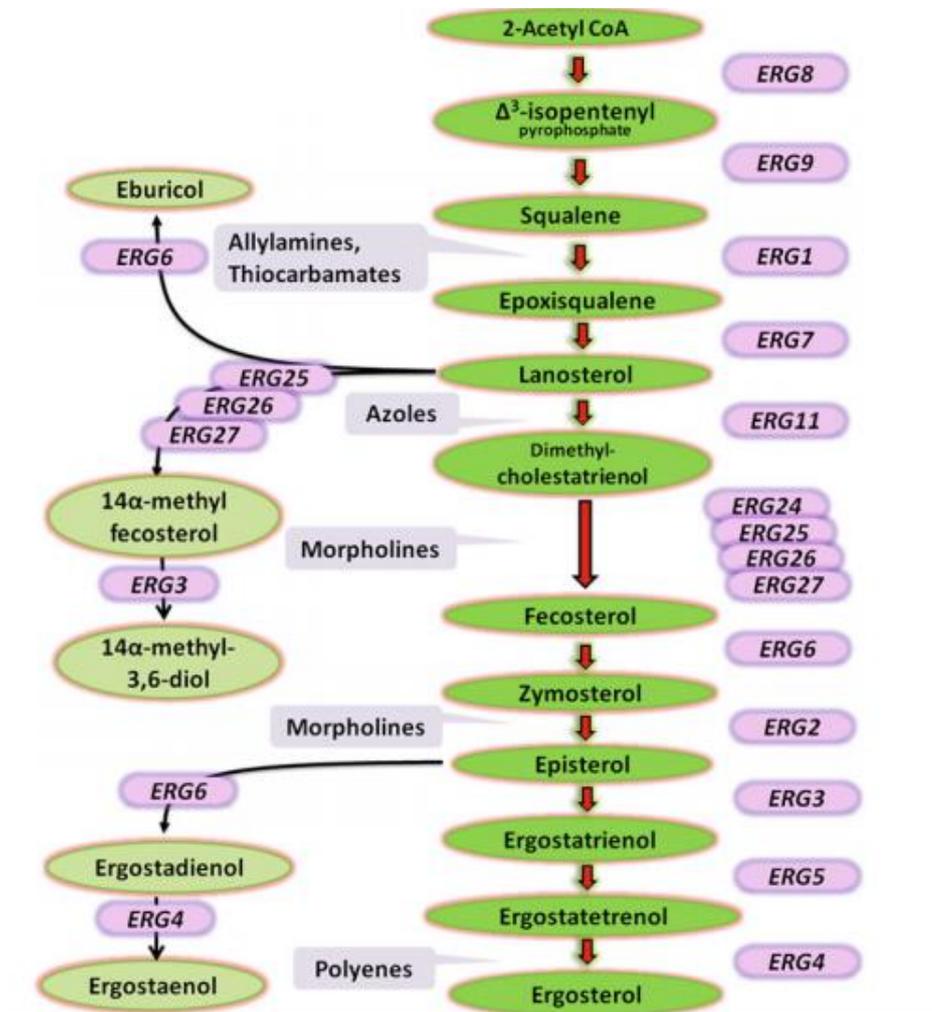
A pesquisa de novas drogas antifúngicas deixou de ser empírica e passou por uma fase rigorosamente científica, na medida em que se conheceu progressivamente mais a biologia celular do agente parasitário (ZAITZ, 1992). Através destes conhecimentos em biologia celular foi possível conhecer melhor o mecanismo de ação dos diferentes antifúngicos bem como os pontos vulneráveis específicos do fungo. As drogas atualmente conhecidas atuam em 3 principais alvos na célula fúngica: núcleo, membrana celular ou na parede celular. No núcleo os antifúngicos podem agir nos microtúbulos ou nos ácidos nucleicos em sua fase de síntese, na membrana celular atuam no ergosterol e nas enzimas de sua síntese (OSBORNE *et al.*, 2005), e na parede celular atuam principalmente na enzima 1,3- $\beta$  glucana sintase (PRASAD; SHAH; RAWAL, 2016).

#### **1.4.1 Membrana Celular**

##### **1.4.1.1 Via Biossintética do Ergosterol**

O ergosterol é um componente essencial das membranas das células dos fungos, e alterações no seu conteúdo podem causar anormalidades na permeabilidade da membrana, vazamento de componentes celulares e conseqüentemente, a morte celular (PARKS *et al.*, 1995). Além disso, este esterol é um dos principais componentes das vesículas secretoras e tem um papel importante na respiração mitocondrial e fosforilação oxidativa (SILVA NETO *et al.*, 2014). A via biossintética do ergosterol em fungos patogênicos é um alvo antimicrobiano atrativo porque ela é específica para o patógeno, já que o principal esterol produzido em humanos é o colesterol.

Os derivados de azóis atuam na biossíntese do ergosterol sendo os principais compostos utilizados no tratamento de infecções fúngicas. Os azóis atuam através da inibição da lanosterol 14  $\alpha$ -demetilase codificada pelo gene ERG11, conforme representado na figura 1.



**Figura 1:** Esquema da via de biossíntese do ergosterol, mostrando ponto específico de ação de antifúngico. Fonte: PRASAD; SHAH; RAWAL, 2016.

Outra classe de agente antifúngico que atua na biossíntese do ergosterol são as alilaminas, representada por terbinafina. Este composto age na enzima squaleno epoxidase (SE) codificada pelo gene ERG1 (figura 1). Esta enzima já foi caracterizada molecularmente em vários organismos, inclusive no dermatófito *T. rubrum* (FAVRE; RYDER, 1996). Antifúngicos pertencentes ao grupo das alilaminas são considerados antifúngicos de nova geração com amplo espectro de ação sobre os fungos patogênicos humanos. A terbinafina foi descoberta em 1983, e apresenta-se como agente promissor por possuir baixa afinidade sobre as enzimas humanas, destacando-se diante de outros compostos antifúngicos como o triazol, imidazol e griseofulvina (DA SILVA BARROS; DE ASSIS SANTOS; HAMDAN, 2007). Ressalta-se sua pronunciada atividade antifúngica contra os gêneros dos fungos dermatófitos

*Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*, seguido pelo *Dematiaceae* e algumas leveduras (NEWLAND; ABDEL-RAHMAN, 2009). Apesar da boa atividade antifúngica da terbinafina, alguns trabalhos já demonstram casos de resistência a essa droga. No dermatófito *T. rubrum* a expressão do gene que codifica o transportador do tipo ABC *TruMDR2* foi associado a diferenças de susceptibilidade aos compostos quimicamente não relacionados: terbinafina, 4NQO e brometo de etidio (FACHIN *et al.*, 2006).

Outro constituinte na membrana plasmática são os ácidos graxos, evidências recentes sugerem que a enzima ácido graxo sintase (FAS) apresenta um grande potencial como alvo antifúngico (ZHAO *et al.*, 1996). A FAS é uma enzima anabólica que participa dos processos de síntese endógena de ácidos graxos de cadeia longa através de precursores menores como o acetil-CoA e malonil-CoA. A enzima FAS das células fúngicas tem a forma molecular parecida com um grande barril unido a duas câmaras de acoplamento, em contraste, a FAS de mamífero possui uma forma molecular em forma de X (MAIER *et al.*, 2010). Devido às diferenças básicas entre as moléculas da enzima FAS de mamíferos e fungos as ácido graxo sintases fúngicas são consideradas alvos de droga promissores e a procura de compostos que atuem neste alvo podem apresentar um grande valor terapêutico (BROEDEL *et al.*, 1996). No trabalho realizado por BITENCOURT *et al.* (2013) foi verificada a inibição de ácido graxo sintase e do conteúdo de ergosterol por quercetina e *trans*-chalcona, além da expressiva atividade antifúngica contra o dermatófito *T. rubrum*, concomitantemente este trabalho mostrou a modulação de genes envolvidos na síntese de ácidos graxos e na biossíntese de ergosterol.

#### **1.4.2 Parede celular**

A parede celular realiza funções essenciais para o desenvolvimento dos fungos: confere proteção física contra outros microrganismos ou contra os fagócitos do hospedeiro, protegendo o fungo e interagindo diretamente com o sistema imune, mantém o equilíbrio osmótico da célula, regula a forma da célula e também media a comunicação entre as células fúngicas (BOWMAN e FREE, 2006).

As enzimas que sintetizam a parede celular estão ancoradas na membrana plasmática, sua remodelagem é dinâmica e contínua durante a sua biossíntese (BARRETO-BERGTER *et al.*, 2014). A parede celular é elástica e altamente regulada, sendo essencial para o

desenvolvimento das células fúngicas, e apresentando-se como alvo específico para o desenvolvimento de drogas antifúngicas, desde que é ausente em mamíferos.

A parede celular dos fungos consiste de uma camada externa de manoproteínas e uma camada interna composta por  $\beta$ -1,3-glucana/quitina, com algumas manoproteínas entrelaçadas. O  $\beta$ -1,3-glucana é responsável pela integridade estrutural da parede celular do fungo, enquanto que ligações entre o  $\beta$ -1,3-glucana e quitina oferecem rigidez adicional à estrutura. Desta forma, as manoproteínas e o  $\beta$ -1,3-glucana e a quitina da parede celular são consideradas como alvo para fármacos com novos mecanismos de ação (HECTOR, 1993).

### 1.4.3. Ciclo do glioxilato

O ciclo do glioxilato permite que alguns microrganismos sintetizem a glicose a partir de lipídios e outras fontes alternativas de carbono. Por esse motivo, o ciclo do glioxilato contribui com a flexibilidade metabólica que permite as células microbianas sobreviverem em nichos limitantes de nutrientes, como ocorre durante a infecção, fato que já foi relatado para *C. albicans* (FLECK *et al.*, 2011; CHEAH *et al.*, 2014)

O ciclo do glioxilato apresenta 3 enzimas exclusivas: isocitrato liase, malato sintase, malato desidrogenase, que são essências para a virulência de *C. albicans* (LORENZ; FINK, 2001). Além de *C. albicans*, a função dessa via metabólica para a patogenicidade tem sido desvendada em outros patógenos humanos como o *Mycobacterium tuberculosis* (MCKINNEY, *et al.*, 2000) e o fitopatógeno *Leptosphaeria maculans* (IDNURM; HOWLETT, 2002). Em contraste, o papel do ciclo do glioxilato na patogênese de *C. neoformans* em casos de *criptococcosis* não foi evidenciada (RUDE *et al.*, 2002), igualmente como não se comprovou esse envolvimento em aspergilose invasiva provocada pelo fungo *Aspergillus fumigatus*. Esses dados sugerem que o ciclo do glioxilato não seja um pré-requisito para virulência de forma geral, no entanto, que sua ativação pode favorecer a patogenicidade de microrganismos.

Adicionalmente, a análise inicial dos dados de microarray de um projeto de doutorado do nosso grupo de pesquisa (Universidade de Ribeirão Preto, unidade de biotecnologia), (Processo Fapesp 2012/03845-9) mostraram que a enzima isocitrato liase do ciclo do glioxilato de *T. rubrum* foi potencialmente modulada em meio de cultura com queratina.

### 1.5. Busca por novos compostos com atividade antifúngica

As infecções fúngicas têm crescido consideravelmente devido a um aumento na expectativa de vida de pacientes com o sistema imune debilitado. Além disso, a incidência de linhagens fúngicas multi-resistentes tem emergido. Apesar da constante introdução de novas drogas sintéticas no mercado, os produtos naturais de diferentes origens, representam uma fonte alternativa acessível, econômica e aplicável para várias patologias, principalmente em países em desenvolvimento. Dessa forma, paralelamente ao desenvolvimento de drogas sintéticas, atenção substancial tem sido focada em produtos naturais com atividade antifúngica, que tem estimulado a procura por novos agentes mais potentes e eficazes (NEGRI *et al.*, 2014).

O própolis é um produto natural muito utilizado popularmente em terapias alternativas. Ele é produzida por abelhas Europeias e Americanas a partir de gemas e exsudados de árvores e plantas e é conhecido por conter uma variedade de compostos químicos tais como flavonóides, ácidos fenólicos, e seus ésteres, terpenoides, esteroides e aminoácidos (BURDOCK *et al.*, 1998). O fenetil éster do ácido cafeico (CAPE) é o principal componente medicinal do própolis e possui um grande número de atividades biológicas importantes como antibacteriana, antiviral, antioxidante, anti-inflamatória e propriedades anticâncer, (SON; LEWIS, 2002; YANG *et al.*, 2005).

CHEAH; LIM; SANDAI, 2014 observaram a atividade antifúngica do ácido cafeico (CAPE) contra *C. albicans* em condições limitadas de glicose. Foi observado que esse composto atua no ciclo do glioxilato através da inibição da atividade da enzima isocitrato liase ICL1, esta enzima é chave do ciclo do glioxilato e tem se tornado um alvo antifúngico atrativo já descrito para *C. albicans*.

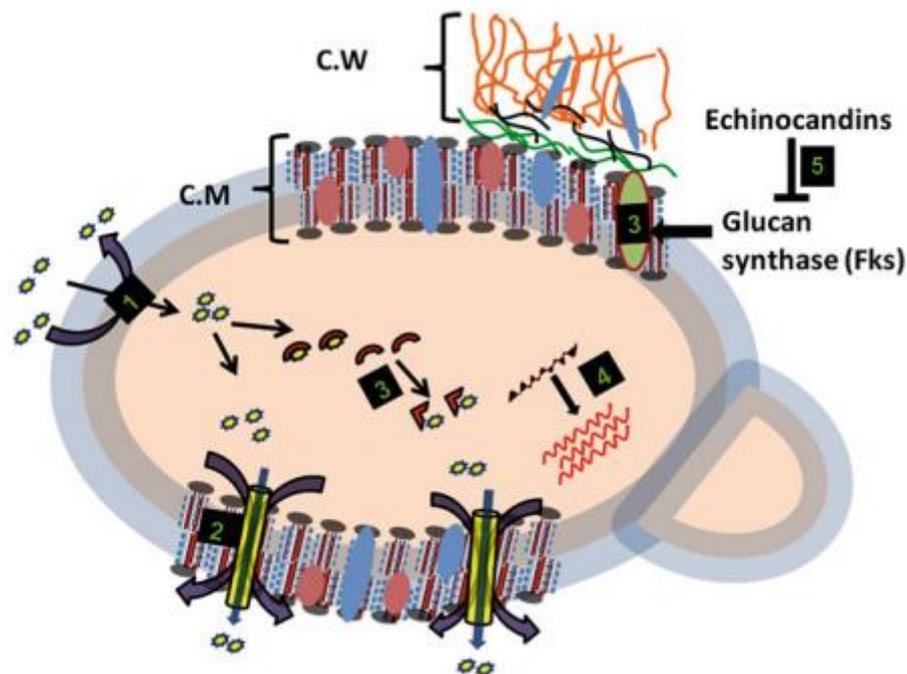
As plantas medicinais possuem uma habilidade ilimitada para sintetizar metabólitos secundários. Os flavonóides são substâncias fitoquímicas que dão cor as flores e folhas e atuam como mecanismos de defesa da planta contra a predação por microrganismos, insetos e herbívoros (ALMEIDA, 1993). Os flavonóides apresentam uma ação pronunciada na inibição do desenvolvimento de processos neoplásicos. Estudos comprovaram a habilidade dos flavonóides oriundos de extratos de *Scutellaria baicalensis* em deter o ciclo celular de linhagens tumorais resistentes a várias drogas quimioterápicas (SCHECK *et al.*, 2006). Os efeitos anticancerígenos de certos tipos de flavonóides foram caracterizados em várias linhagens de células neoplásicas oriundas de tecidos mamários, hepáticos, pancreático, estomacal e epitelial (SILBERBERG *et al.*, 2006).

As chalconas são precursoras na via biossintética dos flavonóides, amplamente distribuídas nas plantas, que apresentam atividade citotóxica, anticâncer, fungicida, antioxidante, anti-hiperglicemiante, bactericida, anti-inflamatória, antimalárica e antiviral. A versatilidade dessas bioatividades é frequentemente atribuída à cetona insaturada que une os anéis A e B, porém os ligantes destes também influenciam imensamente (SAHU *et al.*, 2012). Dados do nosso grupo de pesquisa também avaliaram a atividade antifúngica de flavonóides inibidores da ácido graxo sintase descritos na literatura como a quercetina, *trans*-chalcona, ácido elágico, luteolina, galangina e genisteína (BITENCOURT *et al.*, 2013). Os flavonóides quercetina e *trans*-chalcona foram mais efetivos, com CIM de 125 e 7,5 µg/mL para a linhagem MYA3108 de *T. rubrum*. As duas substâncias naturais reduziram o nível de ergosterol e causaram danos de membrana, fato que sugere a interferência desses compostos na síntese de ácido graxo e ergosterol. Além disso, *trans*-chalcona e quercetina inibiram a atividade enzimática da FAS com valores de IC<sub>50</sub> de 68,23 e 17,1 µg/mL, respectivamente (BITENCOURT *et al.*, 2013).

### **1.6. Resistência aos antifúngicos atuais**

As células fúngicas possuem várias estratégias celulares para superar os efeitos das drogas antifúngicas. Um fenômeno conhecido como múltipla resistência a drogas (MDR) tem sido descrito em vários fungos de interesse médico. Existem diferentes mecanismos de resistência a múltiplas drogas utilizados pelas células fúngicas. Os mecanismos de resistência fúngica, geralmente observados à fármacos, particularmente azóis, polienos e equinocandinas são mostrados na figura 2, onde cada número representa uma alteração na célula fúngica que acarreta resistência aos fármacos.

**Figura 2:** Mecanismos de múltipla resitência a drogas. Número 1: demonstra as mudanças na composição da membrana celular que afeta a importação normal de droga. número 2: demonstra a super-expressão de proteínas de efluxo de drogas que conduz a extrusão rápida do fármaco. Número 3: uma alteração do alvo da droga (genes que codificam enzimas da via de biossíntese de ergosterol ou síntese de glucana). Número 4: a superexpressão de genes que sintetizam as proteínas que são alvo de drogas. Número 5: bloqueio da atividade da síntese do glucana, enzima importante para a síntese de parede celular. Fonte: PRASAD; SHAH; RAWAL, 2016.



O fluconazol é um dos fármacos antifúngicos mais vendidos na prática clínica (ANDERSEN *et al.*, 2016), porém foi observado ao longo do tempo um crescente desenvolvimento de resistência associada ao uso desse azol. Somente nos últimos anos foi verificado aumento de 14% dos casos de resistências reportados em *Candidas glabrata*.

As enzimas são um dos principais alvos de drogas antifúngicas, como é o caso da terbinafina que atua sobre a esqueleno epoxidase, enzima-chave da via de biossíntese de ergosterol que catalisa a epoxidação estereo-específica de esqualeno para 2,3-oxidosqualeno em fungos, o que ocasiona no esgotamento de ergosterol e acúmulo de esqualeno. (OSBORNE *et al.*, 2005).

Os fungos utilizam vários mecanismos para resistir aos efeitos da terbinafina, tais como mutação no gene da esqualeno epoxidase, através da substituição de aminoácidos envolvidos na ligação de terbinafina a esqualeno epoxidase (OSBORNE *et al.*, 2005). Essa forma de resistência à terbinafina foi descrita para os fungos *A. nidulans*, *Aspergillus fumigatus* e *T. rubrum* (MUKHERJEE *et al.*, 2002). Outro mecanismo de resistência à terbinafina descrito é o aumento do efluxo de droga e superexpressão de salicilato monooxigenase (degradação da droga) (ROSSI, 2008).

### **1.7. Abordagens moleculares para avaliar a expressão de genes de *T. rubrum* em condições de cultivo *in vitro* que mimetizam as infecções na pele**

As abordagens genéticas têm permitido novas perspectivas em quase todas as áreas de pesquisa para estudo da patogenicidade em microrganismos. Entretanto, tais metodologias têm sido raramente utilizadas em dermatófitos, em contraste com outros organismos patogênicos de interesse clínico como *C. albicans*. Consequentemente, pequeno é o conhecimento da patogenicidade dos dermatófitos a nível molecular (GRUMBT; MONOD; STAIB, 2011). O uso apropriado de modelos de infecção *in vitro* é necessário para entender os mecanismos patofisiológicos das dermatofitoses. Dessa forma, no intuito de se conhecer a complexa interação do fungo com o hospedeiro são utilizadas abordagens para verificação de genes diferencialmente expressos em condições que mimetizam a infecção da pele, como o co-cultivo de conídios em cultura de queratinócitos (BAEZA *et al.*, 2007). Outro modelo de infecção muito utilizado é o meio de cultura contendo queratina e soja (ZAUGG, C. *et al.*, 2009), ou queratina e elastina para promover a atividade proteolítica. Essas fontes proteicas proporcionam um ambiente similar a infecção, pois são estes os principais componentes encontrados na pele, e são substratos utilizados por *T. rubrum* durante a infecção (BURMESTER *et al.*, 2011). Ainda nesse contexto, KOMOTO *et al.*, (2015) mimetizou a infecção de *T. rubrum* em linhagem de queratinócito humano HaCat e avaliou a modulação de genes importantes para o metabolismo e patogenicidade de dermatófitos, inclusive durante a exposição a agentes antifúngicos, como a *trans*-chalcona e *s*-solanina. Esse foi o primeiro estudo que descreveu a modulação da expressão gênica em *T. rubrum* durante a interação com queratinócitos expostos a compostos antifúngicos.

## II. HIPÓTESE

O ácido cafeico e a licochalcona apresentam atividade antifúngica contra *T. rubrum* atuando em alvos específicos das células fúngicas, como o ergosterol e o ciclo do glioxilato, que são importantes para a sobrevivência e virulência de fungos.

### III. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial antifúngico de alguns produtos naturais contra *T. rubrum* com a perspectiva de compreender os modos de ação dos compostos que apresentarem potencial atividade biológica, utilizando ensaios moleculares, celulares e bioquímicos.

#### 3.2 Objetivos específicos:

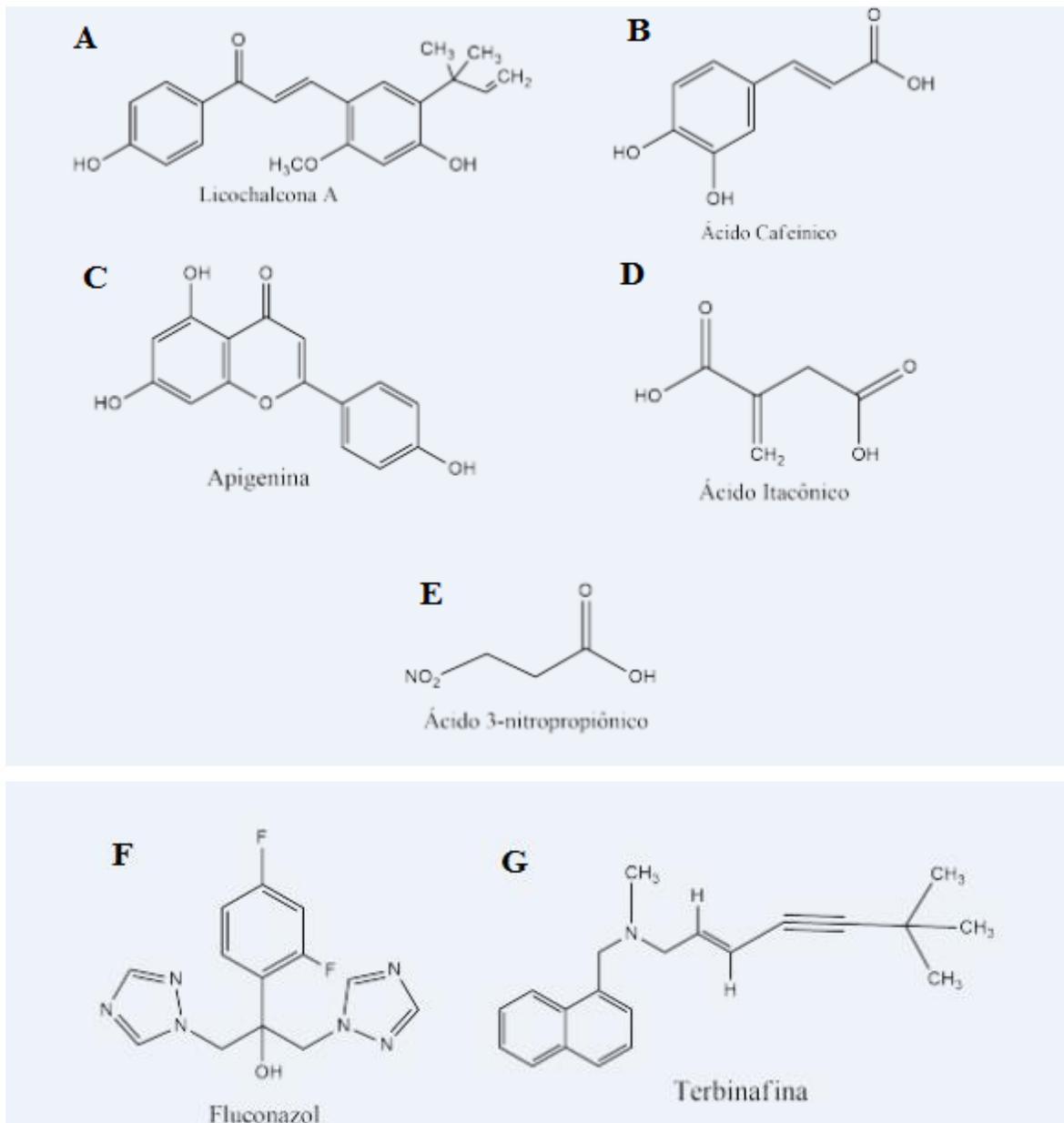
- a. Avaliar a atividade antifúngica de produtos naturais contra uma linhagem de *T. rubrum*. Os compostos que apresentarem atividade antifúngica serão estudados para elucidar os modos de ação.
- b. Avaliar as taxas de regeneração de protoplastos de *T. rubrum*, verificando o efeito dos compostos na membrana plasmática e na parede celular.
- c. Quantificar o conteúdo de ergosterol na membrana plasmática dos dermatófitos submetidos ao tratamento com os produtos naturais.
- d. Avaliar a citotoxicidade dos compostos naturais em linhagem de queratinócitos humanos.
- e. Realizar co-cultivo e observar a morfologia de *T. rubrum* em linhagem de queratinócitos humanos HaCat na presença ou ausência dos antifúngicos selecionados.
- f. Avaliar a expressão de genes de *T. rubrum* envolvidos na relação fungo-hospedeiro em resposta ao efeito dos compostos naturais por PCR quantitativa.

## **IV. MATERIAIS E MÉTODOS:**

### **4.1 Produtos naturais utilizados**

Foram triados os produtos naturais licochalcona (figura 3A), ácido cafeico (figura 3B), apigenina (figura 3C) e ácido itacônico (figura 3D), que foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Os controles positivos utilizados foram o ácido 3-nitropropiónico (figura 3E), (inidor do ciclo do glioxilato), e os antifúngicos comerciais terbinafina (figura 3F) e fluconazol (figura 3G), (que atuam na síntese do ergosterol) foram usados como controles positivos para a atividade antifúngica, regeneração de protoplasto e síntese de ergosterol. Os compostos naturais e os controles foram diluídos em DMSO, de modo que a concentração final máxima do solvente não excedesse 0,5 %.

**Figura 3:** Estruturas químicas. Sendo A licochalcona, B ácido cafeico, C apigenina, D ácido itacônico, E ácido 3-nitropropiónico, F fluconazol e G terbinafina.



#### 4.2. Linhagem de *T. rubrum* e condições de cultivo

A linhagem utilizada nesse estudo foi sequenciada por Broad Institute CBS 118892. O cultivo dessa linhagem foi em meio de cultura Sabouraud por 7 dias a 28° C, segundo os métodos previamente descritos por FACHIN *et al.*, (1996).

### **4.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

O ensaio foi realizado de acordo com o método de referência de sensibilidade à antifúngicos M-38-A CLSI, (2002), que consiste em: (coletar micélio proveniente de placas de fungo crescidas por 7 dias, homogeneizar em solução salina 0,9% e agitar para a liberar os conídios, filtrar em lã de vidro estéril e ajustar a transmitância entre 70 à 75% em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 530nm). A seguir 1 mL da suspensão de conídios foi diluído em 50 mL de meio RPMI. Em seguida foi feito a microdiluição dos compostos em placas de 96 poços. As concentrações utilizadas abrangeram uma faixa de 500 a 19µg/mL. A seguir foi adicionado 100 µl de suspensão de conídios previamente preparada em todos os poços, exceto nos poços em que foi testado o controle de esterilidade do meio de cultura. O controle positivo consistiu no meio de cultura sem droga. A placa foi incubada a 28°C por 7 dias para observar a menor concentração da droga (CIM) que inibiu 100% do crescimento macroscópico do fungo.

### **4.4. Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)**

Para determinar se os compostos naturais apresentam atividade fungicida ou fungistática, foram preparadas placas de Petri contendo meio de cultura Sabouraud sólido e foram inoculados 100 µL da concentração inibitória, obtida pelo teste de determinação da CIM, também foram inoculadas duas concentrações acima da concentração inibitória. As alíquotas foram espalhadas pela placa com o auxílio de uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas em estufas a 28°C por 7 dias. Após a incubação, as placas foram analisadas para observação do crescimento de colônias do fungo. A CFM foi considerada como a menor concentração dos compostos ensaiados que não permitiu o desenvolvimento do fungo na superfície do meio de cultivo após incubação.

### **4.5. Ensaio de regeneração em protoplastos**

Para avaliar se os compostos exercem efeito antifúngico por meio de dano na membrana plasmática das células, foi avaliado o efeito dos compostos na regeneração da parede celular dos protoplastos de *T. rubrum* como descrito por BITENCOURT *et al.*, 2013. O método consiste primeiramente em coletar micélio proveniente de 2 placas de *T. rubrum* crescidas por 6 dias e inocular em 100 mL de meio Sabouraud líquido em um erlenmayer de

300 mL e incubar com agitação de 200 rpm por um período de 12 a 16 h à 28°C. Após esse tempo o micélio foi filtrado em funil de buchner e adicionado 30 mL de solução lítica (20 mg/mL de enzimas líticas de *Trichoderma harzianum* adquiridas de Sigma-Aldrich; 0.7 M KCl and 1 M MgSO<sub>4</sub>, pH 6,8), posteriormente, procedeu-se a incubação a 28°C a 120rpm por 4 a 5 h. A partir desse tempo foram feitas lâminas para monitorar o aparecimento dos protoplastos. Após verificação dos protoplastos, estes foram filtrados em lã de vidro estéreis e centrifugados por 10 min à 1556 g. O sobrenadante foi descartado e os protoplastos foram ressuspendidos em 1 mL de Tris-HCl (50mM Tris, 0,8 M NaCl, 10mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,5), a seguir os protoplastos foram contados no hematómetro e a concentração final foi ajustada para 10<sup>6</sup> protoplastos/mL. O meio de cultura para a regeneração dos protoplastos foi o Meio Mínimo adicionado de Sacarose (0,5M) contendo 1,5 % de ágar bacteriológico (“Bottom Ágar”), no qual foram adicionadas as drogas em uma concentração de ½ do CIM. Foram adicionados 100µl da solução de protoplastos em 4 mL de Meio Mínimo adicionado de Sacarose (1M) contendo 0,8% de ágar bacteriológico (“top Ágar”), o qual foi previamente aquecido a 45°C. Essa mistura ( protoplastos em meio “top Ágar”) foi vertida sobre o meio “bottom ágar”. Foram preparadas placas controle, onde não foram adicionadas drogas, para ser visualizado o crescimento dos fungos e com isso comparar os resultados. As placas foram incubadas por 7 dias a 28°C para observação dos protoplastos.

#### **4.6. Quantificação do conteúdo de ergosterol**

O nível de ergosterol foi quantificado como descrito por BITENCOURT *et al.*, 2013. Para medir o nível de ergosterol, o micélio proveniente de ½ placa da linhagem CBS de *T. rubrum* foi coletado e inoculado em 50 mL de meio de cultura Sabouraud líquido e submetido a agitação de 150 rpm por 24 h a 28°C. Após esse período, o micélio foi filtrado em funil de Buchner e inoculado em 20 mL de meio Sabouraud líquido contendo o valor do CIM de cada composto e foi incubado com agitação de 200 rpm por 48 h a 28°C. A seguir, o micélio foi filtrado novamente em funil de Buchner e transferido para 30 mL de água e centrifugado por 10 min por 1730 g, somente para lavagem. Posteriormente o sobrenadante foi descartado e o fungo foi ressuspenso em 3 mL de solução de hidróxido de potássio (KOH 25% preparado em solução alcoólica 60%) e foi mantido por 1 h no banho-Maria a 85°C para a saponificação de ácidos graxos. A solução foi resfriada por 20 min e adicionou-se 3 mL de n-heptano e 1 mL de água e agitou-se vigorosamente por 3 min para a separação de fases. Após a divisão das fases, a fase orgânica foi recuperada, pois é nela que se encontra o ergosterol. Foi diluído

200µl dessa fase orgânica em 800µl de etanol e em seguida foi realizada a leitura da absorbância em espectrômetro de luz UV visível em um comprimento de onda de 220 a 300nm. Para determinar a concentração de ergosterol, foi preparada uma curva analítica de ergosterol (Sigma Aldrich ®), com 5 padrões (1 µg/mL, 2,5 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL e 15 µg/mL). A partir da curva, foi obtida a equação da reta, a qual foi utilizada para a determinação da concentração das amostras.

De acordo com Arthington-Skaggs *et al.*, (1999), o ergosterol e seu composto intermediário (DHE) apresentam máximos de absorção no comprimento de onda de 281,5 nm, enquanto, somente, o DHE apresenta máximo de absorção no comprimento de onda de 230 nm. Levando isso em consideração, o valor de absorbância em 281,5 nm foi subtraído do valor de absorbância obtido em 230nm, exclusivo da substância intermediária. Após isso, o valor resultante do cálculo foi usado na equação da reta.

#### **4.7. Avaliação da citotoxicidade dos produtos naturais em cultura de queratinócitos pelo ensaio de viabilidade celular**

Para a avaliação da citotoxicidade dos compostos naturais foi utilizado a linhagem de queratinócitos humano HaCat, que foi cultivada em uma atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37° C em meio de cultura RPMI contendo 10% de soro bovino fetal, por 1 a 2 dias. A linhagem foi subcultivada em placas de 96 poços, na concentração de 1x10<sup>5</sup> células por poço, durante 24 h para a aderência celular na mesma condição. Após estas 24 h, o meio de cultura foi retirado e diferentes concentrações dos produtos naturais foram adicionados, a placa foi incubada novamente por 24 h a 37° C. Posteriormente, o meio de cultura juntamente com as drogas foram retirados e adicionou-se 20 µl do sal MTT (5mg/mL). Incubou-se a placa novamente em estufa de CO<sub>2</sub> por 3 h, para dissolver o sal MTT, em seguida adicionou 200µl de DMSO para determinar as células viáveis, incubou-se por mais 40 min para o DMSO dissolver o sal MTT, posteriormente convertido para sal de formazam. Decorrido o tempo de incubação, foi realizada a leitura em comprimento de onda 550 nm, em um leitor de microplacas (Thermo Plate reader). Para cada droga o ensaio foi realizado em triplicata em três experimentos independentes. Para a análise estatística foi realizado o teste de Scott-knott (ANOVA), e a determinação do IC<sub>50</sub> foi obtida através de uma análise de regressão linear  $p < 0,05$  (RIZO *et al.*, 2013).

## **4.8. Co-cultivo de *T. rubrum* em linhagem de queratinócitos humanos HaCat na presença ou ausência dos antifúngicos naturais**

### **4.8.1. Preparação de Queratinócitos HaCat**

As células HaCat foram cultivadas em garrafas de cultivo em meio RPMI com 10% de soro bovino fetal (SBF) em estufa a 37° C com 5% CO<sub>2</sub> até atingir 90% de confluência da garrafa. As células foram repicadas até a terceira passagem, a qual foi pré-determinada para o ensaio de co-cultivo, e então foram contadas em hematímetro e tiveram a concentração ajustada para 2,5x10<sup>5</sup> células/mL. Posteriormente, as células foram transferidas para garrafa de cultivo de 25cm<sup>2</sup> em meio RPMI 5% de SBF e incubadas em estufa a 37° C com 5% CO<sub>2</sub> por 24 h.

### **4.8.2. Preparação de Suspensão de conídios de *T. rubrum***

Placas da linhagem CBS de *T. rubrum* foram cultivadas por 7 dias em meio ágar Sabouraud. Após os 7 dias, o micélio das placas foi raspado, com o auxílio de uma espátula estéril, e inoculado em solução salina 0,9%, e submetido a vigorosa agitação para promover a desagregação dos conídios. Em seguida a solução foi filtrada em lã de vidro e a concentração da suspensão de conídios foi ajustada para 1x10<sup>7</sup> conídio/mL em hematímetro. A suspensão de conídios obtida foi centrifugada a 1730g por 10 min, o precipitado resultante foi homogeneizado em 5 mL de meio Sabouraud líquido e incubado por 7 h a 120 rpm. Finalizando, foi realizada uma nova centrifugação a 1730g e o sedimento foi ressuspensionado em 5 mL de meio RPMI com 2% de soro.

### **4.8.3. Co-cultivo da linhagem HaCat e *T. rubrum***

Após o período de 24 h de incubação para aderência das células HaCat (item 4.8.1), o meio de cultura foi retirado e foi adicionado a suspensão de conídios (1x10<sup>7</sup> conídio/mL), preparada como descrito no item 4.8.2. Neste mesmo momento, os compostos naturais foram adicionados nas seguintes concentrações: ácido cafeico 3,9 µg/mL, licochalcona 0,0975 µg/mL, portanto em ¼ da concentração do CIM, somente a terbinafina foi utilizado uma concentração de 1/8 do CIM, 0,002375 µg/mL. Além do co-cultivo com e sem drogas foram realizados os controles da cultura de queratinócitos humanos HaCat e da suspensão de conídios de *T. rubrum*, que foram cultivados em meio RPMI na presença de 2% de SBF. Logo em seguida, as garrafas foram incubadas na estufa a 37° C com 5% CO<sub>2</sub> por 24 h, quando foi possível observar a formação das hifas nos queratinócitos.

Com o auxílio de um raspador celular o co-cultivo foi retirado e centrifugado a 1730g por 10 min, o meio foi descartado e o precipitado foi ressuspensão em 1 mL de uma solução de enzimas de lise (20 mg/mL) mais solução lítica (KCl 0,7 M; MgSO<sub>4</sub> 1M), e incubado por 1 h a 28° C a 130 rpm. Após a incubação, foi realizada a centrifugação a 1730 g por 10 min e o precipitado foi diluído em 350 µl de tampão de lise RA 1, (Illustra RNAspin Mini RNA Isolation da GE Healthcare), seguidos de estocagem em freezer -80°C até a realização da extração do RNA.

#### **4.9. Comprovação da infecção de *T. rubrum* em células HaCat por meio de coloração**

Após 24 h do co-cultivo de conídeo de *T. rubrum* em queratinócitos HaCat foi feita a coloração utilizando os compostos May-Grunwal e Giemsa. As garrafas de co-cultivo foram centrifugadas e o meio de cultura foi descartado. Em seguida, o corante May-Grunwal foi adicionado até que cobrisse a superfície da garrafa de cultura e foi mantido por 2 min, logo após o May-Grunwal foi descartado, e adicionou-se o Giemsa até cobrir a superfície da garrafa de cultivo para colorir as células infectadas, e foram aguardados 10 min. Decorrido esse período, o Giemsa foi descartado e a superfície da garrafa de cultura foi lavada com água destilada. Finalizando, a garrafa foi mantida a temperatura ambiente até secar. A co-cultura foi analisada em microscópio invertido Axio Observer A<sub>1</sub> (Zeiss), pertencente ao laboratório de cultura celular – Hemocentro, Ribeirão Preto, e as imagens foram registradas em câmera fotográfica (Axio Cam MRC) para comprovar a infecção.

#### **4.10. Extração de RNA**

A extração foi realizada com o kit illustra RNAspin Mini RNA Isolation da GE Healthcare, segundo as recomendações do fabricante. Em resumo, após a adição de 350 µL de reagente RA1, foi adicionado 3,5 µL de β- mercaptoetanol e submetido a uma agitação vigorosa. Em seguida, o lisado foi aplicado em uma coluna para a remoção da viscosidade e de impurezas resultantes da lise celular, e centrifugado por 1 min a 11000 g. Esse filtrado foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL em que foi adicionado 350 µL de etanol 70%, e o lisado foi submetido a uma nova agitação vigorosa por duas vezes de 5 segundos. Esse lisado foi aplicado em uma nova coluna e centrifugado por 30 segundos à 8000g; a remoção dos sais foi feita através da adição de 350 µL de tampão de dessalinização e centrifugação por 1 minuto à 11000 g. Após a remoção dos sais, foi adicionada DNase e incubado em temperatura ambiente por 15 min. Foram então, feitas as lavagens com os tampões de

lavagem fornecidos pelo kit e uma novas centrifugações à 11000 g por 2 min. A eluição foi feita com 30  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O em tubo “RNase-free” e centrifugação à 11000 g por 1 minuto.

A integridade dos RNAs extraídos foi verificada por meio de eletroforese em gel desnaturante, a pureza e a quantidade foram avaliadas através de leitura em nanofotômetro (Implen<sup>R</sup>).

#### 4.11. Eletroforese desnaturante

O gel desnaturante foi preparado para um volume de 100 mL, utilizou-se 1,05 g (1,05%) de agarose (Sigma), adicionado de 20 mL de formaldeído, 70 mL de MOPS 5X (20,6g de MOPS dissolvidos em 800 mL de acetato de sódio 50 mM, pH 7,0 ajustado com NaOH 2N e adicionado 10 mL de EDTA 0,5M pH8,0; volume final ajustado para 1000 mL) e 70 mL de MOPS 1X. A desnaturação das amostras de RNA foi realizada em microtubos de 1,5 mL, nos quais foram adicionados cerca de 2  $\mu$ g RNA, 2,0  $\mu$ L de tampão MOPS 5X, 3,5  $\mu$ L de formaldeído 37% (Merck, Alemanha) e 10,0  $\mu$ L de formamida, incubando-se por 15 min a 65°C. Em seguida, os tubos foram colocados imediatamente no gelo e adicionados a 1,0  $\mu$ L de brometo de etídio (0,5mg/mL) e 2,0  $\mu$ L de “dye loading solution”. As condições da eletroforese foram 90 V por 60 min, e o tampão de migração utilizado foi o MOPS 1X. As bandas de RNA foram visualizadas em transiluminador UV e fotografadas.

#### 4.12. Tratamento com DNase

Após a avaliação da integridade do RNA foi realizado um novo tratamento com a DNase, conforme descrito na tabela 1:

**Tabela 1:** Concentração dos reagentes para tratamento com DNase.

RNA	1 $\mu$ g
DNase	2 $\mu$ l
tampão 10x	2 $\mu$ l
água deionizada q.s.p.	10 $\mu$ l

A reação foi incubada por 20 min à temperatura ambiente e, posteriormente o RNA foi utilizado para a síntese de cDNA.

#### 4.13. Síntese de cDNA

A reação foi realizada com o Kit RevertAID H Minus First Strand cDNA Synthesis (Fermentas ®). Concentração de 1µg de RNA total foi utilizada, previamente tratado com DNase (item 4.12) e foi adicionado 1 µl de primer oligo dT e o volume foi completado para 12 µl. A reação foi incubada a 65° C por 5 min, voltando imediatamente para o gelo depois da incubação. A reação continuou conforme os reagentes descritos na tabela 2.

**Tabela 2:** Concentração dos reagentes para a síntese do cDNA.

5X Reation Buffer	4 µl	
RiboLock RNase Inhibitor (20 U/ µl)	1 µl	
10mM dNTP Mix	2 µl	
RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (200 U/ µl)		1 µl
<b>Volume Total: 20 µL</b>		

#### 4.14. Reação de PCR quantitativa

Nas reações de PCR quantitativa foi utilizado o kit Sybr Green JumpStart Taq ReadyMix (Sigma) nas condições recomendadas pelo fabricante. Em todas as reações foi utilizado o corante ROX para normalizar o sinal de fluorescência. Abaixo seguem os parâmetros de ciclagem das reações:

1° ciclo: 94°C – 2 min;  
 2° ciclo: 94°C – 15 segundos;  
 3° ciclo: 60°C – 1 minuto;  
 4° ciclo: 72°C – 30 segundos; → 40 ciclos

5° ciclo: Curva de dissociação que se baseia em: 95°C-1 minuto; 55°C-30 segundos e 95°C-30 segundos.

#### 4.15. Desenho e eficiência dos inicializadores

Os inicializadores utilizados foram: Isocitrato Liase, Citrato Sintase, Malato Sintase, ERG 1, ERG 6, ERG11, DW681613 (proteína ancorada a glicosilfosfatidilinositol), DW699324 (sub-unidade catalítica da 1,3 beta glucana sintase), DW687269 (Sub-unidade catalítica da 1,3 beta-D-glucana sintase) e o β-tubulina, o normalizador, descritos na tabela 3.

Todos estes inicializadores já tinham sido desenhados, com eficiência de amplificação e padronizados anteriormente por integrantes do nosso grupo de pesquisa, exceto o 18S.

**Tabela 3:** Sequências dos “primers” para a PCR quantitativa.

<b>GENES</b>	<b>Sequência</b>	<b>Tamanho do fragmento</b>	<b>Referência</b>
<b>Isocitrato liase</b>	<b>F:</b> ACAACCTCTCGCCTTCATTC <b>R:</b> GGTCAGATATCAGGGCAGTTG	144	KOMOTO <i>et al.</i> , 2015.
<b>Citrato Sintase</b>	<b>F:</b> GAGGAGGGTATTCGCTTCCG <b>R:</b> CGAACTTGTTGCTCGGTTGG	143	KOMOTO <i>et al.</i> , 2015.
<b>Malato Sintase</b>	<b>F:</b> CCTAACCAACTCTTTGTCCGAC <b>R:</b> GAAGCCATCCCTCCATGTAAG	142	Este trabalho.
<b>ERG1</b>	<b>F:</b> GTGAAGATACCTTTCCTAGCG <b>R:</b> TTATGGTAGAAACGGCCTTGG	148	KOMOTO <i>et al.</i> , 2015.
<b>ERG6</b>	<b>F:</b> CTCTGGCAAGACACGAACAC <b>R:</b> CCTTGCAGCCGGTGAAGG	126	BITENCOURT <i>et al.</i> , 2013.
<b>ERG11</b>	<b>F:</b> CACTTCCTTGCCCTGTAGAGATC <b>R:</b> GGAGTTTTCAATGTCAGCAAGGTTT	78	YU <i>et al.</i> , 2007.
<b>DW681613</b>	<b>F:</b> TCA ACA TCA CCG TGC TCA AGA CCT <b>R:</b> AAG ACC GCC TTT AGG ATC ACC GTT	158	YU <i>et al.</i> , 2006
<b>DW699324</b>	<b>F:</b> TTGTTATCGCCGGCCCTCTAATCA <b>R:</b> AGTATGGCTGGAGCTGGTGTCATT	115	YU <i>et al.</i> , 2006
<b>DW687269</b>	<b>F:</b> ACC AGC TCC AGC CAT ACT GGA AA <b>R:</b> TTA GAA GCG TAA GAG CTT GGC AGC	84	WANG <i>et al.</i> , 2006
<b>β-tubulina</b>	<b>F:</b> AACATGATGGCTGCCACTGA <b>R:</b> AAGATGGCAGAGCAGGTAAGGT	253	JACOB <i>et al.</i> , 2012.
<b>18S</b>	<b>F:</b> AGCTGTCAGTCTGAGCGTTTAGCA <b>R:</b> GATGAAGAACGCAGCGAAATGCGA	97	Este trabalho.

**F:** Forward **R:** Reverse

#### 4.16. Quantificação Relativa da expressão

As condições analisadas foram: co-cultivo x fungo (relação dos genes com a interação patógeno-hospedeiro), co-cultivo + agentes antifúngicos x co-cultivo. Agentes antifúngicos ensaiados: ácido cafeico e licochalcona, todos testados na concentração do ¼ CIM e Terbinafina (1/8 do CIM).

Na condição co-cultivo x fungo: o co-cultivo foi a amostra teste, chamada de unknown e o fungo a amostra referência, denominada calibrador. Enquanto, para a condição co-cultivo + agentes antifúngicos x co-cultivo, os tratamentos foram denominados “unknown”, enquanto que o cDNA da amostra co-cultivo não tratada (controle) foi designada de “calibrador”. Em cada reação de PCR, foi utilizado o gene  $\beta$ -tubulina e o 18S como “normalizador”, e todas as reações foram feitas em triplicata, com dois experimentos independentes. Para cada gene analisado, foi incluído um branco que denominou-se NTC ( Non- Template- Control). Os experimentos foram realizado utilizando o aparelho Mx QPCR da Stratagene, software MxPro, e os cálculos de quantificação relativa foram gerados a partir da seguinte equação:

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

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

As reações foram realizadas conforme os reagentes descritos na tabela 4:

**Tabela 4:** As reações foram feitas da seguinte forma, para os iniciadores de 100-70 nM:

2x JumpStart <i>Taq</i> ReadyMix	12,5 $\mu$ L
Reference Dye**	0,5 $\mu$ L
PrimerFWD(1 $\mu$ M)	100-40 nM
PrimerREV(1 $\mu$ M)	100-40 nM
cDNA	1 $\mu$ L
Água qsp	25 $\mu$ L

\*\* 20x diluído

Os iniciadores utilizados em 100 nM foram Isocitrato liase, Citrato Sintase, Malato Sintase, ERG6, ACC DW699324, DW687269 e  $\beta$ -tubulina em Forward e Reverse. ERG11 70nM para Forward e Reverse. DW681613 Forward 100nM e Reverse 70nM.

#### 4.17. Análise estatística

A análise estatística de todo o trabalho foi realizada utilizando a análise de variância ANOVA seguido de teste de Bonferroni pelo programa GraphPad Prism.

## V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Ensaio de sensibilidade dos fungos

Conforme apresentado na tabela 5, a licochalcona e o ácido cafeico apresentaram CIM de 11,52  $\mu\text{M}$  e 86,59  $\mu\text{M}$ , respectivamente. O ácido itacônico e a apigenina não apresentaram atividade antifúngica (CIM = > 3943,19 e 1850,20  $\mu\text{M}$ , respectivamente), enquanto que o ácido 3-nitropropiónico apresentou moderada atividade antifúngica com CIM de 2379,36  $\mu\text{M}$ . Quanto ao efeito dos compostos, a licochalcona mostrou-se fungistática com valor de CFM de 23,04  $\mu\text{M}$ , já o ácido cafeico mostrou-se fungicida com CFM 86,59  $\mu\text{M}$ . Dessa forma, a licochalcona e o ácido cafeico foram os compostos mais efetivos contra *T. rubrum* e foram escolhidos para realizar os próximos experimentos.

**Tabela 5:** Concentração Inibitória Mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) em  $\mu\text{M}$  dos compostos antifúngicos avaliados contra a linhagem de *T. rubrum* CBS118892.

	Lico	Ac. Itac	Ac.Caf	A3N	Api	Terb	Flu
<b>CIM</b>	11,52	>3943,19	86,59	2379,36	>1850,20	0,065	51,45
<b>CFM</b>	23,04	>3943,19	86,59	2379,36	>1850,20	0,065	<1632

Lico: licochalcona, Ac. Itac: ácido itacônico, Ac. caf: ácido cafeico, A3N: ácido 3-nitropropiónico, Api: apigenina, Terb: terbinafina e flu: fluconazol.

O composto ácido cafeico possui diversas atividades biológicas tais como a atividade antifúngica avaliada contra *C. albicans*, com valor de CIM de 1000 mg/L (CHEAH; LIM; SANDAI, 2014), atividade anticancerígena (MOTAWI, T.K. *et al.*, 2016), atividade antioxidante e anti-inflamatória (TAYLAN, M. *et al.*, 2016). Além disso, os valores de CIM encontrados nesse trabalho corroboram com outros já observados na literatura científica para

esse composto, como o apresentado por SANTIGO *et al.* (2010), que mostrou a inibição da germinação de *Sporisorium scitamineum* (fungo causador da doença ferrugem em cana-de-açúcar) com 20 µg/mL de ácido cafeico. FREIRES I. A. *et al.* (2016) também estudou o efeito de diferentes concentrações de extratos de própolis em diferentes linhagens fúngicas, obteve como resultado valores de CIM variando entre 1 e 31,25 mg/ml, ademais mostrou que este extrato atuou em biofilmes de *C. albicans*.

Nesse estudo, o composto natural licochalcona também apresentou potente atividade antifúngica. De acordo com dados da literatura, esse composto apresenta diversas atividades biológicas como efeitos protetores contra lesão renal aguda (HU, J., LIU, 2015), além de se mostrar como um agente terapêutico adjuvante para câncer de bexiga (WANG, P., *et al.*, 2015). De modo geral, chalconas são compostos que apresentam atividade antifúngica, especialmente contra fungos dermatófitos. O potencial antifúngico de chalconas foi verificado para 2-arilideno-3,4-di-hidronaftalen-1 (2H) –onas, que foi mais eficiente do que cetoconazol para o tratamento de *M. gypseum* (GUPTA ; JAIN, 2015). Ainda nesse sentido, KOMOTO *et al.* (2015) avaliou a atividade antifúngica de *trans*-chalcona contra a linhagem CBS118892 do dermatófito *T. rubrum* e mostrou sua expressiva atividade antifúngica com CIM de 0,24 µg/mL. Enquanto que dados de atividade antifúngica de *trans*-chalcona contra a linhagem MYA1308 de *T. rubrum* obtidos por BITENCOURT *et al.* (2013) mostram CIM de 7,5 µg/mL e estudos de avaliação no nível de ergosterol e regeneração de protoplastos indicaram que a *trans*-chalcona atua em múltiplos alvos nas células fúngicas.

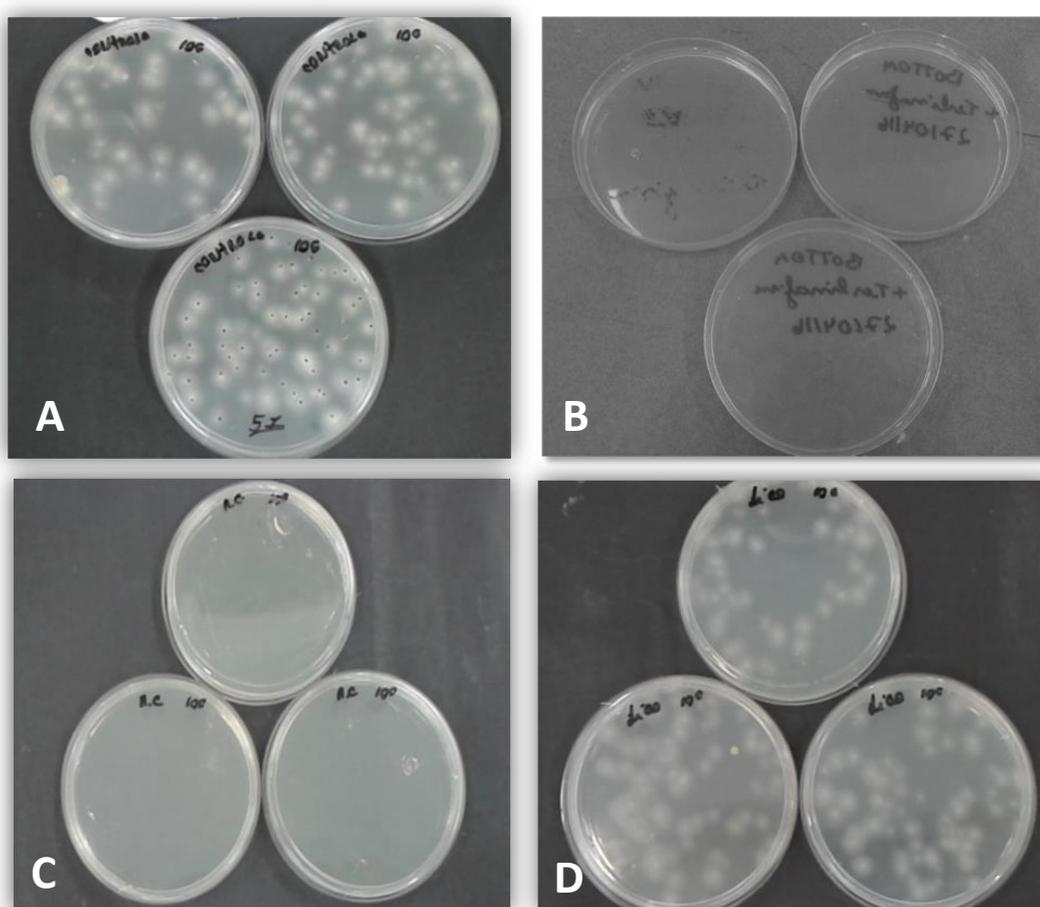
## 5.2. Ensaio de regeneração em protoplasto

Os valores de inibição na regeneração de protoplastos causados pelos compostos naturais foram comparados com os controles positivo (terbinafina) e negativo (ausente de drogas). O ácido cafeico inibiu totalmente a sua regeneração de protoplasto, em contraste, licochalcona não inibiu a regeneração de protoplastos (figura 4).

O efeito observado para os compostos ensaiados em comparação com o antifúngico terbinafina (que atua na membrana plasmática) mostra que o ácido cafeico pode causar danos sobre a membrana celular e, conseqüentemente, interferir na reconstituição de parede celular. Este resultado é semelhante ao encontrado por PIPPI, *et al.* (2015), que sugeriu que o extrato de própolis provocou ruptura da parede celular em *Candida ssp.*

O ensaio com a licochalcona não inibiu a regeneração dos protoplastos, por outro lado, BITENCOURT *et al.* (2013) mostrou que *trans*-chalcona inibiu totalmente a regeneração de protoplastos de *T. rubrum*, dado que demonstra diferenças de modo de ação antifúngico entre as diferentes estruturas das chalconas.

**Figura 4:** Regeneração dos protoplastos após exposição aos antifúngicos. Sendo A controle negativo (sem droga), B controle positivo (terbinafina), C tratamento com licochalcona e D tratamento com ácido cafeico.



### 5.3. Quantificação do conteúdo ergosterol

O conteúdo de ergosterol foi quantificado após o tratamento do micélio de *T. rubrum* com licochalcona, ácido cafeico e os controles positivos terbinafina e fluconazol, utilizando a curva analítica obtida a partir do padrão de ergosterol comercial, como descreve BITENCOURT *et al.*, (2013).

Os resultados demonstraram que o ácido cafeico causou maior redução do nível de ergosterol (36,24%), já licochalcona reduziu apenas 2,63% do conteúdo de ergosterol em *T. rubrum*. Estes dados sugerem que embora licochalcona tenha uma destacada atividade antifúngica, seu alvo possivelmente não é a biossíntese de ergosterol, pois o nível de redução desse esterol foi muito baixo. Em constraste, ácido cafeico parece atuar na biossíntese do ergosterol, uma vez que reduziu o conteúdo de ergosterol de forma semelhante à drogas que atuam nessa via, como as drogas comerciais terbinafina com redução de 59,56% e fluconazol 49,06 %.

Vale ressaltar, que BITENCOURT *et al.* (2013) verificou a inibição de 100% do conteúdo de ergosterol de *T. rubrum* na presença de *trans*-chalcona. Este resultado reforça as diferenças de modo de ação entre licochalcona e *trans*-chalcona. Nesse trabalho, fluconazol reduziu o conteúdo de ergosterol em 40,95%.

#### **5.4. Ensaio de viabilidade celular (MTT)**

Através do ensaio de viabilidade celular foi possível determinar a citotoxicidade dos compostos ácido cafeico e licochalcona. Ainda, de acordo com o ensaio, foi possível verificar que licochalcona apresentou baixa citotoxicidade em células de queratinócitos humanos (HaCat) com valor de  $IC_{50} < 31 \mu M$ . Esse dado pode viabilizar seu uso como composto antifúngico, pois vale destacar que o CIM de *T. rubrum* é  $11,52 \mu M$ . Para o ácido cafeico o valor obtido de  $IC_{50}$  foi de  $110,52 \mu M$  e o de CIM foi  $86,59 \mu M$ . Apesar da proximidade entre os valores de citotoxicidade celular e inibição fúngica, deve ser levado em consideração o fato de que a quantidade do antifúngico para inibir o crescimento do fungo é inferior à quantidade necessária para matar 50% de células de queratinócitos HaCat.

Os resultados do presente trabalho, estão de acordo com os dados encontrados na literatura, visto que, PLUEMSAMRAN; ONKOKSOONG; PANICH (2012) mostrou que até  $60 \mu M$  de ácido cafeico não causou atividade citotóxica em células HaCat, apresentando 100% de sobrevivência. Além disso, afim de comparar os dados de citotoxicidade de compostos naturais com antifúngicos comerciais, ensaio de viabilidade celular testando a terbinafina mostrou que esse antifúngico apresentou baixa citotoxicidade em células HaCat, com valor de  $IC_{50}$  de  $343,57 \mu M$  (KOMOTO *et al.*, 2015).

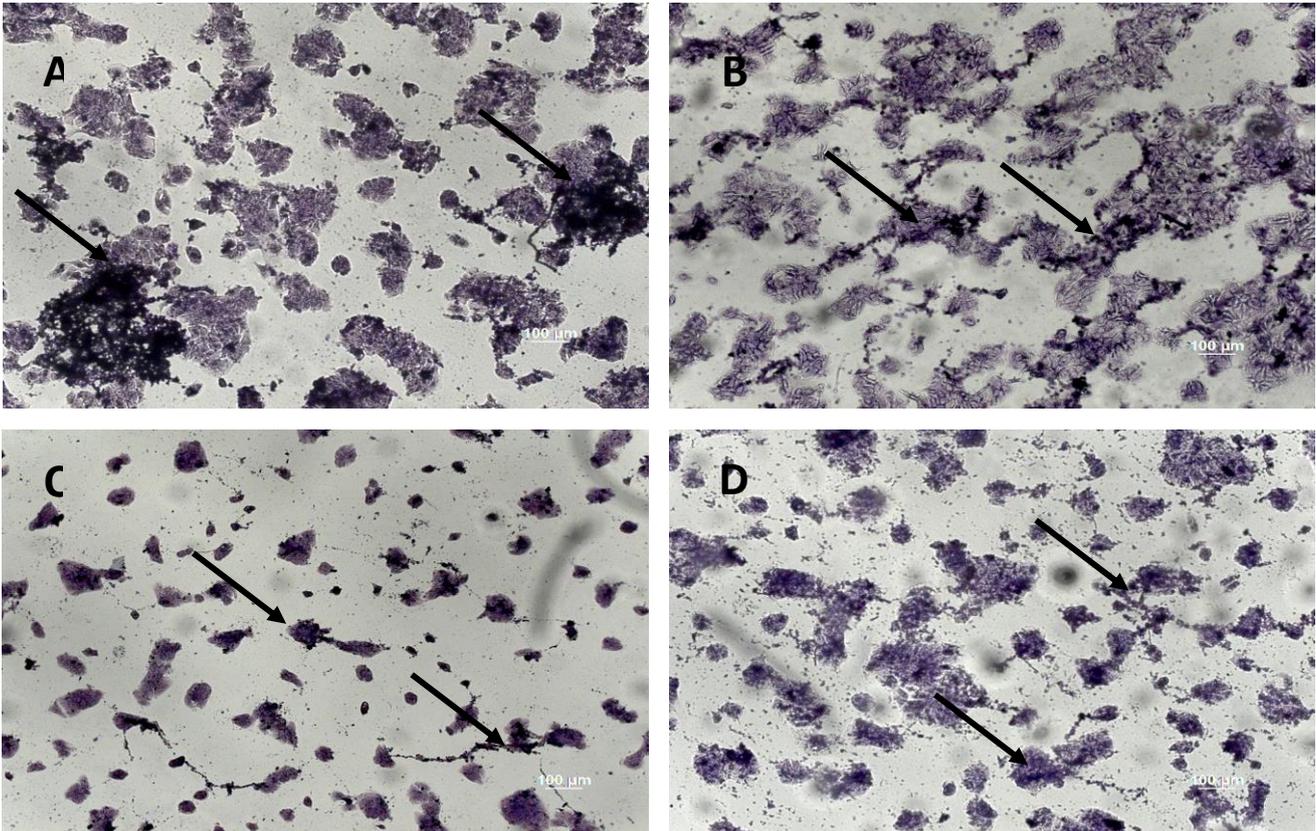
Nos valores de inibição celular em % para os compostos ácido cafeico e licochalcona, foi observado que as concentrações de 351,72  $\mu\text{M}$  e 175,72  $\mu\text{M}$  para ácido cafeico e 88,65  $\mu\text{M}$  e 44,332  $\mu\text{M}$  para licochalcona são citotóxico para as células HaCat.

### **5.5. Ensaio de Co-cultivo de *T. rubrum* na presença de compostos inibidores**

A interação entre células fúngicas e de célula de epiderme humana ocorreu de forma eficiente (Figura 5A), sendo claramente observado o desenvolvimento das hifas *T. rubrum* sobre as células de HaCat. A utilização dessa abordagem de co-cultivo de *T. rubrum* em queratinócitos foi utilizada na tentativa de mimetizar a infecção na pele humana, desde que o modelo de infecção utilizando meio de cultura adicionado de fontes proteicas apesar de possibilitar resultados interessantes, ainda é muito distante do modelo real de infecção, enquanto que o modelo animal utilizando camundongos ou porquinho da índia não é um modelo ideal, devido a natureza antropofílica desse fungo, pois a infecção em modelo animal é rapidamente revertida (PERES *et al.*, 2010). Além disso, o co-cultivo em células HaCat vem sendo eficientemente utilizado pelo nosso grupo de pesquisa. KOMOTO *et al.*, (2015) e por outros trabalhos da literatura como o de HUANG *et al.* (2015): que também realizaram o co-cultivo de *T. rubrum* na linhagem HaCat.

Neste trabalho, além de realizar o co-cultivo de *T. rubrum* em células HaCat, foi verificado o efeito dos compostos antifúngicos naturais no co-cultivo. Para essa finalidade, os compostos foram adicionados em  $\frac{1}{4}$  do CIM obtido, exceto para tratamento com terbinafina que foi utilizado  $\frac{1}{8}$  do CIM, devido a sua expressiva atividade antifúngica.

**Figura 5:** Co-cultivo das células HaCat com o fungo *T. rubrum*. Aumento de 100 x. As setas indicam as hifas infectando as células. Sendo A co-cultivo sem drogas, B co-cultivo na presença de 0,0975  $\mu\text{g/mL}$  licochalcona, C co-cultivo na presença de 3,9  $\mu\text{g/mL}$  de ácido cafeico e D co-cultivo na presença de 0,002375  $\mu\text{g/mL}$  de terbinafina.

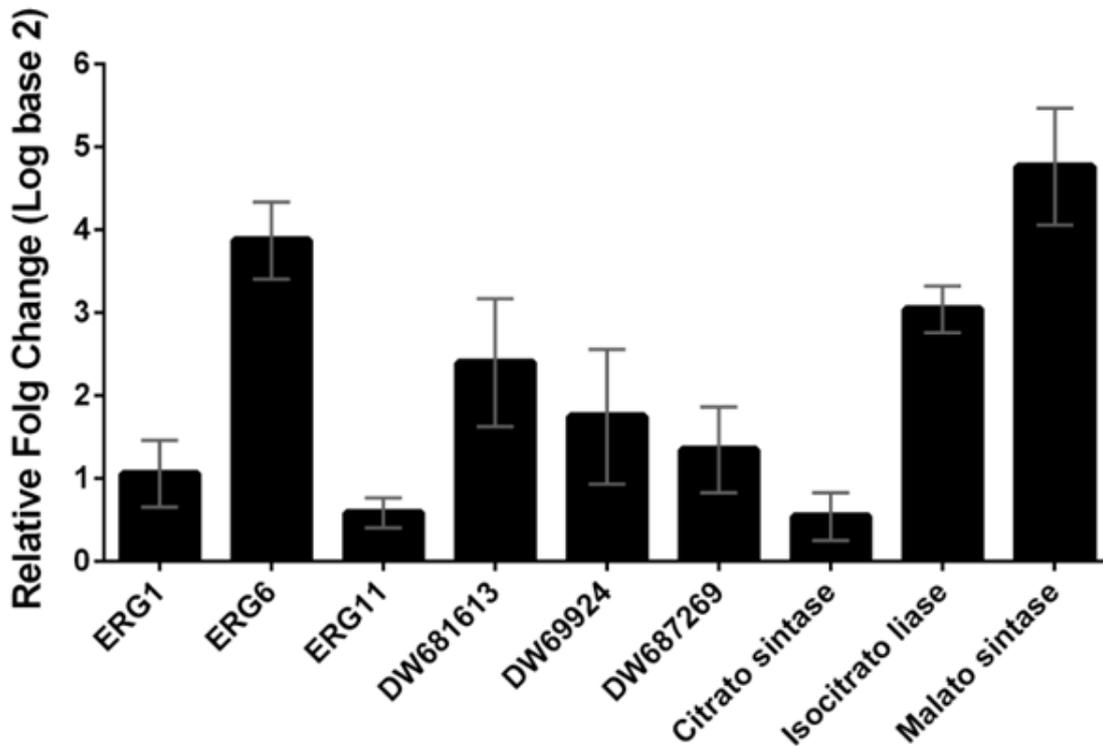


A figura 5 B indica o cultivo do fungo na presença do composto natural licochalcona, nota-se que as hifas não se desenvolveram de forma contínua e apresentaram-se fragmentadas, ao contrário do que foi observado na Figura 5 A do co-cultivo sem drogas. O ácido cafeico foi o que promoveu menor desenvolvimento de hifas, que mostraram-se escassas e dispersas sobre as células HaCat (figura 5 C), a desagregação observada nas células HaCat pode ser explicado por YANG *et al.*, (2013) que constatou a possível atuação do ácido cafeico sobre moléculas de adesão como as caderinas das células. O tratamento com terbinafina também alterou o desenvolvimento das hifas, que mostraram-se dispersas e escassas, estando essas altamente fragmentadas (figura 5 D).

### **5.6. Expressão de genes de *T. rubrum* envolvidos na relação fungo-hospedeiro em resposta ao efeito dos compostos naturais pela PCR quantitativa.**

Os ensaios realizados foram feitos para verificar a modulação de genes envolvidos na relação fungo-hospedeiro. Foi constatada a indução dos genes envolvidos no ciclo do glioxilato (Isocitrato Liase, Citrato Sintase, Malato Sintase), genes da síntese de parede celular [DW681613 (proteína ancorada a glicosilfosfatidilinositol), DW699324 (sub-unidade catalítica da 1,3 beta glucana sintase), DW687269 (Sub-unidade catalítica da 1,3 beta-D-glucana sintase)] e genes da biossíntese de ergosterol [Erg 1 (esqualeno epoxidase), Erg6 (esterol C-24-metiltransferase) e Erg11(esterol 14-desmetilase)], como mostrado na Figura 8. Para controle de especificidade dos iniciadores, foram realizados ensaios de PCR quantitativa utilizando todos os iniciadores testados com o cDNA das células HaCat, os quais mostraram-se específicos somente para *T. rubrum*.

**Figura 6:** Análise de modulação da expressão gênica durante o co-cultivo de conídios de *T. rubrum* em células HaCat em 24 h de cultivo. A referência para a modulação (calibrador) foi os conídeos de *T. rubrum*..



A escolha dos genes avaliados nesse trabalho são decorrentes do fato da literatura indicá-los como fatores importantes para a patogenicidade em dermatófitos. Além disso, esses genes são considerados importantes alvos antifúngicos, visto sua importância para sobrevivência de *T. rubrum* e ausência nas células de mamíferos. Adicionalmente, os experimentos de quantificação de ergosterol e de regeneração de protoplastos também influenciaram na escolha desses genes.

Os genes Erg 1, Erg6 e Erg11 são codificadores de enzimas da via biossintética de ergosterol. Após análise de expressão desses genes durante a interação de *T. rubrum* com as células HaCat foi verificado que todos mostraram-se induzidos, com destaque para o gene Erg6. O gene Erg6, codifica a enzima esterol C-24 metiltransferase, que é um elemento importante para síntese de ergosterol, pois atua na conversão de zimosterol em fecosterol. O zimosterol é o último esterol comum entre a via de biossintese do ergosterol e do colesterol.(KRISTAN & RIZNER, 2012). A indução de Erg6 parece estar relacionada

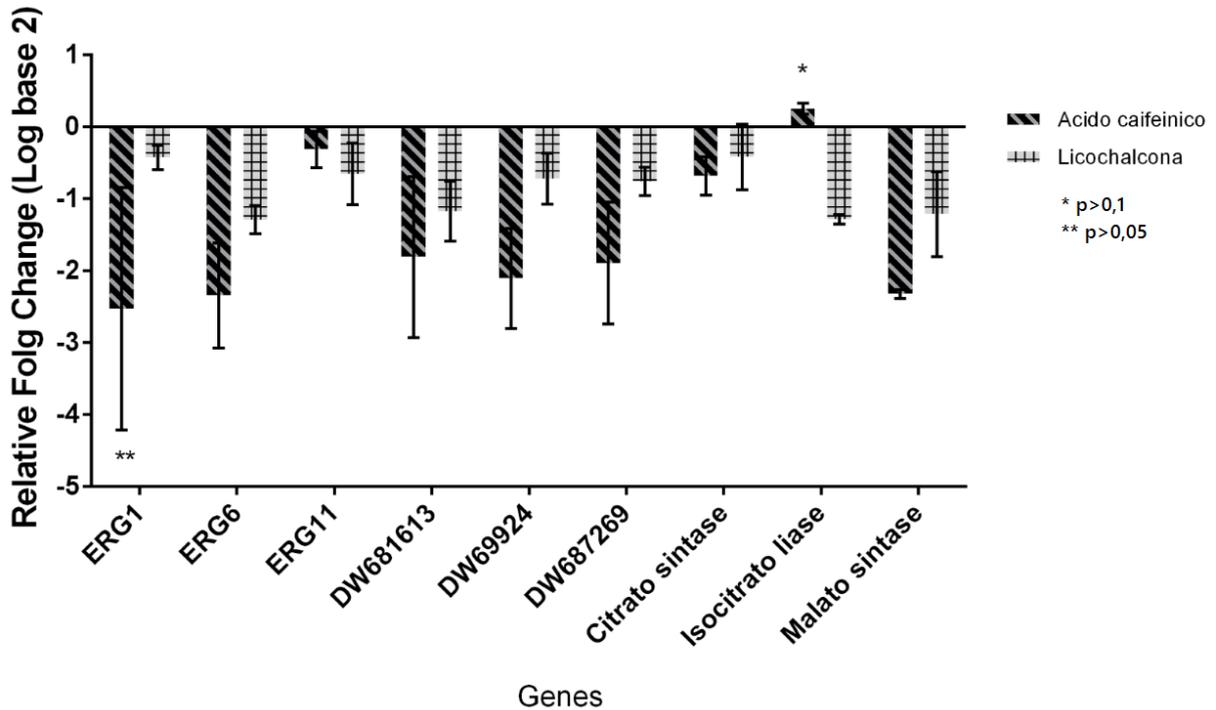
diretamente com o fenótipo de resistência à drogas para compostos como fluconazol e anfotericina (BARKER *et al.*, 2004). Além disso, a indução desse gene também foi verificada no ensaio prévio de co-cultivo de *T. rubrum* com células HaCat realizado por KOMOTO *et al.* (2015).

Os genes DW681613, DW699324, DW687269 são codificadores de enzimas da síntese de parede celular. Esses genes também foram induzidos durante o ensaio de co-cultivo (Figura 6). Acredita-se que a expressão desses genes estejam associados ao processos iniciais de infecção durante a interação patógeno-hospedeiro (WANG *et al.*, 2006, FREE, 2013).

O ciclo do glioxilato tem sido apontado pela literatura como relevante para o processo de infecção em *Candida albicans*, favorecendo a utilização de fontes alternativas de carbono em meio com baixa glicose. Entre os genes envolvidos nessa via estão: Isocitrato Liase, Citrato Sintase, Malato Sintase. A figura 8 indica a indução destes genes durante o co-cultivo de *T. rubrum* em células HaCat. Esse dado corrobora com dados obtidos por KOMOTO *et al.*, (2015), em que foi observada a indução das enzimas malato sintase e isocitrato liase. Todos esses indícios apontam o ciclo do glioxilato como significativa importância no processo de infecção fúngica.

Após a análise da expressão genica do co-cultivo sem droga, figura 6, foram analisados os resultados da expressão genica do co-cultivo com os compostos antifúngicos, (figura 7), sendo observado a repressão da expressão de todos os genes avaliados, com exceção do gene codificador da isocitrato liase para o tratamento com ácido cafeico.

**Figura 7:** Análise de modulação da expressão gênica durante o co-cultivo de conídios de *T. rubrum* em células HaCat na presença dos antifúngicos, por 24 h. A referência para a modulação (calibrador) foi o co-cultivo comparado com o co-cultivo na presença dos antifúngicos. \* indica diferença estatística significativa ( $p \geq 0,1$ )



Os dados de expressão gênica mostraram que o composto ácido cafeico reprimiu de forma expressiva todos os genes envolvidos na biossíntese da parede celular ensaiados. A parede celular é constituída por biopolímeros que não estão presentes em células humanas, composta por quitina, quitinase,  $\beta$ 1,3-glucana-sintase,  $\beta$ 1,6-glucana sintase, enzima ramificadora e 1,4-alfa-glucana, que tem sido apontada como importante alvo antifúngico e apresenta diversos papéis nas células fúngicas como manutenção da integridade celular, barreira protetora, tensões osmóticas, e interação entre fungo-hospedeiro, sendo considerada fator essencial para a virulência de fungos patogênicos (WANG *et al.*, 2006, FREE, 2013). Atualmente, a caspofungina é o único medicamento de uso clínico disponível com atuação nesse alvo, inibindo especificamente a enzima  $\beta$ -1,3-glucana e alterando de forma compensatória os níveis de quitina na parede celular. Um composto natural que inibi a

biossíntese de parede celular são as chalconas, elas tem a capacidade de inibir a  $\beta$  (1,3)-glucana sintase e outros componentes da parede celular (BITENCOURT *et al.*, 2013).

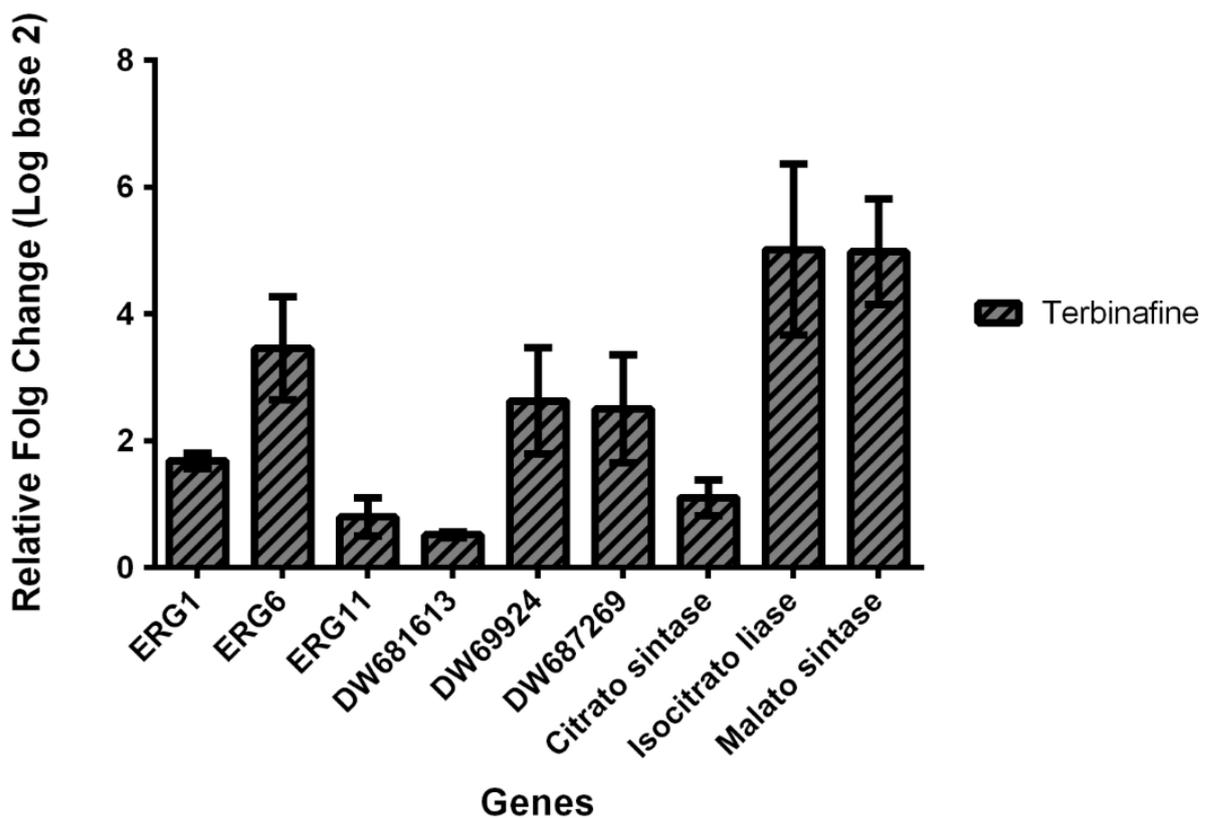
Além disso, o tratamento com ácido cafeico promoveu redução significativa da expressão do gene Erg1, alvo do antifúngico comercial terbinafina, assim como reduziu de forma expressiva o gene Erg6. Essa redução do gene Erg6 apresenta-se especialmente atrativa, pois esse gene apresentou-se induzido significativamente durante a interação de *T. rubrum* com HaCat, o que indica sua importância na interação fungo-hospedeiro e o ressalta como fator de virulência. Com relação ao gene Erg11, alvo do antifúngico fluconazol, sua repressão mostrou-se equivalente para os dois tratamentos empregados.

As enzimas referentes ao ciclo do glioxilato estudadas foram reprimidas pelos tratamentos ácido cafeico e licochalcona. A única exceção ocorreu para o gene isocitrato liase, com sutil indução após exposição à ácido cafeico (Figura 7). Esse dado chamou a atenção pelo fato da literatura indicar o modo de ação do composto ácido cafeico envolvido com o ciclo do glioxilato com inibição de 91,5% desse enzima no tratamento com o mesmo composto em *C. albicans* (CHEAH; LIM; SANDAI, 2014). Deve ser levado em consideração, pois o produto da isocitrato liase pode alimentar o ciclo do ácido tricarboxílico.

Sabe-se que o ciclo do glioxilato apresenta dois passos principais. Primeiramente, o isocitrato (seis átomos de carbono) é hidrolisado para succinato (quatro átomos de carbono) e glioxilato (dois carbonos) por isocitrato liase. No segundo passo, o acetil-CoA (dois átomos de carbono) está condensado com glioxilato para produzir malato (quatro átomos de carbono) por malato sintase. Malato é um intermediário do ciclo do ácido tricarboxílico, é convertido em oxalacetato, para o citrato (pela adição de uma outra molécula de acetil-CoA), e, em seguida, a isocitrato novamente. Estes passos são idênticos aos enzimaticamente do ciclo do ácido tricarboxílico, mas há especificidade de regulação conferido tanto pelas isoenzimas glioxilato dedicados e por compartimentalização. Assim, os compostos com dois átomos de carbono podem repor os intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico através do ciclo do glioxilato (LORENZ *et al.*, 2002). Além disso, a enzima isocitrato liase é responsável por converter isocitrato em glioxilato e succinato, sendo importante para a manutenção do ciclo do ácido tricarboxílico, proporcionada pelo ciclo do glioxilato quando a geração de piruvato a partir de glicólise é menor do que a de ácidos graxos gerados por  $\beta$ -oxidação (GOULD *et al.*, 2006).

A partir desses dados, foi notada, no tratamento com terbinafina a indução de todos os genes avaliados, inclusive do gene Erg1, conforme mostra a figura 8. Acredita-se que estes resultados diferem dos apresentados pela literatura, pois o tratamento foi feito com uma concentração menor (1/8 da droga), o que pode ter estimulado essa resposta após a exposição a droga, possivelmente como uma tentativa de superar o efeito sobre esse alvo. KOMOTO *et al.*, (2015) verificou o repressão deste gene realizando o mesmo experimento de co-cultivo, mas nesse trabalho o tratamento foi realizado com 1/4 da droga.

**Figura 8:** Análise de modulação da expressão gênica durante o co-cultivo de conídios de *T. rubrum* em células HaCat na presença do antifúngico comercial terbinafina. A referência para a modulação (calibrador) foi o co-cultivo comparado com o co-cultivo na presença do antifúngico.



## VI. CONCLUSÃO

Entre os compostos ensaiados os mais efetivos foram a licochalcona e o ácido cafeico com valores de CIM de 11,52  $\mu\text{M}$  e 86,59  $\mu\text{M}$  respectivamente. Estes foram os compostos utilizados para proceguir os experimentos e elucidar o modo de ação.

O ácido cafeico reduziu 100% da regeneração de protoplastos em *T. rubrum*. Igualmente, esse composto reduziu significativamente o conteúdo de ergosterol. Com isso, é possível prever a possível atuação deste composto na membrana celular.

O resultado do teste de citotoxicidade mostrou que ácido cafeico apresentou moderada citotoxicidade para a célula HaCat, demonstrando que este composto pode ser utilizado como um antifúngico.

O ácido cafeico e licochalcona afetam o desenvolvimento das hifas durante o co-cultivo de *T. rubrum* em células HaCat, constatando que estes compostos alteram a morfologia do *T. rubrum*.

O ácido cafeico e licochalcona reprimiram genes envolvidos na biossíntese de ergosterol, síntese de parede celular e os genes malato sintase e citrato sintase. Os dados de expressão gênica juntamente com a análise estatística destacaram repressão dos genes *Erg1* e *Erg6* após exposição ao ácido cafeico, que foi destacado na interação de *T. rubrum* com células HaCat e portanto que se configura como um potencial candidato à alvo de drogas.

Portanto, os resultados mostram o potencial antifúngico principalmente do ácido cafeico. Além disso, sugerem que o modo de ação de ácido cafeico esteja relacionado com ergosterol e parede celular, e ainda, interferindo no metabolismo energético através de atuação sobre o ciclo do glioxilato. Essa atuação em três diferentes alvos dificulta o surgimento do fenótipo de resistência .

## VII. REFERÊNCIAS

1. ACHTERMAN, R. R.; WHITE, T. C. A foot in the door for dermatophyte research. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 3, p.1-4, 2012.
2. ALMEIDA, E. R. **Plantas medicinais brasileiras, conhecimentos populares e científicos**. São Paulo: Hemus, 1993.
3. ANDERSEN, K. M., *et al.* Diversity and antifungal susceptibility of Norwegian *Candida glabrata* clinical isolates. **J Oral Microbiol**. v. 8. 2016.
4. BAEZA, L. C. *et al.* cDNA representational difference analysis used in the identification of genes expressed by *Trichophyton rubrum* during contact with keratin. **Microbes Infect**, v. 9, n. 12-13, p. 1415-1421, 2007.
5. BARRETO-BERGTER, E. *et al.* Fungal glycans and the innate immune recognition. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 4, 14 abr. 2014.
6. BARKER *et al.*, 2004
7. BITENCOURT, T. A. *et al.* Trans-chalcone and quercetin down-regulate fatty acid synthase gene expression and reduce ergosterol content in the human pathogenic dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **BMC Complement Altern Med**, v. 13, n. 229, p. 1-6, 17 set. 2013.
8. BOWMAN SM, FREE SJ. The structure and synthesis of the fungal cell wall. **Bioessays**. v.28, n.8, p.799-808, 2006.
9. BROCK, M., DARLEY, D., TEXTOR, S. and BUCKEL, W. 2-Methylisocitrate lyases from the bacterium *Escherichia coli* and the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*: characterization and comparison of both enzymes. **Eur J Biochem** 268(12): 3577-86.2001.
10. BROEDEL, S.E.J., ZHAO, X.J., CIHLAR, R.L. Fatty acid synthase as a target in the development of new antifungals. *Recent Res. Dev. Antimicrob. Agents Chemother.* v.1, p. 25–33, 1996.
11. BURDOCK, G. A. *et al.* Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food And Chemical Toxicology**, 1, v. 36, n. 4, p.347-363, abr. 1998.
12. BURMESTER, A. *et al.* Comparative and functional genomics provide insights into the pathogenicity of dermatophytic fungi. **Genome Biol**, v. 12, 2011.
13. CAMBUIM, I.I. *et al.* Clinical and mycological evaluation of onychomycosis among Brazilian HIV/AIDS patients. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 44, n. 1, p. 40-42, 2011.

14. CHEAH, H.; LIM, V.; SANDAI, D. Inhibitors of the Glyoxylate Cycle Enzyme ICL1 in *Candida albicans* for Potential Use as Antifungal Agents. **Plos One**, v. 9, n. 4, 29 abr. 2014.
15. CHEN, B. K.; FRIEDLANDER, S. F. Tinea capitis update: a continuing conflict with an old adversary. **Curr Opin Pediatr**, v. 13, n. 4, p. 331-335, 2001.
16. CHIACCHIO, N. *et al.* An observational and descriptive study of the epidemiology of and therapeutic approach to onychomycosis in dermatology offices in Brazil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 88, 2013.
17. CRUZ, A. H, *et al.* Phosphorylation is the major mechanism regulating isocitrate lyase activity in *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells. **The Febs Journal**. v. 278, p. 2318–2332, 2011.
18. CURSONS, J. *et al.* Regulation of ERK-MAPK signaling in human epidermis. **BMC Systems Biology**, v. 9, n. 41, 25 jul. 2015.
19. DA SILVA, B. C. *et al.* Dermatophytosis and immunovirological status of HIV-infected and AIDS patients from Sao Paulo city, Brazil. **Mycoses**, p. 1-6, 2014.
20. DA SILVA BARROS, M.E., DE ASSIS SANTOS, D., HAMDAN, J.S. Evaluation of susceptibility of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum* clinical isolates to antifungal drugs using a modified CLSI microdilution method (M38-A). **J Med Microbiol**. v.56, p.514-8. 2007.
21. DEBONO, M; GORDEE, R. S. Antibiotics that inhibit fungal cell wall development. **Annu Rev Microbiol**. v. 48, p. 471-97. 1994.
22. FACHIN, A. L. *et al.* Role of the ABC transporter *TruMDR2* in terbinafine, 4-nitroquinoline N-oxide and ethidium bromide susceptibility in *Trichophyton rubrum*. **J Med Microbiol**, v. 55, n. 8, p. 1093-1099, 2006.
23. FAVRE, B. AND. RYDER, N. S. ANTIMICROBIAL. Characterization of Squalene Epoxidase Activity from the Dermatophyte *Trichophyton rubrum* and Its Inhibition by Terbinafine and Other Antimycotic Agents. **Agents And Chemotherapy**, p. 443–447, v. 40, n. 2, 1996.
24. FLECK, C. B.; SCHÖBEL, F.; BROCK, M. Nutrient acquisition by pathogenic fungi: Nutrient availability, pathway regulation, and differences in substrate utilization. **International Journal Of Medical Microbiology**, v. 301, n. 5, p.400-407, jun. 2011.

25. FREE S. J. Fungal cell wall organization and biosynthesis. **Advances in Genetics**. v.81. 33-82. 2013.
26. FREIRES I. A. *et al.* Chemical composition and antifungal potential of Brazilian propolis against *Candida spp.* **J Mycol Med.** 2016.
27. GODOY-MARTINEZ *et al.* Onychomycosis in São Paulo, Brazil. **Mycopathologia**. v.168, n.3, pg111-116. 2008.
28. GUPTA D. e JAIN D.K. Chalcone derivatives as potential antifungal agents: Synthesis, and antifungal activity. **J Adv Technol Res.** v.6. p.114-117. 2015.
29. GRONE, A. Keratinocytes and cytokines. **Vet Immunol Immunopathol.** v.6. p.1-12. 2002.
30. GRUMBT, M.; MONOD, M.; STAIB, P. Genetic advances in dermatophytes. **FEMS Microbiol Lett**, v. 320, n. 2, p. 79-86, 2011.
31. HECTOR RF. - Compounds active against cell walls of medically important fungi. **Clin Microbiol Rev.** n.6, p.1-21. 1993.
32. HU, J., LIU, J. Licochalcone A Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Acute Kidney Injury by Inhibiting NF- $\kappa$ B Activation. **Inflammation**. 2015.
33. HUANG, X.Z. *et al.* Effect of Culture Supernatant Derived from *Trichophyton Rubrum* Grown in the Nail Medium on the Innate Immunity-related Molecules of HaCat. **Chin Med J.** v. 128, n.22, p.3094-100. 2015.
34. HUMAN, R. *et al.* A *Trichophyton Rubrum* Infection Model Based on the Reconstructed Human Epidermis - Episkin. **Chinese Medical Journal** v. 129, n. 1, p. 8–12, 2016.
35. IDNURM, A.; HOWLETT, B. J.. Isocitrate Lyase Is Essential for Pathogenicity of the Fungus *Leptosphaeria maculans* to Canola (*Brassica napus*). **Eukaryot Cell**, v. 1, n. 5, p.719-724, out. 2002.
36. JACOB T. R., N. T. A. PERES, G. F. PERSINOTI *et al.*, “Rpb2 is a reliable reference gene for quantitative gene expression analysis in the dermatophyte *Trichophyton rubrum*” **Medical Mycology**. vol. 50, no. 4, pp. 368–377, 2012.
37. JENNI, S. *et al.* Architecture of a fungal fatty acid synthase at 5 Å resolution. **Science**, v. 311, n. 5765, p.1263-1267, mar. 2006.

38. KOMOTO, T. T. *et al.* Gene Expression Response of *Trichophyton rubrum* during Coculture on Keratinocytes Exposed to Antifungal Agents. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, Ribeirão Preto, p.1-7, 2015.
39. LI, R. *et al.* The Natural Product Citral Can Cause Significant Damage to the Hyphal Cell Walls of *Magnaporthe grisea*. **Molecules**. p. 10279–10290, 2014
40. LORENZ, M. C.; FINK, G. R. The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. **Nature**, v. 412, n. 6842, p. 83-86, 2001.
41. MAIER, T. *et al.* Structure and function of eukaryotic fatty acid synthases. **Q Rev Biophys**, v. 43, n. 3, p. 373-422, 2010.
42. MARCIL A, GADOURY C, ASH J, ZHANG J, NANTEL A. Analysis of PRA1 and its relationship to *Candida albicans*- macrophage interactions. **Infect Immun** 76: 4345–4358, 2008.
43. MARQUES, S. A. *et al.* Mycoses associated with AIDS in the Third World. **Med Mycol**, v. 38, n. 1, p. 269-279, 2000.
44. MAURO, M. *et al.* Cobalt Oxide Nanoparticles: Behavior towards Intact and Impaired Human Skin and Keratinocytes Toxicity. **Int J Environ Res Public Health**., v. 12, n. 7, 17 jul. 2015.
45. MCKINNEY, J. D. *et al.* Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. **Nature**, v. 406, n. 6797, p.735-738, 17 ago. 2000.
46. MOLINA, D.A. Clinical, diagnostic and therapeutic aspects of dermatophytosis. **Enferm Infecc Microbiol Clin**. v.3. p. 33-9. 2011.
47. MONK, B. C.; CANNON, R. D. Genomic pathways to antifungal discovery. **Curr Drug Targets Infect Disord**, v. 2, n. 4, p. 309-329, 2002.
48. MOTAWI, T.K. *et al.* Could Caffeic Acid Phenethyl Ester Expand the Antitumor Effect of Tamoxifen in Breast Carcinoma?. **Nutr Cancer**, 1-11, 2016.
49. MUKHERJEE, P. K. *et al.* Clinical *Trichophyton rubrum* Strain Exhibiting Primary Resistance to terbinafine. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, p. 82-86. 2002.
50. NEGRI, M. *et al.* Early state research on antifungal natural products. **Molecules**, v. 3, n. 19, p.2925-2956, 07 mar. 2014.
51. NEWLAND, J.G; ABDEL-RAHMAN, S.M. Update on terbinafine with a focus on dermatophytoses. **Clin Cosmet Investig Dermatol**. v.2, p.49-63. 2009.
52. NOWAKOWSKA Z: A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. **Eur J Med Chem.**, 42(2):125–137. 2007.

53. OSBORNE, C. S. *et al.* Amino Acid Substitution in *Trichophyton rubrum* Squalene Epoxidase Associated with Resistance to Terbinafine. v. 49, n. 7, p. 2840–2844, 2005.
54. PARKS, L. W. *et al.* Physiological Implications of Sterol Biosynthesis in Yeast. **Annual Review Of Microbiology**, v. 49, p.95-116, 1995.
55. PERES, N. T. *et al.* Dermatophytes: host-pathogen interaction and antifungal resistance. **An Bras Dermatol**, v. 85, n. 5, p. 657-667, 2010.
56. PERSINOTI, G. F. *et al.* RNA-sequencing analysis of *Trichophyton rubrum* transcriptome in response to sublethal doses of acriflavine. **Bmc Genomics**, v. 5, n. 7, 27 out. 2014.
57. PIPPI B. *et al.* In vitro evaluation of the acquisition of resistance, antifungal activity and Synergism of Brazilian red propolis with antifungal drugs on *Candida spp.* **J Appl Microbiol.** v.4. p.839-50. 2015.
58. PLUEMSAMRAN, T.; ONKOKSOONG, T.; PANICH, U. Caffeic Acid and Ferulic Acid Inhibit UVA-Induced Matrix Metalloproteinase-1 through Regulation of Antioxidant Defense System in Keratinocyte HaCaT Cells. **Photochemistry And Photobiology.** p. 961–968, 2012.
59. PRASAD, R., RAWAL, M. K., SHAH, A.H. *Candida* Efflux ATPases and Antiporters in Clinical Drug Resistance. **Adv Exp Med Biol.** v.892, p.351-76. 2016.
60. PRASAD, R.; SHAH, A. H.; RAWAL, M. K. Antifungals : Mechanism of Action and Drug Resistance. **Advances in experimental medicine and biology.** p. 327–349, 2016.
61. REHDER, J. *et al.* Model of human epidermis reconstructed *in vitro* with keratinocytes and melanocytes on dead de-epidermized human dermis. **Med. J.**, São Paulo, v. 122, p.22-25, 2004.
62. RIZO, W. F. *et al.* Cytotoxicity and genotoxicity of coronaridine from *Tabernaemontana catharinensis* A.DC in a human laryngeal epithelial carcinoma cell line (Hep-2). **Genetics And Molecular Biology**, v. 36, n. 1, p.105-110, 2013.
63. ROSSI, A. Antifungal Resistance Mechanisms in Dermatophytes. **Journal of the American Podiatric Medical Association.** p. 369–383, 2008.

64. RUDE, T. H. *et al.* Relationship of the Glyoxylate Pathway to the Pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. **Infection And Immunity**, v. 70, n. 10, p.5684-5694, 1 out. 2002.
65. SAHU, N. K. *et al.* Exploring Pharmacological Significance of Chalcone Scaffold: A Review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, p.209-225, 2012.
66. SAMPAIO, S. A. P; RIVITTI, E. A. Dermatologia. In: SAMPAIO, S. A. P; RIVITTI, E. A. **Anatomia e Fisiologia**. 2. ed. São Paulo: Artes Médicas, Cap. 1. p. 22-35, 2001.
67. SANTIAGO, K. *et al.* Monocyte-Derived Dendritic Cells from Patients with Dermatophytosis Restrict the Growth of *Trichophyton rubrum* and Induce CD4-T Cell Activation. **Plos One**, v. 9, n. 11, 5 nov. 2014.
68. SCHECK, A. C *et al.* Anticancer activity of extracts derived from the mature roots of *Scutellaria baicalensis* on human malignant brain tumor cells. **Bmc Complementary and Alternative Medicine**, v. 6, n. 1, p.27. 2006.
69. SCHER, R. K. *et al.* The Epidemiology, Etiology, and Pathophysiology of Onychomycosis. **Seminars in cutaneous medicine and surgery**, n. 646, p. 9–11, 2013.
70. SHRESTHA, Sanjib K. *et al.* Antifungal amphiphilic aminoglycoside K20: bioactivities and mechanism of action. **Front Microbiol**, v. 5, 5 dez. 2014.
71. SILBERBERG, G. *et al.* The involvement of ErbB4 with schizophrenia: association and expression studies. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet**. v.141, p.142-8. 2006.
72. SILVA NETO, Benedito Rodrigues da *et al.* Transcriptional profile of *Paracoccidioides* spp. in response to itraconazole. **BMC Genomics**, v. 15, 1 abr. 2014.
73. SON, S.; LEWIS, B. A. Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: Structure-activity relationship. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 3, p. 468–472, 2002.
74. STURTEVANT, J. Translation elongation-3-like factors: are they rational antifungal targets? **Expert Opin Ther Targets**, v. 6, n. 5, p. 545-553, 2002.
75. TAYLAN, M. *et al.* The Protective Effects of Caffeic Acid Phenethyl Ester on Acetylsalicylic Acid-induced Lung Injury in Rats. **Journal of Investigative Surgery**, 1-7, 2016.
76. WANG, L. *et al.* Analysis of the dermatophyte *Trichophyton rubrum* expressed sequence tags. **BMC Genomics** v. 321, p. 1–13, 2006.

77. WANG, P., *et al.* Licochalcone C induces apoptosis via B-cell lymphoma 2 family proteins in T24 cells. **Molecular Medicine Reports**. 7623-8. 2015.
78. WHITE, T. C. *et al.* Generating and testing molecular hypotheses in the dermatophytes. **Eukaryot Cell**, v. 7, n. 8, p. 1238-1245, 2008.
79. WHITE, T. C. *et al.* Generating and testing molecular hypotheses in the dermatophytes. **Eukaryot Cell**, v. 7, n. 8, p. 1238-1245, 2008.
80. YANG, C. *et al.* Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) prevents transformation of human cells by arsenite (As) and suppresses growth of As-transformed cells. **Toxicology**, v. 213, n. 1-2, p. 81–96, 2005.
81. YANG, Y. *et al.* P38/NF- $\kappa$ B/Snail Pathway Is Involved in Caffeic Acid-Induced Inhibition of Cancer Stem Cells-Like Properties and Migratory Capacity in Malignant Human Keratinocyte. **Plos One**. v. 8, n.3. 2013
- YU, L., *et al.*, “Transcriptional profiles of the response to ketoconazole and amphotericin B in *Trichophyton rubrum*,” **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, vol. 51, n.1, p.144-153, 2007.
82. YU, L. *et al.* Transcriptional profiles of the response to ketoconazole and amphotericin B in *Trichophyton rubrum*. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 51, n. 1, p.144-153. 2006.
83. ZAITZ, C. Os caminhos da investigação de novos antifúngicos. **Anais brasileiros de dermatologia** v.67, n.4, 1992.
84. ZAUGG, C. *et al.* Gene Expression Profiling in the Human Pathogenic Dermatophyte *Trichophyton rubrum* during Growth on Proteins. **Eukaryotic Cell**. v. 8, n. 2, p. 241–250, 2009.
85. ZHAO J, *et al.* Cleavage factor II of *Saccharomyces cerevisiae* contains homologues to subunits of the mammalian Cleavage/ polyadenylation specificity factor and exhibits sequence-specific, ATP-dependent interaction with precursor RNA. **J Biol Chem** v.272, n.16, p.10831-10838, 1997.
86. ZHAO, X. *et al.* Requirement for the *Candida albicans* FAS2 gene for infection in a rat model of oropharyngeal candidiasis. **Microbiology**, v. 142, p.2509-2514, 1996.