

Universidade de Ribeirão Preto  
UNAERP  
Mestrado em Biotecnologia

YASMIM DANTAS CRIVELENTI

**Perfil de expressão gênica de *Trichophyton rubrum* exposto à glicoalcaloides de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil em meio de cultura contendo queratina e elastina**

Ribeirão Preto -SP  
2016

**Yasmim Dantas Crivelenti**

**Perfil de expressão gênica de *Trichophyton rubrum* exposto à glicoalcaloides de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil em meio de cultura contendo queratina e elastina**

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

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

**Co-orientador:** Prof. Dr. Mozart de Azevedo Marins

**Colaborador:** Prof. Dr. Geraldo Aleixo da Silva Passos Jr.

**Ribeirão Preto – SP**

**2016**

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

- Universidade de Ribeirão Preto -

C936p Crivelenti, Yasmim Dantas, 1993-  
Perfil de expressão gênica de *Trichophyton rubrum* exposto  
à glicoalcaloides de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil em meio de  
cultura contendo queratina e elastina / Yasmim Dantas Crivelenti.  
-- Ribeirão Preto, 2016.  
48 f.: il.  
Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Lúcia Fachin Saltoratto.  
Dissertação (mestrado) - Universidade de Ribeirão Preto,  
UNAERP, Biotecnologia. Ribeirão Preto, 2016.  
1. Biotecnologia. 2. Genética. 3. Fungos. I. Título.

**YASMIM DANTAS CRIVELENTI**

**PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DE *TRICHOPHYTON RUBRUM* EXPOSTO À  
GLICOALCALOIDES DE *SOLANUM LYCOCARPUM* A. ST. – HIL EM MEIO DE  
CULTURA CONTENDO QUERATINA E ELASTINA**

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: 25 de maio de 2016

Resultado: Aprovada

**BANCA EXAMINADORA**



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



Profa. Dra. Marcia Regina Von Zeska Kres  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP



Profa. Dra. Suzelci de Castro França  
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP

**RIBEIRÃO PRETO  
2016**

## AGRADECIMENTOS

- ♥ Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, por me fazer acreditar que sonhos podem tornar-se reais, basta acreditar e lutar com carinho e dedicação para alcançar nossos objetivos e por me fortalecer a cada obstáculo para que eu pudesse superar minhas próprias dificuldades e pode ser chegar até aqui com tamanha bagagem sendo eu mesma.
- ♥ Agradeço aos meus pais Alberto Crivelenti Neto e Juverlene Dantas do Nascimento Crivelenti por serem os meus maiores incentivadores e o meu alicerce, por educar, por ensinar, por cuidar e principalmente por estarem sempre ao meu lado! Amo vocês!
- ♥ Agradeço a Profa Dra Ana Lúcia Fachin Saltoratto pela acolhida desde a iniciação científica dando início à minha caminhada, pelos ensinamentos, pela confiança, pelo carinho, pela amizade e por tudo que pude aprender e amadurecer tanto pessoal quanto profissionalmente durante estes últimos cinco anos.
- ♥ Agradeço imensamente a Tamires Bitencourt desde os experimentos de domingos aos cafezinhos revigorantes, pelos ensinamentos, carinho, amizade, dedicação, mas principalmente pela aprendizagem de técnicas e pelas preciosas discussões levando ao rumo certo a seguir.
- ♥ Agradeço aos meus queridos amigos Bruna Cantelli, Thaís Mesquita e Vitor Caressatto por estarem comigo desde o início, desde a graduação e podermos juntos compartilhar momentos inesquecíveis de amizade verdadeira e de aprendizado. ‘A amizade verdadeira é um tesouro no céu’.
- ♥ Agradeço ao Matheus Eloy Franco por toda ajuda na análise de bioinformática.
- ♥ Agradeço de forma geral, à todos os integrantes do laboratório de Biociências, do departamento de Biotecnologia, pelos momentos que passamos juntos.
- ♥ Agradeço a minha amiga irmã Graciani Mara pela alegria contagiante, por sorrir, cantar, dançar e chorar, pela motivação e principalmente pelo grande incentivo. Tornando especial cada palavra, cada sentimento, pessoas que se importam com a nossa felicidade, ri e torce pela gente! São pessoas assim que fazem a diferença, são verdadeiras com elas mesmas e com os amigos, obrigada pelo entusiasmo e pela grande torcida irmã. Aproveito para agradecer todos os meus amigos pelas diversas formas de ajuda, e por simplesmente saber que sempre estariam ao meu lado e me apoiando.
- ♥ Agradeço a CAPES e a FAPESP pela bolsa e auxílio financeiro tornando possível a realização deste projeto de pesquisa.
- ♥ Agradeço à Profa Dra Suzelei de Castro França, ao Prof Dr Mozart Marins e à todos os docentes da Unidade de Biotecnologia da UNAERP pela oportunidade, pelo aprendizado e pelo precioso conhecimento que me foi proporcionado.
- ♥ Agradeço a base de tudo: minha família pela motivação e sempre torcerem por mim!!

## RESUMO

O dermatófito *Trichophyton rubrum* é o agente causador mais frequente de dermatomicoses superficiais no Brasil e no mundo. São adaptados a crescerem na unha, pele e cabelo, através da utilização das proteínas do hospedeiro. A complexa interação do fungo com o hospedeiro pode ser compreendida através da identificação de genes diferencialmente expressos em meio de cultura adicionado de queratina e elastina, que simulam a infecção da pele humana. Além disso, apesar da importância das micoses, somente um número limitado de drogas antifúngicas está disponível atualmente no mercado devido à falta de alvos adequados, pois alguns são também muito tóxicos para humanos. Produtos naturais de origem vegetal podem conduzir ao descobrimento de novos agentes antimicrobianos, com possíveis novos mecanismos de ação. Glicoalcaloides de *Solanum lycocarpum* (conhecida popularmente como “fruta do lobo”) como a solamargina e solasonina apresentam relatos de atividade antifúngica devido ao bloqueio da germinação, crescimento, aumento da espessura das hifas e inibição quase total da esporulação. O objetivo do presente trabalho foi analisar o transcriptoma do dermatófito *T. rubrum* cultivado em meio de cultura contendo queratina e elastina adicionada de solamargina de *S. lycocarpum* por 30 min e 6 h. Através da análise dos dados de *microarray* foi observada a modulação de genes envolvidos na síntese de ergosterol, que podem estar relacionados ao mecanismo de ação antifúngico da solamargina contra *T. rubrum*. Nesse sentido, pode-se ressaltar a repressão do gene ERG1 em meio com queratina e elastina na presença de solamargina. Esse gene codifica a enzima esqualeno epoxidase, uma enzima chave da biosíntese de ergosterol, que é um componente vital para a membrana plasmática da célula fúngica. Além deste, destaca-se a modulação de genes que codificam proteínas de Heat Shock (Hsp) que respondem a condições de estresse e facilitam a sobrevivência do fungo sobre diversos desafios. A partir da análise dos dados foram escolhidos genes envolvidos com patogenicidade e resposta à drogas, afim de validar os dados de *microarray* por PCR quantitativo. Podemos destacar, a repressão dos genes codificadores da Hsp90 e de uma de suas co-chaperonas, a Cdc37, na presença de solamargina, que podem ser alvos atraentes para estudo de novos antifúngicos, por estarem envolvidos com a adaptação do fungo em condições adversas.

**Palavras-chave:** *Trichophyton rubrum*, *Solanum*, Hsp90, antifúngico, solamargina

## ABSTRACT

The dermatophyte *Trichophyton rubrum* is the most frequent cause of dermatomycoses in Brazil and the worldwide. They are adapted to grow in nail, hair and skin through the use of host proteins. The complex interaction of fungus with the host can be understood by identifying different genes expressed when used medium culture with keratin and elastin, which simulate infection in human skin. But despite the importance of mycoses, only few antifungal drugs are available on the market due to the absence of suitable targets and because some have side effects. Natural products may lead to discovery new antimicrobial agents and new mechanisms of action. Glycoalkaloids from *Solanum lycocarpum* (popularly known as "Wolf fruit") such as solamargine and solasonine, showed antifungal activity due to the germination blockage, inhibition of growth, development of hyphae and sporulation. Thus, the aim of this study was analyzed the transcriptome of the dermatophyte *Trichophyton rubrum* grown in culture medium with keratin and elastin containing solamargine from *S. lycocarpum* during 30 minute and 6 hours. Analyzing the microarray data was observed modulation of genes involved in the synthesis of ergosterol, which may be related to mechanism of action of solamargine against *T. rubrum*. Because of this, it was possible to highlight the repression of gene *ERG1* in medium culture with keratin and elastin in the presence of solamargine. This gene encodes the squalene epoxidase, a important enzyme of the biosynthesis of ergosterol, which is a vital component of the cell fungal. In addition, there is a modulation of genes that encode heat shock proteins (Hsp) which respond to conditions of stress and permit the survival of fungus under various challenges. Based on analysis of data genes involved in pathogenicity and response to the drugs were chosen, in order to validate the microarray data by quantitative PCR. It was noticed the repression of genes encoding Hsp90 and its co-chaperones Cdc37 in the solamargine presence, which may be attractive targets for study of new antifungals, because it is involved with adaptation of the fungus in adverse conditions.

**Keywords:** *Trichophyton rubrum*, *Solanum*, Hsp90, antifungal, solamargine

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Frutos, flores e folhas de <i>S. lycocarpum</i> .....	3
<b>Figura 2:</b> Estrutura química da solasodina e dos glicoalcaloides solamargina e solasonina .....	4
<b>Figura 3:</b> Estruturas da Hsp90 na conformação aberta de <i>E.coli</i> e em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> na conformação fechada.....	9
<b>Figura 4:</b> Categorização de genes modulados em meio mínimo com queratina e elastina (A) reprimidos (B) induzidos .....	28
<b>Figura 5:</b> Diagramas de Venn, mostrando o número de genes modulados durante o crescimento de <i>T. rubrum</i> em meio mínimo com queratina e elastina na presença de solamargina por 30 minutos e 6 horas .....	30
<b>Figura 6:</b> Principais categorias funcionais de genes comumente modulados após exposição à solamargina por 30 minutos e 6 horas .....	31
<b>Figura 7:</b> Categorização de genes modulados em resposta à solamargina nos diferentes tempos estudados (A) 30 minutos (B) 6 horas .....	33
<b>Figura 8:</b> Real time RT PCR dos principais genes de <i>T. rubrum</i> modulados no experimento de <i>microarray</i> durante o crescimento em meio contendo elastina e queratina na presença de solamargina durante 30 minutos em comparação com o controle .....	36
<b>Figura 9:</b> Biossíntese do Ergosterol .....	40
<b>Figura 10:</b> Modulação de genes selecionados a partir da hibridização do <i>microarray</i> em Tempo Real de RT-PCR expressos em <i>Trichophyton rubrum</i> na presença de solamargina durante 6 horas em comparação com o controle.....	41

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Principais Famílias de Chaperonas Moleculares .....	8
<b>Tabela 2:</b> Componentes e respectivos volumes para a reação de síntese de cDNA.....	18
<b>Tabela 3:</b> Componentes da reação de Transcrição .....	19
<b>Tabela 4:</b> Reagentes de Fragmentação para lâminas de microarranjo .....	21
<b>Tabela 5:</b> Primers usados para qPCR .....	24
<b>Tabela 6:</b> Avaliação da atividade antifúngica (CIM) dos glicoalcaloides.....	26
<b>Tabela 7:</b> Avaliação da atividade citotóxica dos glicoalcaloides em linhagem celular de queratinócitos humanos HaCaT .....	27
<b>Tabela 8:</b> Nota de integridade do RNA das condições estudadas .....	27
<b>Tabela 9:</b> Principais genes modulados relacionados à virulência e resposta a drogas dos dados de <i>microarray</i> .....	35
<b>Tabela 10:</b> Modulação de Proteínas de Heat Shock (HSP) do <i>microarray</i> de <i>T. rubrum</i> na presença de solamargina .....	38

## ABREVIACOES

ADP: Adenosina difosfato

Aha1: *Activator of heat shock 90kDa protein ATPase homolog 1*

ATP: adenosina trifosfato

CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures

Cdc37: *Cycle division cell 37*

cDNA: fita de DNA complementar

CIM: Concentração Inibitória Mínima

cRNA: RNA complementar

CTP: trifosfato de citidina

Cy3: cianina

DEPC: dietilpirocarbonato

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: cido Desoxirribonucleico

dNTP: nucleotídeos trifosfato

DTT: ditioneitol

g: gramas

h: horas

Hip: *Huntingtin Interacting Protein* (proteína de interação com a huntingtina)

Hop: *Hsp70/Hsp90 Organizing Protein* (proteína organizadora da Hsp70/Hsp90)

Hsp40: Heat Shock Protein de 40kDa

Hsp60: Heat Shock Protein de 60kDa

Hsp70: Heat Shock Protein de 70kDa

Hsp90: Heat Shock Protein de 90kDa

IC<sub>50</sub>: Concentração Inibitria de 50%

Mep: metaloproteinase

min: minutos

MM: meio de cultura mínimo com glicose e nitrato

MTT: *Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*

Ncbi: *National Center for Biology Information*

Nm: nanmetros

C: graus Celsius

q.s.p.: quantidade suficiente para

QE 30 min: meio de cultura mínimo com queratina e elastina em 30 minutos de solamargina

QE 6 h: meio de cultura mínimo com queratina e elastina em 6 horas de solamargina

QE: meio de cultura mínimo com queratina e elastina

qPCR: Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa ("*Real Time*")

RIN: *RNA Integrity Number*

RIP: *Receptor-Interacting Protein*

RNA: cido Ribonucleico

rpm: rotação por minuto

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*

seg: segundos

SM: Solamargina

SS: Solasonina

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1. <i>Trichophyton rubrum</i> .....	1
1.2. Produtos naturais com atividade antifúngica.....	2
1.3. Glicoalcaloides de <i>S. lycocarpum</i> .....	2
1.4. Atividade antifúngica dos alcaloides de espécies do gênero <i>Solanum</i> .....	5
1.5. Mecanismo de ação antifúngico dos glicoalcaloides.....	5
1.6. Abordagens moleculares para avaliar a expressão de genes de <i>T. rubrum</i> em condições de cultivo <i>in vitro</i> que mimetizam as infecções na pele .....	6
1.7. Proteínas de Heat Shock (Hsp).....	8
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>11</b>
2.1. Objetivo Geral .....	11
2.2. Objetivos específicos:.....	11
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS:</b> .....	<b>11</b>
3.1. Linhagem de <i>T. rubrum</i> .....	11
3.2. Produtos Naturais e Comerciais Utilizados .....	11
3.3. Meios de cultura e soluções.....	12
3.4. Ensaio de sensibilidade do fungo.....	14
3.5. Cultura de linhagem de queratinócitos humanos.....	14
3.6. Ensaio com MTT .....	14
3.7. Avaliação do transcriptoma de <i>T. rubrum</i> cultivado na presença do glicoalcaloide em condições de cultivo que simulam a pele humana.....	15
3.8. Escolha dos ESTs de <i>T. rubrum</i> depositados do banco de dados NCBI, TrED para deposição em lâminas de <i>microarray</i> .....	17
3.8.1. CUSTOMIZAÇÃO DAS LÂMINAS .....	17
3.9. Marcação das amostras de RNA, hibridação, aquisição de imagens e análise dos dados.....	17
3.9.1 MARCAÇÃO DAS SONDAS .....	17
3.9.2 LAVAGEM DAS LÂMINAS .....	22
3.10. Aquisição das imagens .....	22
3.11. Análise estatística dos dados do <i>microarray</i> de <i>Trichophyton rubrum</i> nas diferentes condições de cultivo.....	22
3.12. Anotação funcional dos genes modulados .....	23
3.13. Categorização dos genes diferencialmente expressos .....	23
3.14. Validação dos dados de <i>microarray</i> por PCR quantitativo .....	23
3.14.1. Desenho e padronização de <i>primers</i> para validação dos dados de <i>microarray</i> .....	24
3.15. PCR Quantitativo.....	25
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>25</b>
4.1. Ensaio de sensibilidade do fungo.....	25
4.2. Atividade citotóxica.....	26
4.3. Análise da qualidade do RNA .....	27
4.4. Análise do transcriptoma de <i>T. rubrum</i> .....	28
4.5. Validação de dados do <i>microarray</i> por qPCR.....	36
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	<b>42</b>
<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>43</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. *Trichophyton rubrum*

Os dermatófitos são responsáveis por causarem infecções cutâneas e raramente profundas. Afetando tecidos queratinizados como a pele, cabelos e unhas, isso se dá devido à sua capacidade de secretar enzimas que podem degradar queratina tanto humana quanto animal (Vishnu *et al.*, 2015). Este organismo, normalmente provoca micoses superficiais bem caracterizadas, mas também podem acometer tecidos mais internos, principalmente em pacientes imunocomprometidos (Zhang *et al.*, 2009; Borgers, Degreef e Cauwenbergh, 2005).

As dermatofitoses pertencem às doenças infecciosas fúngicas mais comuns em humanos, afetando 10-20% da população mundial. As infecções provocadas por *T. rubrum* são geralmente de difícil tratamento e casos de reincidência ocorrem frequentemente após a interrupção da terapia (Haneke, 1991).

As infecções fúngicas geralmente são de difíceis tratamentos, devido à seleção de linhagens resistentes durante os tratamentos usuais, pois existe um número limitado de drogas antifúngicas disponíveis para uso clínico quando comparado com o arsenal de fármacos antibacterianos (Baddley e Moser, 2004; Projan e Youngman, 2002). Nos EUA, essa problemática provoca um impacto econômico e no sistema de saúde público em aproximadamente 400 milhões de dólares por ano para o tratamento dessas infecções (Drake *et al.*, 1996; White *et al.*, 2008).

Estima-se que 30 a 70% dos adultos são hospedeiros assintomáticos destes agentes patogênicos e que a incidência da doença aumenta com a idade. Alguns fatores de risco têm sido associados a essas onicomicoses, como idade, alterações na morfologia das unhas, fatores genéticos, condições precárias de higiene, *diabetes mellitus*, imunodeficiência (Seebacher, Bouchara e Mignon, 2008). Estudos epidemiológicos demonstraram que a ocorrência de dermatófitos é de 18,2% em estudantes universitários de São Paulo (Brasil). Nesse trabalho, demonstraram que os principais agentes causadores de dermatofitoses são *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*, sendo eles isolados em 80% e 20% dos casos respectivamente (Siqueira *et al.*, 2006).

Apesar da proeminência das dermatofitoses e de suas consequências sócio-econômicas, a biologia destes organismos não é bem estabelecida (White *et al.*, 2008).

Recentemente, as sequências do genoma de 8 espécies de dermatófitos com nichos ecológicos distintos já foram disponibilizadas com anotação ([http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/dermatophyte\\_comparative/GenomesI](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/dermatophyte_comparative/GenomesI)

ndex.html). A disponibilidade da informação das sequências permite aos pesquisadores desenvolver hipóteses de como os dermatófitos se desenvolvem assim como identificar as diferenças dentre as espécies dos diferentes nichos ambientais. Além disso, aliado às ferramentas de bioinformática, as técnicas de genética, microbiologia e biologia molecular são essenciais para os estudos sobre virulência, resistência e evolução dos dermatófitos (Achterman *et al.*, 2011).

A prevalência das infecções provocadas por *T. rubrum* e sua natureza antropofílica, faz com que ele se torne um bom modelo para o estudo de fungos filamentosos patogênicos humanos. Com isso, o projeto genoma de *T. rubrum* auxilia em diversos estudos sobre taxonomia, epidemiologia e processos metabólicos gerais, propiciando melhores condições para o desenvolvimento de terapias mais eficientes.

## 1.2. Produtos naturais com atividade antifúngica

Produtos naturais têm contribuído significativamente na área da saúde desde os tempos antigos, eles foram amplamente utilizados na medicina popular para o tratamento de várias doenças. A eficácia terapêutica dos antifúngicos convencionais pode ser limitada devido aos efeitos secundários dos antifúngicos e o desenvolvimento de resistência do patógeno através da não-adesão do paciente ao tratamento ou interrupção, por causa do custo da medicação, interações medicamentosas e efeitos secundários (reações adversas).

Sabe-se que os antifúngicos têm um número limitado de alvos celulares, devido a sua semelhança com as células humanas. Por isso, busca-se alvos específicos de células fúngicas como o ergosterol, a síntese da parede celular e a formação de microtúbulos.

Os estudos sobre compostos com potencial de ação antifúngica são importantes, não só para os tratamentos de dermatofitoses, mas também para conduzir à descoberta de novos alvos celulares para o tratamento de infecções.

## 1.3. Glicoalcaloides de *S. lycocarpum*

A espécie vegetal *Solanum lycocarpum* Auguste Saint-Hilarie (**Figura 1**) é uma planta típica do cerrado brasileiro possuindo uma ampla distribuição geográfica. É popularmente conhecida como “lobeira” ou “fruta-do-lobo”. Seu nome popular se deve ao fato dos seus frutos representarem até 50% da dieta alimentar do Lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*), acredita-se que este fruto tenha potencial de ação terapêutica

contra o verme-gigante-dos-rins muito frequente e geralmente fatal no lobo (Oliveira *et al.*, 2003). Foi inicialmente utilizada pelos índios Xavantes brasileiros como agente hipoglicemiante. Além disso, seus frutos são empregados na medicina popular no tratamento da obesidade, diabetes e na diminuição dos níveis de colesterol (Schwarz *et al.*, 2005).

**Figura 1:** Frutos, flores e folhas de *S. lycocarpum*



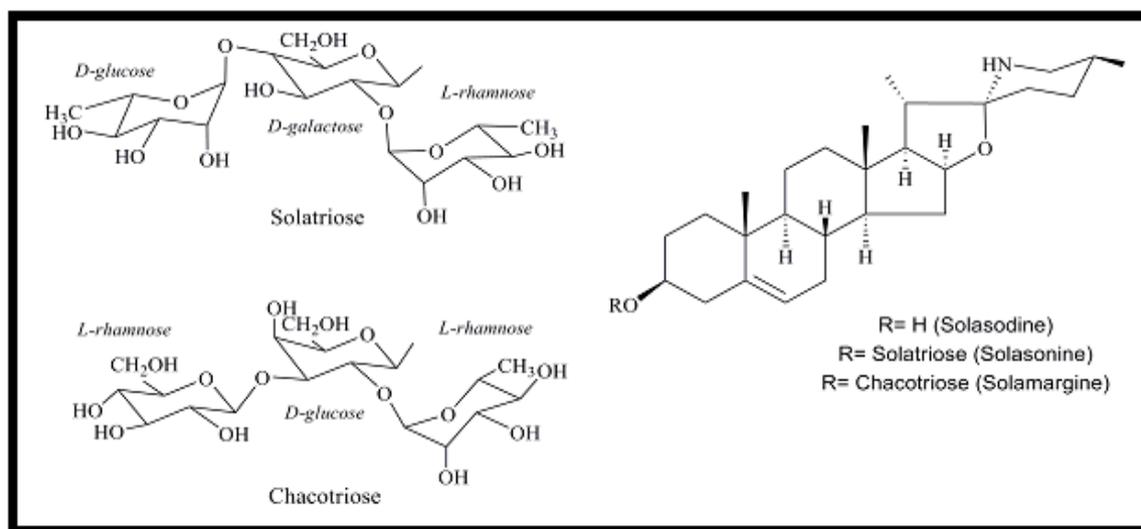
Os metabólitos secundários solamargina (SM) e solasonina (SS) são heterosídeos alcaloídicos (Glicoalcalóides) majoritariamente produzidos pelo fruto da espécie *S. lycocarpum*, sendo que aglicona destes compostos é a solasodina (SD) (**Figura 2**) (Blankemeyer *et al.*, 1998; Schwarz *et al.*, 2007; Soares-Mota *et al.*, 2010).

Estruturalmente SM e SS apresentam em comum o núcleo esteroidal SD, que possui 27 carbonos e nitrogênio no anel F, geralmente apresenta ligações heterosídicas na hidroxila do carbono 3, bem como duplas ligações entre os carbonos 5 e 6 (SIMÕES *et al.*, 2001). A partir de diferenças estruturais observadas, foram divididos em 5 tipos: solanidinas, espirosolanos, solacongestidinas, solanocapsinas e jurbidinas. Nas plantas, cadeias de carboidratos geralmente encontram-se ligados à estrutura dos alcalóides, dando origem aos glicoalcaloides. É possível que a união de carboidratos aos alcaloides ocorra por conjugação glicurônica, catalisada pelas enzimas glicuroniltransferases (Schwarz *et al.*, 2005).

Dessa maneira, esses compostos diferenciam-se apenas pelos grupamentos de açúcares ligados ao seu núcleo esteroidal SD, sendo que a triose do composto SM é

denominada chacotriose, a qual é constituída por duas unidades de ramnose ligadas aos carbonos 2' e 4' da glicose. Já a triose do composto SS é conhecida como solatriose, sendo composta por unidades de ramnose e glicose ligadas nas posições 2' e 3' da galactose, respectivamente (Blankemeyer *et al.*, 1998; Fewell, Roddick e Weissenbergt, 1994).

**Figura 2:** Estrutura química da solasodina e dos glicoalcaloides solamargina e solasonina



**Fonte:** (Abreu Miranda *et al.*, 2013)

A biossíntese de glicoalcaloides esteroidais, como a solamargina e solasonina, possivelmente ocorre por reações de conjugação, no interior das plantas. Estudo realizado com extratos proteicos obtidos de folhas da *Solanum melongena* (Paszkowski, Clarke e Hornstein, 2002), por exemplo, demonstrou que as enzimas UDP-glicuronil transferases presentes nestes extratos catalisam eficientemente a glicosilação da solasodina. O produto obtido desta reação, identificado como 3-B-D-monoglicosídeo de solasodina, provavelmente é um produto intermediário na biossíntese de solamargina. Muitos fosfolípidos, naturalmente encontrados nas folhas e frutos da *S. melongena*, podem interferir na atividade da UDPglicuronil transferase. Esta ação pode ser importante na regulação *in vivo* da biossíntese de glicoalcaloides para plantas do gênero *Solanum*, como a *S lycocarpum*. Paszkowski, Clarke e Hornstein, 2002 sugerem ainda a possibilidade da glicosilação de alcaloides esteroidais serem catalisada por uma única enzima, cuja especificidade e ação mostram-se dependente da estrutura e quantidade de fosfolípidos presentes na planta, não se tratando, portanto, de uma propriedade estática da enzima (Schwarz *et al.*, 2005).

#### **1.4. Atividade antifúngica dos alcaloides de espécies do gênero *Solanum***

Pesquisas voltadas para o estudo das plantas medicinais estão sendo estimuladas devido ao grande interesse científico, principalmente da indústria farmacêutica, de criar novas drogas com atividade antifúngica e antibacteriana.

Dados na literatura têm confirmado o potencial antifúngico dos compostos SM e SS, demonstrando que tais compostos inibem o desenvolvimento do micélio nos fungos *Phoma medicaginis* e *Rhizoctonia solani* (Fewell, Roddick e Weissenbergt, 1994).

Além disso, esses compostos inibem o crescimento de leveduras *Candida albicans* e *C. parapsilosis* e fungos filamentosos como *Microsporium canis*, *M. gypseum*, *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*, demonstrando-se muito eficientes contra fungos patogênicos humanos (Francisco *et al.*, 2011).

Outros compostos glicoalcaloides presentes em espécies de *Solanaceas* como: solanina, chaconina, solamargina, solasonina e a tomatina, também demonstraram atividade antifúngica promissora quanto à fitopatógenos como fungo *Cercospora brassicae* e *Alternaria porri* sendo a tomatina a com maior atividade antifúngica para o microrganismo *C. brassicae* e *A. Porri*. Além do mais, uma mistura dos glicoalcaloides (solanina e chaconina) apresentou atividade sinérgica antifúngica significativa. A ação sinérgica entre solamargina e chaconina, solasonina e solanina presentes em *S. nigrum*, causa uma adição na inibição dos fungos (Xue-song *et al.*, 2009).

Porém, não há estudos mais aprofundados sobre o potencial antifúngico dos glicoalcaloides presentes na espécie *S. lycocarpum* contra o fungo *T. rubrum*, assim sendo de grande importância do ponto de vista clínico.

#### **1.5. Mecanismo de ação antifúngico dos glicoalcaloides**

Em geral, sabe-se que o potencial farmacológico dos glicoalcaloides depende da interação específica entre glicoalcaloide-esterol, provocando alterações de permeabilidade celular, perda da integridade da membrana e consequentemente provocando a morte celular (Cipollini e Levey, 1997; Punjabi *et al.*, 2008).

Porém essas alterações foram demonstradas com maior evidência em célula animal, ou seja, o glicoalcaloide interage com o colesterol da membrana plasmática, levando a perda da integridade da membrana celular, sendo a porção de açúcar dos glicoalcaloides de vital importância para o efeito de ruptura da membrana (Keukens *et al.*, 1992, 1995).

Em relação à atividade antifúngica dos compostos, o contínuo aparecimento de diferentes patógenos resistentes aos fármacos disponíveis no mercado faz com que a eficácia dos tratamentos utilizados em vários tipos de infecções fúngicas seja limitada. Neste sentido, há um aumento no interesse de pesquisas por novas moléculas vegetais com atividades antimicrobianas.

Glicoalcaloides têm sido reportados como antifúngicos devido à inibição da germinação, extensão e espessura das hifas bem como distorção das mesmas e inibição quase total da esporulação. Experimentos prévios realizados em nosso laboratório, mostraram que os glicoalcaloides de *S. lycocarpum* como a solamargina e solasonina apresentaram pronunciada atividade antifúngica, baixa citotoxicidade para células de queratinócitos e reduziram o conteúdo de ergosterol, que é um alvo específico para a célula fúngica. Dessa forma, no presente trabalho, avaliamos o perfil de expressão de *T. rubrum* na presença de glicoalcaloides em condições de cultivo que simulam a pele humana para descobrir novas perspectivas no estudo do mecanismo de ação de inibidores de origem natural para a procura de novos alvos antifúngicos.

#### **1.6. 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 micro-organismos. Entretanto, tais metodologias têm sido raramente utilizadas em dermatófitos, em contraste com outros organismos patogênicos de interesse clínico como *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* ou *Cryptococcus neoformans*. Conseqüentemente, pequeno é o conhecimento da patogenicidade dos dermatófitos em nível molecular (Grumbt, Monod e 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 a utilização do meio de cultura mínimo acrescido de queratina e elastina, além do co-cultivo de conídios em cultura de queratinócitos.

Aliado aos modelos de infecção, grande avanço foi obtido com a construção de um banco de dados de *Trichophyton* (TrED), que compila dados sobre família de genes de metalopeptidases, serina peptidases, cisteína peptidases, e peptidases aspárticas (Yang *et*

*al.*, 2007). Este conjunto de genes já tem sido descrito como importante fator de crescimento do fungo em queratinócitos (Jousson *et al.*, 2004).

Baeza *et al.* 2007 utilizaram a estratégia de biblioteca subtrativa para identificar genes diferencialmente expressos em *T. rubrum* através de uma série rápida de hibridação subtrativa de cDNA preparado a partir de RNA extraído de duas populações celulares, do fungo cultivado em meio mínimo de cultura na presença de queratina comparado com outra do fungo cultivado em meio mínimo. Vários genes relacionados à transdução de sinal, proteína de membrana, resposta a estresse oxidativo e alguns fatores de virulência putativos foram induzidos na presença da queratina. Além disso, estes mesmos autores infectaram uma cultura celular de queratinócitos isolados de mama humana com conídios de *T. rubrum* e observaram o padrão de expressão de genes por PCR quantitativo.

Abordagens similares também foram utilizadas para análise de bibliotecas subtrativas aplicadas na identificação de novos genes especificamente expressos em *T. rubrum* em contato com queratina, em resposta a variação de pH ou estímulo ambiental simulando a infecção na pele (Kaufman *et al.*, 2005; Maranhão, Paião e Martinez-Rossi, 2007; Maranhão *et al.*, 2009; Peres *et al.*, 2010; Silveira *et al.*, 2010). López-García, Lee e Gallo, 2006 caracterizaram a função do catelicidina LL-37 em infecções de pele tais como dermatofitoses e *tinea versicolor*. Para o estudo estes autores infectaram uma cultura de queratinócitos NHK com conídios de *T. rubrum* e avaliaram a expressão gênica por qPCR e determinaram o CIM da catelicidina purificada. Os resultados demonstraram que o CIM foi de 12,5 µM de catelicidina e que o mRNA que codifica a catelicidina foi induzido em culturas de queratinócitos infectados por *T. rubrum*. As catelicidinas são peptídeos antimicrobianos produzidos pela pele humana como forma de defesa contra a infecção.

Chen *et al.* 2010 utilizou queratina de unha e do extrato córneo de pele humana como meio de crescimento para investigar os diferentes padrões de expressão de genes que codificam endoproteases de *T. rubrum*. Durante o crescimento na queratina de unha e pele os genes SUB7 e MEP2 foram altamente expressos o que indica que estes genes podem ser dominantes durante a infecção do hospedeiro e as outras proteases podem ter uma função suplementar. Os genes MEP2, SUB5, SUB2 e SUB3 foram mais expressos durante o crescimento no meio com pele enquanto os genes SUB1, SUB4, e MEP4 foram mais específicos para o meio com queratina de unha.

### 1.7. Proteínas de Heat Shock (Hsp)

As proteínas de Heat Shock constituem uma família de muitas proteínas diferentes com funções semelhantes. Elas usam energia da hidrólise de ATP para desenovelar proteínas, prevenir a agregação e enovelamento incorreto. O enovelamento proteico é essencial para a correta função biológica das proteínas. Falhas nesse processo podem levar à formação de proteínas mal enoveladas e/ou agregados proteicos. Para evitar esse problema, a célula expressa uma família de proteínas conservadas denominadas Heat Shock ou chaperonas moleculares, pois além de auxiliar no enovelamento proteico podem conduzir a proteína para degradação, caso não seja possível atingir a configuração correta (Fink, 1999).

As Hsps podem ser classificadas em cinco famílias dependendo do peso molecular (**Tabela 1**) (Li, Soroka e Buchner, 2011). Entretanto, as Hsp60, Hsp70 e Hsp90, que apresentam maior peso molecular, dependem de ATP para o seu correto funcionamento, assim como de co-chaperonas para a sua modelagem conformacional. Diferentemente das proteínas denominadas small Heat Shock proteins (sHsp), que são independentes da energia do ATP (Parcellier *et al.*, 2003).

A família das Hsp90 são chaperonas importantes por auxiliarem no enovelamento proteico e prevenir a agregação de proteínas. Ela é regulada por diversas outras co-chaperonas como a Cdc37 e p23 (Lepvrier *et al.*, 2015; Ni e Odunuga, 2015).

**Tabela 1:** Principais Famílias de Chaperonas Moleculares

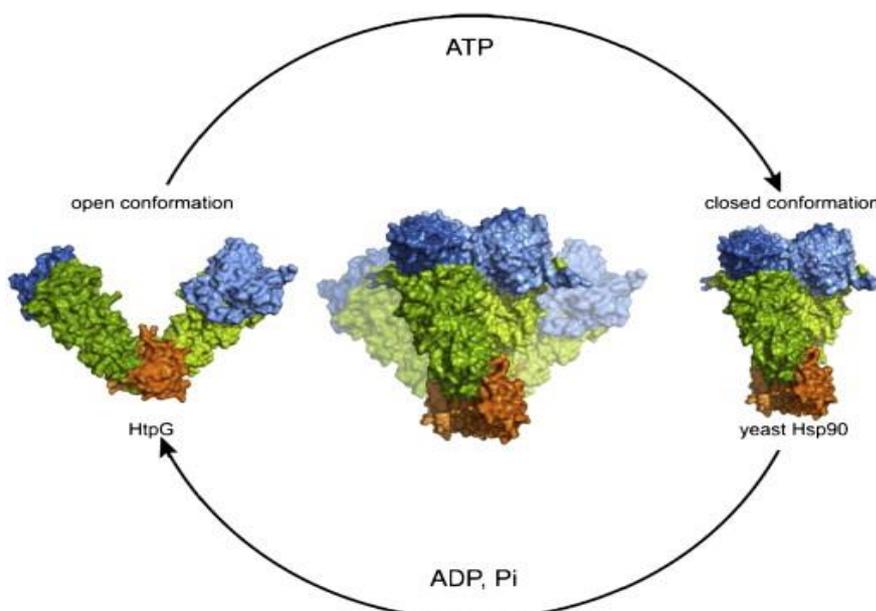
Chaperona	Co-chaperonas e Co-fatores	Peso Molecular (kDa)	Função
Hsp100		~100	Atividade ATPásica e recuperação de proteínas agregadas
Hsp90	HIP, HOP, p23, Hsp70, Cdc37	~90	Previne agregação proteica, interage com diversas proteínas
Hsp70	Hsp40	~70	Atividade ATPásica, envolvida em enovelamento e transporte entre membranas
Hsp60	Hsp10	~60	Atividade ATPásica e auxilia no enovelamento
sHsp		~15-30	ATP-independente e envolvida com termotolerância

**Fonte:** ( Modificado de Borges e Ramos, 2005)

Entre as várias famílias de chaperonas, a Hsp90 é essencial para o crescimento de células eucariontes e são descritas como uma ferramenta especializada necessária para o enovelamento proteico. Estas são capazes de interagir com proteínas não-enoveladas mantendo-as em um estado re-enovelável conservando a sua conformação, estabilidade e função de um vasto número de proteínas (Wandinger, Richter e Buchner, 2008). Além disso, ela está envolvida nos processos de transcrição celular, ciclo celular e apoptose (Taipale, Jarosz e Lindquist, 2010).

A Hsp90 possui dois estágios conformacionais distintos, representados na **figura 3**, a conformação aberta e a conformação fechada, compostas de três sítios de ligação: um N-domínio de ligação a ATP, um M-domínio que serve como um local de interação para ambas proteínas-cliente e algumas co-chaperonas, e um C-domínio dinâmico de dimerização (Ratzke *et al.*, 2010; Wandinger, Richter e Buchner, 2008). Na ausência do ATP a Hsp90 adota uma conformação aberta, onde o N-domínio não se encontra dimerizado. Contudo, uma vez que ocorre a ligação do ATP no N-domínio, a Hsp90 assume uma conformação fechada. Após a hidrólise do ATP, e a consequente liberação de ADP e fosfato orgânico, a Hsp90 volta a sua conformação aberta. De fato que a hidrólise do ATP tem influência na estrutura desta chaperona (Röhl, Rohrberg e Buchner, 2013).

**Figura 3:** Estruturas da Hsp90 na conformação aberta de *E. coli* e em *Saccharomyces cerevisiae* na conformação fechada. O domínio N representado em azul, o domínio M em verde e o domínio C em laranja



**Fonte:** (Li, Soroka e Buchner, 2011)

A Hsp90 liga-se a mais de 300 proteínas, para isso ela conta com o auxílio de diversas co-chaperonas através de diferentes ligações. O fato de conseguir interagir com múltiplas proteínas se deve ao fato da Hsp90 possuir vários estados conformacionais. Esta variação conformacional está relacionada à atividade ATPásica dessa proteína. As ATPases são enzimas que estimulam a degradação de ATP em ADP, a fim de conduzir reações químicas que talvez não ocorreriam naturalmente (Ali *et al.*, 2006; Röhl, Rohrberg e Buchner, 2013).

Cordeiro *et al.*, 2016 investigou o efeito farmacológico da inibição de Hsp90 pelo composto Radicol em *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. A inibição da Hsp90 aumentou a atividade antifúngica de azoles contra o desenvolvimento de *Cryptococcus gattii*. Além disso, também comprometeu a permeabilidade da membrana celular e o crescimento de *Cryptococcus spp.* Consequentemente, estes resultados indicam que as Hsp90 estão envolvidas na manutenção da homeostase celular em diferentes fungos patogênicos, exercendo um papel importante no processo infeccioso. Dessa forma, a inibição da atividade da Hsp90 pode ser uma estratégia importante no desenvolvimento de novas drogas antifúngicas.

As co-chaperonas Cdc37, p23, Aha1, HOP entre outras, permitem que as Hsp90 se associem com um número significativo de proteínas-cliente incluindo receptores esteróides, quinases e proteína de interação como o receptor RIP que sem as Hsp90 seriam degradadas. As proteínas-cliente são aquelas que se ligam e sofrem interferência (reparo) da Hsp90 em sua conformação estrutural, possibilitando a correta função biológica da proteína (Nathan e Lindquist, 1995; Sato, Fujita e Tsuruo, 2000; Lewis *et al.*, 2000).

A co-chaperona Cdc37, destaca-se por auxiliar a Hsp90 que supostamente é regulada por fosforilação. Assim, centenas de proteínas quinases dependem da interação Cdc37/Hsp90. Esta interação resulta na estabilização para promover a atividade da Hsp90. Portanto, a co-chaperona Cdc37 é essencial para o funcionamento correto de quinases que são necessárias em condições de estresse, pois elas adicionam um grupo do fosfato às várias moléculas e podem alterar a atividade da Hsp90 (Eckl e Richter, 2013).

Logo, o conhecimento de genes codificadores das proteínas de Heat Shock e de suas co-chaperonas em *T. rubrum*, pode torna-las um alvo atraente a ser explorado no descobrimento de novos fármacos antifúngicos. Pois a interferência na expressão destas proteínas envolvidas em funções celulares chaves, pode dificultar a sobrevivência do dermatófito *T. rubrum* no hospedeiro levando-o à morte.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Análise do transcriptoma do dermatófito *T. rubrum* tratado com glicoalcaloides de *S. lycocarpum* em meio de cultura contendo queratina e elastina como substrato.

### 2.2. Objetivos específicos:

a) Avaliar a atividade antifúngica de glicoalcaloides de *S. lycocarpum* contra *T. rubrum* e citotóxica em linhagem de queratinócitos humanos e escolher o composto mais efetivo e menos tóxico.

b) Customização de lâminas de oligonucleotídeos de *microarrays* no formato de 4x 44.000 spots para cada lâmina (quatro conjuntos de 44.000 sequências em cada lâmina) pela empresa Agilent.

c) Cultivo do fungo na presença e ausência do glicoalcaloide em meio mínimo com queratina e elastina.

d) Hibridização das amostras de RNA de *T. rubrum* na presença do glicoalcaloide em lâminas de *microarrays* customizadas.

e) Análise dos dados por meio de programas de bioinformática como Cluster-TreeView e SAM (Significance analysis of microarrays) com o intuito de traçarmos assinaturas de hibridização, os perfis de transcriptoma e os genes específicos que são modulados em resposta ao glicoalcalóide.

f) Validação dos dados de *microarray* por PCR quantitativo.

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1. Linhagem de *T. rubrum*

Foi utilizada a linhagem CBS 118892 de *T. rubrum*, cultivada em meio Sabouraud (Fachin, Maffei e Martinez-Rossi, 1996) a fim de promover maior conidiação a 28°C por 7-15 dias.

### 3.2. Produtos Naturais e Comerciais Utilizados

Os glicoalcaloides solamargina e solasonina já purificados de frutos maduros de *S. lycocarpum* foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos do Departamento de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêutica da USP de

Ribeirão Preto. Os compostos  $\alpha$ - solanina (alcaloide extraído de *Solanum Tuberosum* L - Batata), o quimioterápico Doxorubicina foram adquiridos da Sigma Aldrich®, o antifúngico comercial Terbinafina foi gentilmente cedido pela Farmácia “Cidinha Bonini” adquirido do fornecedor Fragon. Todos os compostos foram dissolvidos em 10% de DMSO.

### **3.3. Meios de cultura e soluções**

#### **Meio Sabouraud**

30 g de Sabouraud Dextrose Broth

Água Destilada (q.s.p.) 1000 mL

Ágar: 1,5% (m/v)

pH = 5,6

Esterilização feita por autoclavagem à 121°C por 15 min

#### **Solução de elementos traços para meio mínimo (Cove, 1966)**

40 mg de borato de sódio decahidratado

400 mg de sulfato de cobre pentahidratado

532 mg de sulfato de ferro heptahidratado

292 mg de sulfato de manganês monohidratado

800 mg molibdato de sódio bihidratado

8 mg de sulfato de zinco heptahidratado

Água Destilada (q.s.p.) 1000 mL

Esterilização feita por autoclavagem à 121°C por 15 min

#### **Solução de sais (Cove, 1966)**

38 g de Fosfato de Potássio Monobásico

13 g de Cloreto de Potássio

13 g de Sulfato de Magnésio Heptahidratado

25 mL de Solução de Elementos Traços

Água Destilada (q.s.p.) 500 mL

Esterilização feita por autoclavagem à 121°C por 15 min

**Solução salina 0,9%**

9 g de cloreto de sódio

Água Destilada (q.s.p.) 1000 mL

Esterilização feita por autoclavagem à 121°C por 15 min

**Meio mínimo com glicose e nitrato (MM) (Cove, 1966)**

10 mL de Solução de Sais

5,045 g de Glicose (Sigma)

0,029 g de Nitrato de Sódio (Neon)

1,0 g de Caseína (Sigma)

Água Destilada (q.s.p.) 500 mL

pH = 5,0

Esterilização feita por autoclavagem à 121°C por 15 min

**Meio mínimo com queratina e elastina (QE)**

10 mL de Solução de Sais

0,5% de queratina bovina\*

0,25% de elastina

Água Destilada (q.s.p.) 500 mL

pH = 5,0

Esterilização feita por autoclavagem à 121°C por 15 min

\*A queratina utilizada foi proveniente de pata bovina moída e elastina foi adquirida da Sigma Aldrich® foram adicionadas ao meio mínimo a fim de simular o ambiente de infecção.

**Meio RPMI - 1640**

1 frasco de RPMI - 1640 (Sigma)

1,2 g de Bicarbonato de Sódio (Sigma)

2,38 g de Hepes (Sigma)

Água Destilada (q.s.p.) 1000 mL

pH = 7,4

Esterilização feita por filtração em membrana de náilon de 22 µm

### **3.4. Ensaios de sensibilidade dos fungos**

Os glicoalcaloides de *S. lycocarpum* já tinham sido avaliados em outro projeto vigente e se mostraram muito potentes, mas no intuito comprovar o valor do CIM (concentração inibitória mínima que inibe o crescimento macroscópico do fungo) novos ensaios de sensibilidade foram realizados. Soluções estoque das linhagens foram preparadas como descrito pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards, (CLSI, 2002). Os testes foram realizados em três experimentos independentes. Controles de crescimento e esterilidade foram incluídos para linhagem testada. A Terbinafina foi utilizada como controle positivo. Os glicoalcaloides foram adicionados nas concentrações de 250 a 0,4 µg/ml e as placas contendo as microdiluições foram incubadas a 28°C. O CIM foi determinado após 7 dias de crescimento comparado com o crescimento do controle.

### **3.5. Cultura de linhagem de queratinócitos humanos**

A linhagem de queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT) foi gentilmente cedida pela Profa Dra Ana Paula de Souza Pardo e Prof Dr João Ernesto de Carvalho da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Unicamp e do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), Divisão de Farmacologia e Toxicologia, respectivamente.

O cultivo da linhagem de queratinócitos HaCaT foi realizada no laboratório de cultura de células da Unidade de Biotecnologia sob responsabilidade da Profa Dra Ana Lúcia Fachin Saltoratto. A cultura de HaCaT foi mantida a 37°C numa atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> em meio RPMI (Sigma), com 10% de soro fetal bovino (Cultilab).

### **3.6. Ensaio com MTT**

A concentração celular foi determinada através da contagem das células em hematímetro, para tal foi realizado o seguinte cálculo: número de células contadas x 25 x 1000. A suspensão de células na concentração de  $2,5 \times 10^5$  cél/mL foi adicionada em placas de 96 poços e incubada em estufa de CO<sub>2</sub> por um período de 18 a 24 horas para a aderência das células na placa. Após esse período o glicoalcaloide foi adicionado nas concentrações de 50 a 1,56 µg/ml e o controle comercial Doxorrubicina na concentração de 2,5 µg/ul em seguida, a placa foi reincubada por 24 horas.

Após o período de tratamento o meio foi retirado e adicionado RPMI (Sigma) seguido do acréscimo de 20  $\mu\text{L}$  de MTT (Sigma) diluído em solução de Hanks a uma concentração de 5 mg/ml, depois de quatro horas a placa foi centrifugada a 4000 rpm (Eppendorf centrifuge 5810R), o meio foi retirado e adicionado 200 $\mu\text{L}$  de DMSO (Sigma) para a solubilização dos cristais de formazan e reincubada por um período de 1 hora. Em seguida, a placa foi lida em comprimento de onda 550 nm, em um leitor de microplacas (Thermo Plate reader). O ensaio foi realizado em três experimentos independentes. Para a análise estatística foi realizado o teste de Scott-Knott (ANOVA) e a determinação do  $\text{IC}_{50}$  foi obtida através de uma análise de regressão linear  $p < 0,05$ .

### **3.7. Avaliação do transcriptoma de *T. rubrum* cultivado na presença do glicoalcaloide em condições de cultivo que simulam a pele humana**

*T. rubrum* foi cultivado em meio de cultura mínimo com adição de queratina (Bovina) e elastina (Sigma) que simulam respectivamente a infecção superficial e profunda que ocorre em pacientes imunodeprimidos (Kaufman *et al.*, 2005). Para estudarmos a expressão dos genes de *T. rubrum* na presença do glicoalcaloide em condições que simulam a infecção da pele humana, foi feita uma suspensão de conídios com o micélio raspado de 10 placas da linhagem CBS de *T. rubrum* crescido por 10 dias em 15 mL de salina 0,9% estéril. Os conídios foram contados na Câmara de Neubauer e a partir da concentração de  $1,42 \times 10^8$  foram feitos três experimentos independentes de cada condição (49 mL de meio de cultura + 1 mL de suspensão de conídios) em triplicata:

**Condição 1:** *T. rubrum* cultivado a 28°C sob agitação (150 rpm) em meio de cultura mínimo com 50mM de glicose (Sigma) e 70 mM de nitrato (pH 5,0 por 72 horas e logo depois foi adicionado 10% de DMSO com água destilada para controle do solvente por mais 6 horas, denominado MM.

**Condição 2:** *T. rubrum* cultivado a 28°C sob agitação (150 rpm) em meio de cultura mínimo pH 5.0 adicionado de 0,5 % de queratina (Bovina) e 0,25% de elastina (Sigma) por 72 horas e logo depois foi adicionado 10% de DMSO com água destilada para controle do solvente por mais 6 horas, denominado QE.

**Condição 3:** *T. rubrum* cultivado a 28°C sob agitação (150 rpm) em meio de cultura mínimo pH 5.0 adicionado de 0,5 % de queratina (Bovina), 0,25% de elastina

(Sigma) por 72 horas e logo depois foi adicionada a concentração inibitória de 3,9 µg/ml do glicocaloide Solamargina por mais 30 minutos, denominado QE 30 min.

**Condição 4:** *T. rubrum* cultivado a 28°C sob agitação (150 rpm) em meio de cultura mínimo pH 5.0 adicionado de 0,5 % de queratina (Bovina), 0,25% de elastina (Sigma) por 72 horas e logo depois foi adicionada a concentração inibitória de 3,9 µg/ml do glicocaloide Solamargina por mais 6 horas, denominado QE 6 h.

Finalmente, 30 mg de RNA provenientes das 4 condições foram extraídos e tratados separadamente. O micélio de cada condição foi macerado em nitrogênio líquido e 30 mg de massa fúngica foram pesados em eppendorf de 1,5 mL proveniente de cada condição para a extração de RNA através do kit Illustra RNAspin mini isolation (GE healthcare) seguindo as instruções do fabricante.

Em cada amostra foram adicionados 350 µl do tampão de extração RA1 e 3,5 µl de Mercaptoetanol (Serva Electrophoresis) e foram agitados vigorosamente em vórtex, em seguida, as amostras foram colocadas em coluna de purificação, para reter as impurezas do que foi lisado pela célula, deixando passar pela coluna apenas os ácidos nucleicos (DNA e RNA), depois foram centrifugados à 11.000 g por 1 minuto. É importante notar se o líquido das amostras que contém o RNA não está em contato com a coluna com impurezas, se estiver, centrifugar novamente. Posteriormente, o líquido eluído com RNA foi transferido para um novo tubo eppendorf e adicionado 350 µl de álcool 70% gelado e agitado duas vezes de 5 segundos no vortéx cada amostra, depois transferido para coluna de afinidade por ácidos nucleicos. Centrifugar 8.000 g por 30 segundos e passar a coluna de afinidade que está com os ácidos nucleicos para outro tubo coletor, adicionar 350 µl do tampão MDB, para a remoção dos sais e assim para que o processo de digestão enzimática empregando DNase proveniente do kit foi utilizado para eliminar o DNA genômico da amostra. Centrifugar 11.000 g e descartar todo o líquido da coluna, e adicionar 200 µl do primeiro tampão de lavagem RA2, centrifugar à 11.000 g por 1 minuto e colocar a coluna de afinidade em um novo tubo coletor, adicionar 600 µl do tampão de lavagem RA3 centrifugando novamente à 11.000 g por 1 minuto. Descarta o líquido eluído e adicionar 250 µl do tampão de lavagem RA3 novamente, centrifugar à 11.000 g por 2 minutos. Transferir a coluna de afinidade com o material genético para o tubo eppendorf do Kit de extração previamente identificado, adicionar 32 µl de H<sub>2</sub>O também proveniente do Kit e centrifugar à 11.000 g por 1 minuto. Depois da centrifugação o RNA extraído foi armazenado em ultrafreezer à -80°C.

### **3.8. Escolha dos ESTs de *T. rubrum* depositados do banco de dados NCBI, TrED para deposição em lâminas de *microarray***

A partir dos 44.000 ESTs de *T. rubrum* depositados nos bancos de dados foram selecionadas sequências não redundantes e de boa qualidade.

#### **3.8.1. CUSTOMIZAÇÃO DAS LÂMINAS**

A customização das lâminas foi feita pelo prof. Dr. Iran Malavazi – UFSCar. A escolha dos clones foi feita através da criação de um arquivo FASTA a partir dos 47885 clones depositados no banco de dados do NCBI. O programa *e-array* eliminou sequências redundantes e de baixa qualidade. A seguir, através do programa de *Array* (Agilent) as sequências foram ordenadas e utilizadas para a confecção de oligos de 60 *mers* relativos a cada sequência selecionada no banco de dados. A “biblioteca virtual de oligos de *T. rubrum*” foi enviada para a empresa Agilent para deposição das sequências nas lâminas e construção dos “*oligo chips*” contendo 4x 44000 spots cada lâmina (incluindo controles internos). Utilizamos a tecnologia de “*oligo chips*” devido a facilidade de deposição, custo reduzido em relação à deposição de produto de PCR de bibliotecas de cDNA e redução do uso da quantidade de RNA necessário para marcação com este tipo de lâmina.

### **3.9. Marcação das amostras de RNA, hibridação, aquisição de imagens e análise dos dados**

#### **3.9.1 MARCAÇÃO DAS SONDAS**

A marcação das sondas foi feita com o kit LowInput Quick Amp Labeling (Agilent Technologies) seguindo as recomendações do fabricante, descritas abaixo.

##### **1ª Etapa: Preparação das Amostras de RNA**

Os RNAs das 4 condições experimentais de cada situação analisada separadamente (MM, QE, QE30min e QE6h) e cada uma diluída na concentração de 100 ng de RNA em um volume final de 3  $\mu$ L.

##### **2ª Etapa: Preparação do Controle de Marcação (spike)**

O spike foi descongelado em gelo e submetido a uma breve agitação e, em seguida, o spike foi incubado a 37°C por 5 min. Decorrido o período de incubação,

realizou-se a diluição do spike, essa diluição teve por base a concentração da amostra de RNA utilizada e por isso foi diluído até a 4ª diluição, que é uma diluição apropriada para concentrações próximas a 100 ng.

Diluições	Razão
1ª	1:20
2ª	1:25
3ª	1:10
4ª	1:20

\*Todas as diluições foram feitas para um volume de 40 µL, com exceção da 2ª diluição que foi feita para 50 µL. A cada diluição, foi realizado uma homogeneização por pipetagem. Finalizando as diluições, o microtubo referente à 4ª diluição foi brevemente centrifugado e 2 µL desta diluição foi adicionada aos 3 µL de RNA previamente preparado de cada situação de estudo.

### 3ª Etapa: Preparação da Reação de Marcação

A preparação das reações de marcação foi feita adicionando 0,8 µl do “primer” T7 ao microtubo de spike + RNA, seguido de desnaturação a 65°C por 10 min. Ao final da desnaturação, as amostras foram imediatamente colocadas no gelo e incubadas por 5 min. Neste momento, o tampão “5x Strand Buffer” foi previamente aquecido a 80°C por 3-4 min. Após seu aquecimento, este tampão foi centrifugado e mantido à temperatura ambiente.

- Preparação da Reação de cDNA:

A síntese de cDNA foi feita de acordo com a **tabela 2**

**Tabela 2:** Componentes e respectivos volumes (µL) para a reação de síntese de cDNA

Componentes	Volume (µL) por reação
Amostra (RNA+ <i>spike</i> +T7)	5,8
5x First Strand Buffer	2
0,1 M DTT	1

10 mM dNTP mix	0,5
Affinity Script Rnase Block Mix	1,2
Volume Final	4,7

Logo após sua preparação foi feita uma homogeneização por pipetagem, seguida de incubação a 40°C por 2h.

#### -Inativação das enzimas

A inativação das enzimas foi realizada por aquecimento a 65°C por 15 min, após o aquecimento as amostras foram coladas em gelo por 5 min, e ao término destes períodos de incubação, as amostras foram brevemente centrifugadas.

#### - Reação de Transcrição

A **tabela 3** descreve os componentes da reação de transcrição e seus respectivos volumes.

**Tabela 3:** Componentes da reação de Transcrição

Componentes	Volume ( $\mu\text{L}$ ) por reação
Água Nuclease Free	0,75
5x Tampão de Transcrição	3,2
0,1 M DTT	0,6
NTP mix	1
T7 RNA polimerase blend	0,21
Cianina 3-CTP	0,24
Volume Total	6

Foram adicionados 6  $\mu\text{L}$  da reação de transcrição em cada tubo de amostra e a homogeneização foi feita gentilmente por pipetagem. Prosseguiu-se com uma nova incubação a 42°C por 2 h. A partir do momento de uso da cianina, todos os passos subsequentes foram realizados no escuro.

#### **4ª Etapa:** Purificação do RNA Amplificado e Marcado.

Este procedimento foi realizado utilizando o Kit Illustra (GE Healthcare).

Iniciou-se com a lavagem das amostras com o tampão RA1, para cada volume de amostra foi utilizado 3,5 volumes de tampão, no mesmo microtubo foi acrescido etanol absoluto, em igual proporção ao RA1. O volume total correspondente ao volume da amostra + tampão RA1 + etanol absoluto foi transferido para uma coluna de afinidade ao RNA de coloração azul fornecida pelo kit Illustra e centrifugou-se a 8000 g por 30 seg, após a centrifugação o tubo coletor foi descartado e foi adicionado 600 µL do tampão RA3 e prosseguiu-se com uma centrifugação à 11000 g por 1 min, neste momento o líquido eluído foi descartado e foi adicionado 250 µL de RA3, seguido de uma centrifugação a 11000 g por 3 min. Finalizando, o tubo coletor foi descartado e a amostra purificada foi eluída com 40 µL de água mili-Q-DEPC em uma centrifugação de 11000 g por 1 min.

#### **5ª Etapa: Quantificação do cRNA**

A quantificação foi feita espectroscopicamente em aparelho nanoDrop (MD 1000), sendo quantificados a concentração do corante (pmol/µL), a razão de absorvância do RNA (A260/A280) e a concentração do cRNA (ng/µL). Os cálculos feitos a partir dos valores acima mensurados referem-se à qualidade e eficiência da marcação. Foram feitos da seguinte forma:

- Concentração total de cRNA:  $\text{ng}/\mu\text{L} \times 40 \mu\text{L} / 1000 \mu\text{L}$

-  $\text{Cy3} \times 40 = \text{pmol}$

- Atividade específica:  $[\text{Cy3}] / [\text{cRNA}]$

Os parâmetros para uma marcação eficiente e de qualidade são concentração > 1,65 µg de cRNA e atividade específica >9.

- Preparação do 10x Blocking Agent

O Blocking Agent foi ressuspendido em 500  $\mu\text{L}$  de água nuclease- free, homogeneizado por agitação ou por pipetagem, seguido de uma centrifugação breve por 5-10 seg.

#### 6ª Etapa: Hibridização Das Amostras

Os componentes da reação de hibridização encontram-se descritos na **tabela 4**.

**Tabela 4:** Reagentes de Fragmentação para lâminas de *microarray* no formato de 4x44 ou 8x15

Componentes	Volume ( $\mu\text{L}$ )/Massa $\mu\text{g}$
cRNA amplificado e marcado com Cy3	1,65 $\mu\text{g}$
10x Blocking Agent	11
Água <i>nuclease-free</i>	Qsp 52,8
25x Tampão de Fragmentação	2,2
Volume Total	55 $\mu\text{L}$

Os componentes da reação foram homogeneizados gentilmente por pipetagem e em seguida incubados por 30 min a 60°C a fim de se promover a fragmentação do RNA.

Decorridos os 30 min, as amostras foram colocadas imediatamente no gelo e mantidas em gelo por 1 min, e logo após foram adicionados 55  $\mu\text{L}$  do reagente 2xGEx Hybridization Buffer HI-RPM e após ser adicionado, a homogeneização cuidadosa para evitar a formação de bolhas e o microtubo foi mantido em gelo, centrifugou-se 13000 rpm (Hettich centrifuge mikro 200R) por 1 min e foi feita a aplicação de 100  $\mu\text{L}$  da reação final de marcação na lâmina de vedação e esta foi acoplada a lâmina com arrays e levadas a forno de hibridização (Shel Lab) a 65 °C, 10 rpm por 17 h.

### 3.9.2. LAVAGEM DAS LÂMINAS

O desacoplamento entre a lâmina com os arrays e da lâmina de vedação foi realizado em imersão no Tampão de Lavagem “Wash” 1 (Agilent Technologies), a temperatura ambiente. Em seguida foram feitas as lavagens da seguinte forma:

1ª lavagem: Tampão de Lavagem “Wash” 1 (Agilent technologies) a temperatura ambiente por 1 min.

2ª lavagem: Tampão de Lavagem “Wash”2 (Agilent Technologies) a 40° C por 1 min.

3ª lavagem: Acetonitrila a temperatura ambiente por 10 seg.

4ª lavagem: Estabilização e Tampão de Secagem a temperatura ambiente por 30 seg.

### 3.10. Aquisição das imagens

O escaneamento das lâminas foi realizado no laboratório de Imunogenética Molecular do Departamento de Genética da FMRP do prof. Dr. Geraldo Aleixo Passos Jr., em scanner G2565CA Agilent. O software Feature Extraction (Agilent) foi utilizado para a extração dos dados e para análise inicial das imagens.

A análise dos dados foi realizada usando o programa “Agilent Feature Extraction” software version 10.5. Os dados do *microarray* numericamente quantitativos foram normalizados em 75% e analisados de acordo com a plataforma GeneSpring GX bioinformatics (<http://www.agilent.com/chem/genespring>) gerando o cluster hierárquico dos genes modulados de *T. rubrum* baseado na análise estatística ANOVA ( $P < .01$ ) com fold change  $>2.0$  e correlação métrica de Pearson (Eisen *et al.*, 1998).

### 3.11. Análise estatística dos dados do *microarray* de *Trichophyton rubrum* nas diferentes condições de cultivo

A análise dos dados foi feita utilizando software Gene Spring 12.6 (Agilent), as correções de normalização foram realizadas com o algoritmo *quantile*. A identificação dos genes diferencialmente expressos foi feita através de uma comparação aos pares entre 3 grupos de condição (MM x QE; QE x QE30min; QE x QE6h), através do Moderated T-

Test com corte de 0,05 e com um *fold change* de 2. O fator de correção múltiplo utilizado foi o de *Storey with Bootstrapping*. Com relação à comparação entre queratina e elastina versus queratina e elastina + Solamargina por 30 min optou-se em não empregar fator de correção, devido às menores diferenças entre as modulações apresentadas entre essas condições.

### **3.12. Anotação funcional dos genes modulados**

A anotação funcional dos genes foi realizada por um dos membros do nosso grupo de pesquisa, o doutorando Matheus Elloy Franco. A partir da listagem das PROBES moduladas utilizou-se o programa Local Blast com e-Value  $\leq 1e-5$  para mapear as mesmas com os transcritos de *T. rubrum* CBS 118892 resultantes do projeto Comparativo de Dermatophyte Comparative Database – Broad Institute. Com a finalidade de obter mais informações além das anotações com o Blast dos transcritos relacionados, utilizou-se o programa BLAST2GO, buscando assim informações como assinaturas proteicas similares (InterProScan) (Zdobnov e Apweiler, 2001), termos do Gene Ontology (Ashburner *et al.*, 2000), Enzyme Code – busca do código da enzima e KEGG - Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes – visualização dos mapas metabólicos onde os genes e/ou seus produtos atuam (Kanehisa e Goto, 2000).

### **3.13. Categorização dos genes diferencialmente expressos**

Após o mapeamento dos genes, foi realizada a categorização funcional dos genes mapeados diferencialmente expressos de acordo com Gene Ontology, utilizando a ferramenta Blast2GO. Como vários termos estão associados a um único gene, utilizou-se a ferramenta BayGO, para estimar as categorias super-representadas em cada uma das condições analisadas (Vêncio *et al.*, 2006).

### **3.14. Validação dos dados de microarray por PCR quantitativo**

Após a extração, quantificação e avaliação da integridade do RNA, o RNA foi tratado para obter o cDNA de cada amostra com o kit DNaseI Sigma, que consistiu em tratar 1  $\mu$ g do RNA com 1  $\mu$ l de DNase (1000 U), 1  $\mu$ l Buffer DNase (10X), por 15 minutos à temperatura ambiente. A seguir adicionou-se 1  $\mu$ l de Oligonucleotídeos DT (0,5 $\mu$ g/ $\mu$ L) num volume final de 12  $\mu$ l, que foi incubado por 5 minutos à 65°C.

A seguir foram adicionados no tubo os seguintes reagentes do kit *RevertAid Minus First Strand cDNA Synthesis* da Thermo Scientific:

Reagentes	Quantidade por amostra
Reaction Buffer 5X	4 $\mu$ l
dNTP 10Mm	2 $\mu$ l
Transcriptase reversa	1 $\mu$ l
Inibidor de RNase	1 $\mu$ l

Foram adicionados 8  $\mu$ l do MIX do em cada amostra que foram incubados no Termociclador (ESCOHEALTHCARE Swift MaxPro) seguindo os parâmetros: 42° C por 1 h, 70°C por 5 minutos e depois resfriado por 4°C e levado ao ultrafreezer -80°C para armazenagem.

### 3.14.1. Desenho e padronização de *primers* para validação dos dados de *microarray*

Para o desenho dos iniciadores inicialmente foram selecionadas as sequências no site do NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) para os genes que codificam: 18S, Fatty Acid Dehydratase, Gtp-binding nuclear protein gsp 1 ran, Metacaspase-1 e Wd repeat protein. Posteriormente, foi utilizada a ferramenta do *site* [www.idtdna.com](http://www.idtdna.com), denominado de “Real Time PCR tool”, para o desenho dos “*primers*” que seguiram os parâmetros exigidos para a realização do PCR quantitativo (**Tabela 5**).

Todos os genes escolhidos para validação do *microarray* foram desenhados como descrito acima. A padronização da reação de PCR quantitativo foi realizada utilizando diluições seriadas de cDNA nas concentrações de 50, 70 e 100  $\mu$ M dos primers para obter uma eficiência de reação entre 90 e 110%.

**Tabela 5:** Primers usados para qPCR

Gene	Sequência	Tamanho (bp)	Referência
ERG1	F: GTGAAGATACCTTTCCTAGCG R: TTATGGTAGAAACGGCCTTGG	148	Komoto <i>et al</i> 2015
Hsp60	F: AAGCGTCGTTGTCCGTAAGC R: TGTCGAAGCCACGGTAAAGT	62	Jacob <i>et al</i> 2015
Hsp90	F: ACCGTGCTGCCCTTGCT R: GTGATCTCGTCGCCAGACTTG	61	Jacob <i>et al</i> 2015
MEP4	F: GCATGGACTTATGCTTGCGG R: TGGATATCTGGGGAAGGCGA	131	Komoto <i>et al</i> 2015
<i>TruMDR2</i>	F: GCACTGATCTGCAGCTCGACC R: CCAACGTCATCCTCCCAGAC	91	Fachin <i>et al</i> 2006

Tubulin beta chain	F: AACATGATGGCTGCCACTGA R: AAGATGGCAGAGCAGGTAAGGT	253	Jacob <i>et al</i> 2012
18S	F: AGCTGTCAGTCTGAGCGTTTAGCA R: TCGCAT TTCGCTGCGTTCTTCATC	97	Este trabalho
Fatty Acid Dehydratase	F: CCACTCGCAGGGTATCATTAC R: CGATCCAGAAGAGCATGGTTAG	104	Este trabalho
Gtp-binding nuclear protein gsp1 ran	F: GTGGACTCCGAGATGGATACTA R: GGGACGTTCTTGTAGGTGATAC	88	Este trabalho
Metacaspase-1	F: TCACAGACGACCAACAGAAC R: GGCCTGAATAGTGGAAGAAGAG	120	Este trabalho
Wd repeat protein	F: TCTCCTGGCTAACAGCTACT R: GCATGTACCACTCCTCGTAATC	75	Este trabalho

### 3.15. PCR Quantitativo

Seis genes (**Tabela 5**) foram selecionados para qPCR com a finalidade de validar os dados de expressão de *microarray*. O DNA complementar foi sintetizado a partir de 100 ng de RNA total num volume de reação de 20 uL usando o *RevertAID H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Scientific). Os experimentos de qPCR foram realizadas em duplicatas utilizando o Kit de SYBR Taq Ready Mix (Sigma) em um sistema Mx3300 QPCR (Stratagene) de acordo com Bitencourt *et al.*, 2016. As condições dos ciclos foram como se segue: desnaturação inicial a 94 ° C durante 10 min, seguido de 40 ciclos a 94°C durante 2 min, 60 s a 60°C e 1 min a 72°C. Uma curva de dissociação foi construído no final de cada ciclo de PCR para verificar se um único produto foi amplificado. Os níveis de expressão foram calculados pelo método Ct comparativo utilizando os genes 18S e Beta Tubulina para normalização. A referência para a validação dos dados de *microarray* por PCR quantitativo foi o meio de cultura mínimo suplementado com queratina e elastina. Os resultados foram representados como a média  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos independentes.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1. Ensaios de sensibilidade dos fungos

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada através do teste de microdiluição em placas de 96 poços em meio RPMI segundo o protocolo CLSI, 2002 com incubação por 7 dias a 28°C. Os resultados demonstraram que os glicoalcaloides foram efetivos, a solamargina CIM= 3,9  $\mu$ g/ml, solasonina CIM= 15,6  $\mu$ g/ml e  $\alpha$ - solanina CIM= 15,6  $\mu$ g/ml, o controle terbinafina apresentou CIM de 0,019  $\mu$ g/ml e a aglicona CIM> 250

$\mu\text{g/ml}$  conforme a **tabela 6**. Esses resultados sugerem que estes glicoalcaloides podem ser promissores para o desenvolvimento de antifúngicos, sendo a solamargina de maior interesse por apresentar baixo CIM e portanto, maior atividade antifúngica.

Baseado no alto valor de CIM obtido para aglicona ( $> 250 \mu\text{g/ml}$ ), acredita-se que a propriedade antifúngica desses compostos esteja relacionada aos açúcares presentes em suas estruturas moleculares. Sabe-se que a terbinafina inibe a enzima esqualeno epoxidase, que está envolvida na biossíntese do ergosterol. O ergosterol é o principal esterol da membrana plasmática, sendo um componente vital da célula fúngica. Devido a sua importância é o principal alvo específico dos antifúngicos atuais, principalmente os compostos de azoles e da terbinafina. Entretanto, linhagens de dermatófitos resistentes a esses agentes antifúngicos têm sido relatadas (Mukherjee *et al.*, 2003; Osborne *et al.*, 2003).

**Tabela 6:** Atividade antifúngica (CIM) dos glicoalcaloides

Composto	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{M}$
Solamargina	3,9	4,49
Solasonina	15,6	17,64
$\alpha$ - Solanina	15,6	17,97
Aglicona	$>250$	$>414,34$
Terbinafina	0,019	0,05

#### 4.2. Atividade Citotóxica

O teste MTT 3-(4,5 dimetil- 2-tiazol- 2,5- difenil-brometo de tetrazolium) avalia o metabolismo celular baseado na habilidade do sistema succinato tetrazolina redutase mitocondrial em converter o composto amarelo tetrazolato, no precipitado azul formazan, pela enzima succinato desidrogenase presente na mitocôndria das células. A proporção de corante produzido é compatível ao número de células metabolicamente ativas (Almeida, De *et al.*, 2004). A atividade citotóxica *in vitro* da solamargina mostrou um valor de  $\text{IC}_{50}$  de  $10,92 \mu\text{M}$  em 24 horas de tratamento (**Tabela 7**). O tratamento com Doxorubicina, quimioterápico comercial utilizado como controle positivo, inibiu a proliferação na linhagem celular HacaT com  $2,5 \mu\text{g/ml}$  em 24 h de tratamento. O controle do solvente utilizando DMSO não apresentou citotoxicidade em 24 h de tratamento.

**Tabela 7:** Atividade citotóxica dos glicoalcaloides em linhagem celular de queratinócitos humanos HaCaT

Composto	µg/ml	µM
Solamargina	9,47	10,92
Solasonina	37,62	42,56
α- Solanina	39,94	42,56
Doxorrubicina	2,5	4,59

Dessa forma, a Solamargina foi escolhida para os ensaios de transcriptoma devido a pronunciada atividade antifúngica contra o dermatófito *T. rubrum* CBS 118892 e moderada citotoxicidade comparada ao controle comercial Doxorrubicina na linhagem celular HaCaT em comparação aos outros glicoalcaloides Solasonina e α- Solanina.

#### 4.3. Análise da qualidade do RNA

Para estudarmos o efeito do glicoalcaloide solamargina na expressão dos genes de *T. rubrum* em condições que simulam a infecção da pele humana, utilizamos o micélio do fungo previamente crescido por 72 horas, e que a seguir foi exposto por 30 minutos e 6 horas a solamargina, afim de verificar a resposta rápida e tardia.

A concentração e a qualidade dos RNAs extraídos foram medidas por nanofotômetro (Impen®), e a integridade determinada através de eletroforese microfluídica que gerou gel virtual e concomitantemente uma nota de integridade (RIN – RNA Integrity Number), ambos fornecidos pelo bioanalisador Bioanalyzer 2100 (Agilent), utilizando algoritmo para plantas, pois para fungos ainda não foi desenvolvido algoritmo apropriado, e plantas e fungos possuem similaridade celular, inclusive no que se refere as subunidades de RNA ribossômico. As amostras de cada situação experimental foram escolhidas de acordo com as melhores notas de integridade (**Tabela 8**) obtidas através do Bioanalyzer com um valor de RIN acima de 7.

**Tabela 8:** Nota de integridade do RNA das condições estudadas

Amostra	RIN
MM 1	7,70
MM 2	6,20
MM 3	6,70
QE 1	7,90
QE 2	8,70

QE 3	6,30
30min 1	9,20
30min 2	7,50
30min 3	9,30
6h 1	7,20
6h 2	8,20
6h 3	-

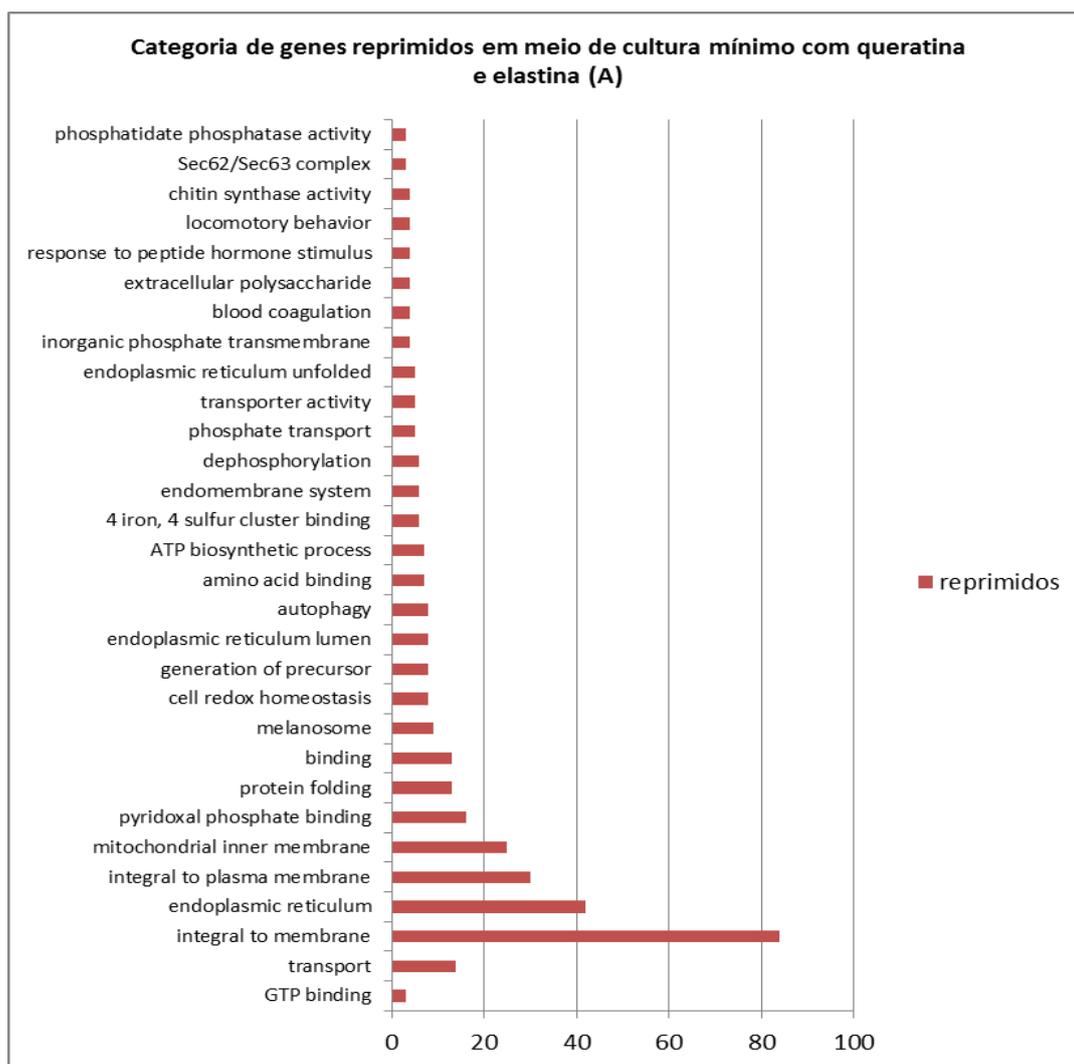
---

- amostra não lida

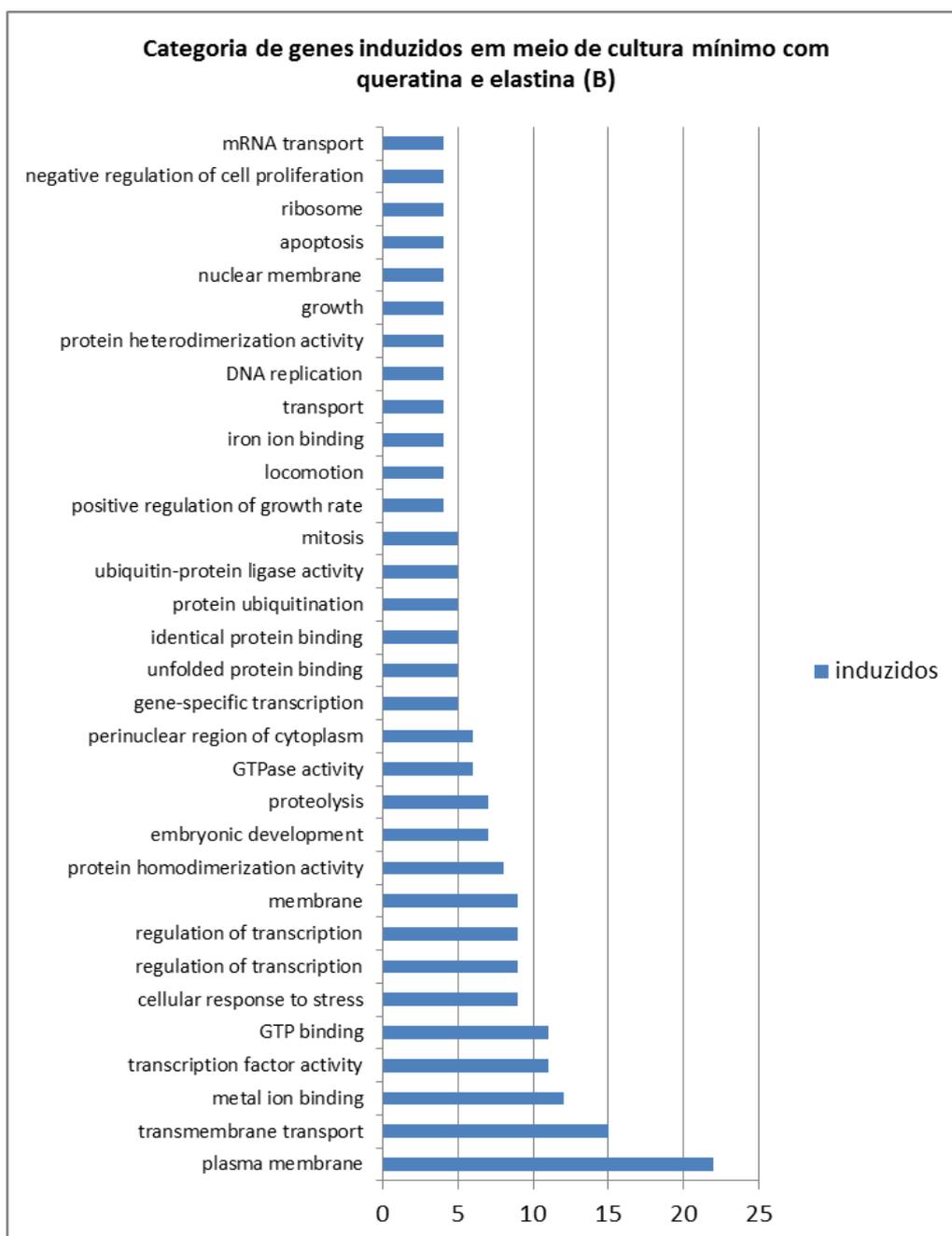
#### 4.4. Análise do transcriptoma de *T. rubrum*

Dos 44 mil genes de *T. rubrum* depositados na lâmina, verificou-se que 987 genes foram modulados (reprimidos e induzidos) no meio de cultura contendo queratina e elastina, comparado com o meio de cultura mínimo com glicose e nitrato (**Figura 4**).

**Figura 4:** Categorização de genes modulados em meio mínimo com queratina e elastina (A) reprimidos (B) induzidos



Fold utilizado para categorização  $\geq 3$



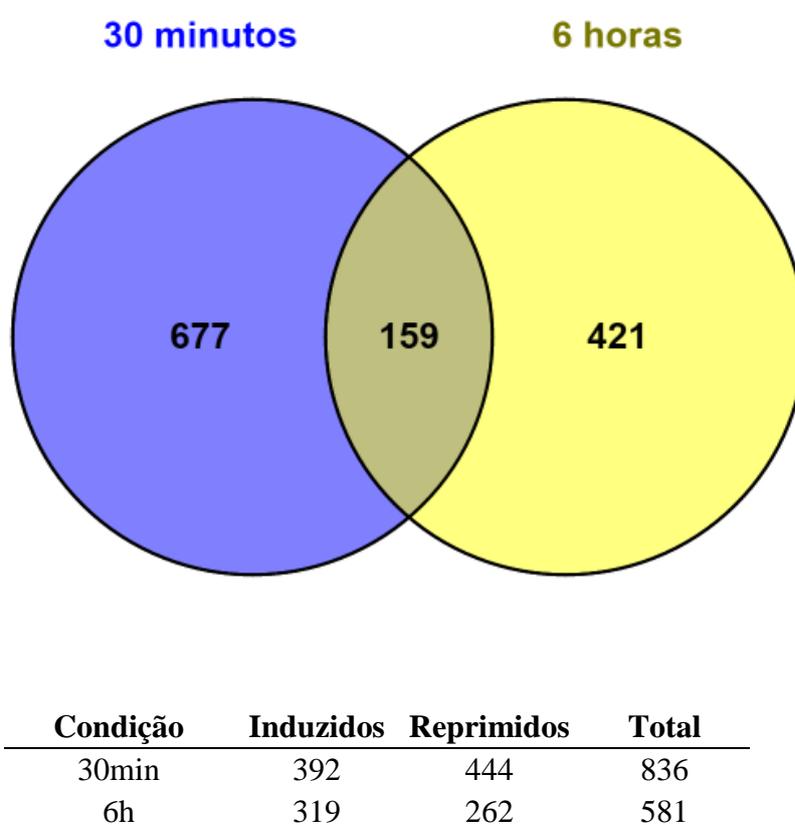
Fold utilizado para categorização  $\geq 4$

Portanto, tendo em vista que o objetivo principal deste trabalho foi a avaliação do transcriptoma de *T. rubrum* na presença de Solamargina, os dados referentes aos genes modulados em resposta a presença de substratos proteicos já foram discutidos e publicados em outro trabalho do grupo de pesquisa (Bitencourt *et al.*, 2016).

Quanto ao transcriptoma de *T. rubrum* na presença da droga, 836 genes foram modulados em meio contendo queratina e elastina adicionado de solamargina no tempo de

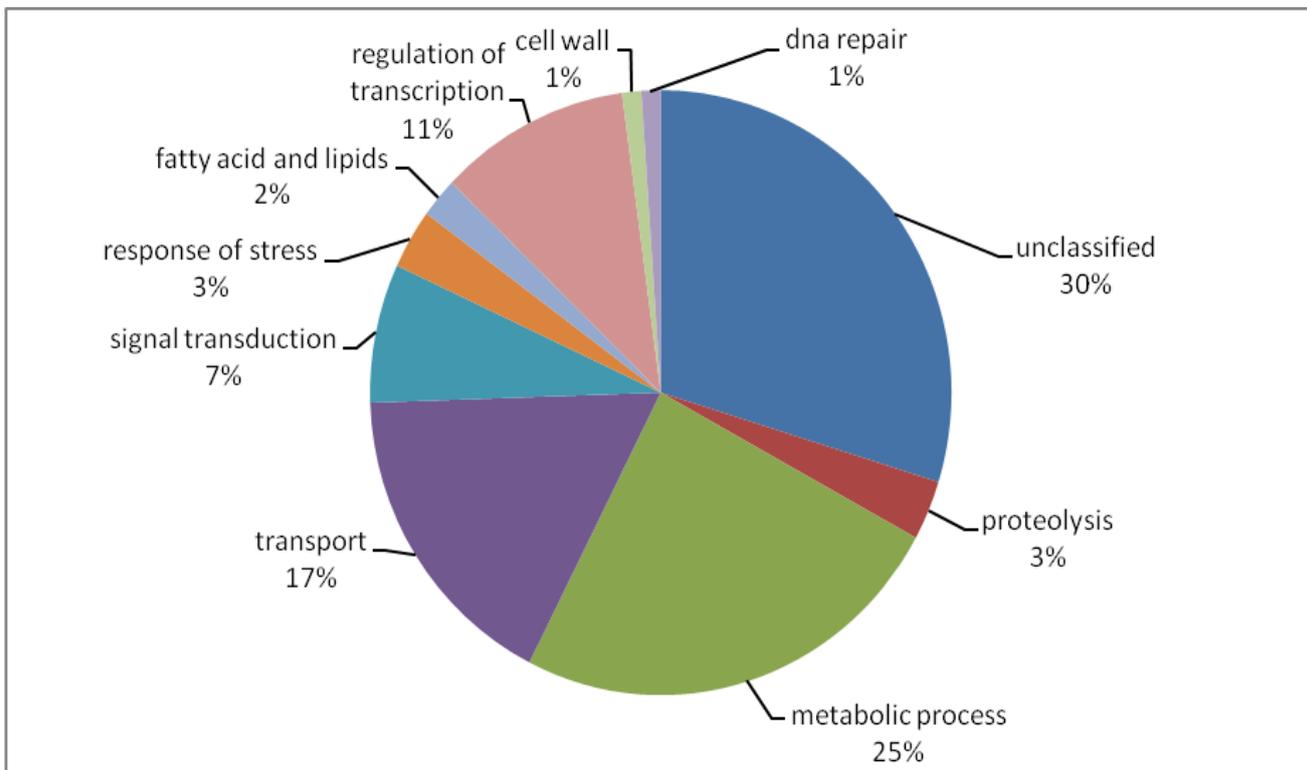
30 minutos e 580 transcritos foram modulados no tempo de 6 horas. A distribuição desses genes entre as diferentes situações encontra-se representada na **figura 5**.

**Figura 5:** Diagramas de Venn, mostrando o número de genes modulados durante o crescimento de *T. rubrum* em meio de cultura mínimo com queratina e elastina na presença de Solamargina por 30 minutos e 6 horas



As principais categorias de genes compartilhados após a exposição à Solamargina por 30 minutos e 6 horas foram: genes com funções desconhecidas, genes envolvidos em processos metabólicos, genes de transporte, genes de regulação de transcrição (**Figura 6**).

**Figura 6:** Principais categorias funcionais de genes comumente modulados após exposição à solamargina por 30 minutos e 6 horas

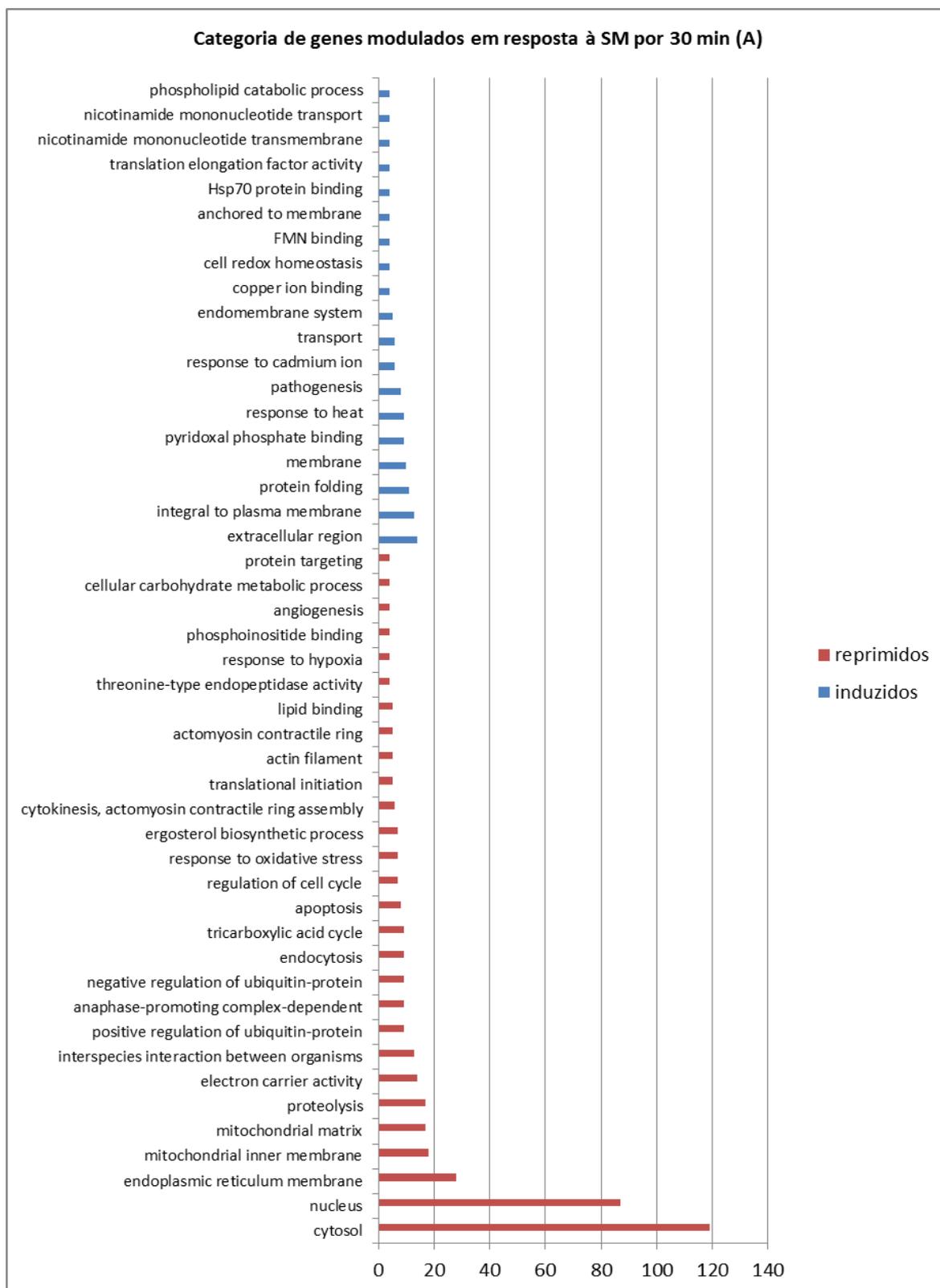


A quantidade de dados gerados nos laboratórios é cada vez maior e as análises *in silico* desses dados necessitam ser cada vez mais automatizadas, para tanto a Bioinformática precisa produzir softwares que atinjam esse objetivo, mas que também sejam mais fáceis para os usuários com menores conhecimentos em Tecnologia da Informação, Linux e/ou Bioinformática. O BLAST2GO é uma ferramenta gráfica, com interface intuitiva e multi plataforma que permite fazer as análises mais usuais para anotação de sequências. Os resultados da anotação automática (comparações automáticas das sequências com bancos de dados) devem passar por uma curadoria (verificação manual), onde as informações possam ser confirmadas ou corrigidas. Entretanto, cabe ressaltar que a verdadeira validação dos resultados de análises *in silico* deve ser biologicamente realizada. Os resultados de anotação automática são muito importantes, pois auxiliam na descoberta da importância biológica da sequência dentro do contexto em que ela foi obtida.

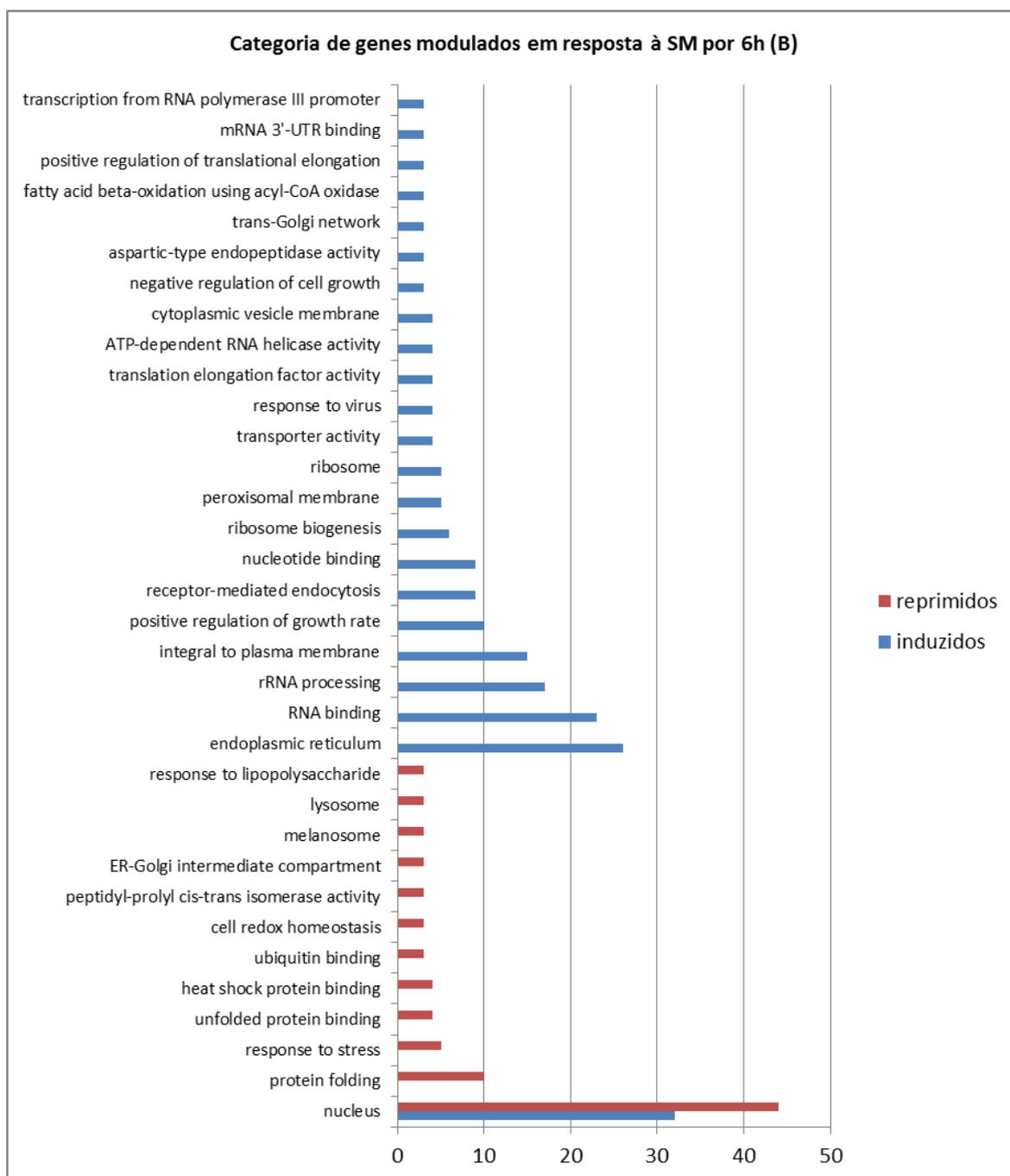
Para auxiliar na interpretação dos resultados obtidos, após a anotação de dados foi feito o enriquecimento funcional através do software BAYGO que classifica termos com significância estatística, ou seja, e possível fazer uma categorização específica. O genoma

de *Trichophyton rubrum* foi sequenciado recentemente está disponível no Banco do Genoma Comparativo de Dermatófitos, Broad Institute (MIT Harvard) (<http://www.broad.mit.edu/annotation/genome>), entretanto, a maioria dos genes de *T. rubrum* são anotados de acordo com outros fungos e suas funções reais não foram confirmadas biologicamente. Um fato interessante após a categorização (**Figura 7**), foi o comportamento das *heat shock protein* que em 30 minutos com solamargina os genes codificadores destas proteínas se apresentam induzidos, mas ao longo do tempo, devido permanência na droga estes genes encontram-se reprimidos, sendo um possível alvo de ação.

**Figura 7:** Categorização de genes modulados em resposta à solamargina nos diferentes tempos estudados (A) 30 minutos (B) 6 horas.



Fold utilizado para categorização  $\geq 4$



Fold utilizado para categorização  $\geq 3$

Alguns genes das **tabelas 9 e 10** foram escolhidos para validação dos dados de *microarray* devido ao seu envolvimento com a patogenicidade, adaptação ao ambiente e virulência.

**Tabela 9:** Principais genes modulados relacionados à virulência e resposta a drogas dos dados de *microarray*

Gene Id	Expression change		Tentative annotation
	30min	6h	
<i>Phosphorylation</i>			
TERG_04733	-2,32	-	camk camk1 camk1-cmk protein kinase
TERG_07115	3,27	-	serine threonine protein kinase
TERG_04042	2,35	-	serine threonine protein kinase
TERG_00768	2,32	-	serine threonine protein kinase
TERG_12280	2,21	-	serine threonine protein kinase
TERG_06932	2,11	-	serine threonine protein kinase
TERG_08143	-2,30	-	serine threonine protein kinase
TERG_08278	-	2,24	serine threonine protein kinase
TERG_08938	-	-2,15	thermoresistant gluconokinase family protein
<i>Apoptotic Process</i>			
TERG_07377	-2,03	-	metacaspase-1
<i>Biosynthetic Process</i>			
TERG_08528	-2,38	2,19	fatty acid synthase beta subunit dehydratase
TERG_07657	-	-2,58	chitin synthase d
TERG_02562	-	2,69	chitin synthase
TERG_04919	-	2,11	chitin synthase v
TERG_06364	-	-2,09	chitin synthase export chaperone
<i>Integral to membrane</i>			
TERG_05717	-3,92	-	squalene epoxidase
<i>Metabolic Process</i>			
TERG_01271	-2,30	-	isocitrate lyase
<i>Chitin Catabolic Process</i>			
TERG_11657	-5,54	-	glycoside hydrolase family 18 protein
<i>Proteolysis</i>			
TERG_03815	2,49	2,04	subtilisin-like protease 3
TERG_02985	-2,08	-	wd repeat protein
TERG_06552	-2,17	2,07	aspartic-type endopeptidase
TERG_04324	4,03	-2,70	extracellular metalloproteinase 4
TERG_05652	2,24	-	leucine aminopeptidase 1
<i>Signal Transduction</i>			
TERG_07664	-	2,28	rho gtpase activator rga

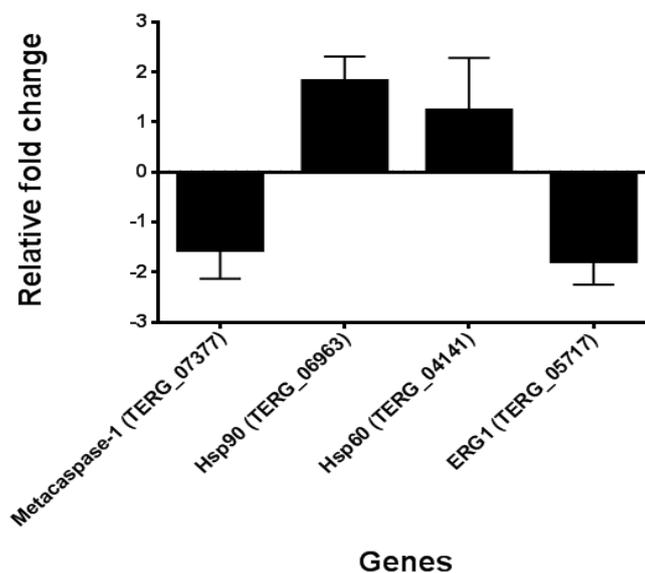
<i>Transport</i>			
TERG_01443	2,18	-	abc multidrug transporter
TERG_08751	-2,25	-	abc multidrug
TERG_08613	2,12	2,16	ABC multidrug transporter
TERG_01187	-	2,35	gtp-binding nuclear protein gsp1 ran

- não apresentou modulação

#### 4.5. Validação de dados do *microarray* por qPCR

Os resultados de *microarray* foram validados através da seleção de 6 genes do dermatófito *T.rubrum* envolvidos com várias funções biológicas, utilizando PCR quantitativo (**Figura 8**). Os genes avaliados por qPCR foram escolhidos considerando seu envolvimento na patogenicidade, virulência, via de biossíntese do ergosterol e genes de reposta a estresse relacionados a adaptação e vias de transdução de sinais (Hsps). O qPCR foi feito em método de quantificação comparativa e de expressão, com valores de modulação de dados em escala logarítmica na base 2, através da fórmula  $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{gene alvo}} - Ct_{\text{normalizador}})_{\text{tratamento}} - (Ct_{\text{gene alvo}} - Ct_{\text{normalizador}})_{\text{calibrador}}$ . Para avaliar o efeito da solamargina na expressão de genes nos diferentes tempos a referência utilizada foi condição controle (ausente de drogas). Os dados de *microarray* e qPCR mostraram um forte correlação com valor de 72,73%.

**Figura 8:** Real time RT PCR dos principais genes de *T. rubrum* modulados no experimento de *microarray* durante o crescimento em meio contendo elastina e queratina na presença de solamargina durante 30 minutos em comparação com o controle



No presente trabalho, o crescimento de *T.rubrum* na presença de solamargina por apenas 30 minutos, reprimiu o gene codificador da metacaspase-1 (**Figura 8**). Já em 6 horas não foi observado modulação desse gene. As caspases, são classificadas em metacaspases e paracaspases e são descritas metacaspases que estão envolvidas na morte de células fúngica e de vegetais (Vercammen *et al.*, 2007). Foi demonstrado em *C. albicans* que a metacaspase está envolvida na morte celular por apoptose induzida por estresse oxidativo via peróxido de hidrogênio (Cao *et al.*, 2009). A indução de apoptose em *S. cerevisiae*, também foi demonstrada após tratamento mesmo em baixas concentrações de ácido acético, indicando uma outra forma de estresse celular (Ludovico *et al.*, 2001). Além disso, em *S. cerevisiae*, foi demonstrado que o processo de envelhecimento em levedura pode levar a indução de apoptose celular via metacaspase-1 (Hill *et al.*, 2014). Dessa forma, sugerimos que neste trabalho não houve indução de morte celular por apoptose mediada por metacaspase-1 em *T.rubrum* após exposição à solamargina no menor tempo ensaiado.

Outro gene modulado nos experimentos de *microarray* foram as proteínas de Heat Shock (Hsps) que tem importância por possuírem diferentes funções celulares, como reconhecimento e ligação à outras proteínas denominadas de proteínas-cliente, que se encontram enoveladas ou desenoveladas.

A Hsp90 serve como uma plataforma para a dobramento e a maturação de muitas proteínas-cliente incluindo proteínas quinases e receptores de hormônios esteróides. Para cumprir esta tarefa, Hsp90 pode realizar mudanças conformacionais devido a energia liberada pela hidrólise de ATP. Além disso, a Hsp90 pode recorrer a um amplo conjunto de co-chaperonas, que se encaixam aos diversos domínios da proteína Hsp90, segundo às necessidades específicas da proteína-cliente. Assim, o conhecimento sobre as várias funções celulares exercidas pela Hsp90 e suas co-chaperonas proporcionaria um número maior de opções de alvos terapêuticos para o desenvolvimento de novos antifúngicos (Eckl e Richter, 2013). Neste trabalho, podemos destacar o comportamento da Hsp90 e de sua co-chaperona Cdc37 na presença de Solamargina em dois tempos distintos.

Os genes de Hsp90 são conservados em diversos organismos, mas os domínios de ligação da proteína Cdc37 variam ligeiramente, o que implica que diferentes quinases podem utilizar domínios distintos para interagir com a maquinaria da chaperona Hsp90. As proteínas quinases são uma família de proteínas chave envolvidas na comunicação do controle intracelular, regulação e transdução de sinais.

A ativação e maturação de quinases depende de um co-factor específico, a proteína Cdc37. Taipale *et al.*, 2012 descreveram que as proteínas quinases dependem da interação com Cdc37 e Hsp90. O controle do dobramento de proteínas quinases é realizado pela proteína Cdc37, que é um componente principal de sinalização do complexo da Hsp90 (Olesen *et al.*, 2015).

Sabe-se que a interação Hsp90/Cdc37 pode envolver dois sítios. No nematóide *C. elegans* a Cdc37 liga-se ao M-domínio da Hsp90, enquanto que a Cdc37 de humano interage mais fortemente ao N-domínio (Eckl e Richter, 2013). Além disso, pode formar um supercomplexo de Hsp90 com a interação entre diversas co-chaperonas e co-fatores (Cdc37, proteína-cliente, HOP, Hsp70, Hsp40, p23 e Aha1).

No presente trabalho, foi observada a indução da chaperona Cdc37 e da Hsp90 quando *T. rubrum* foi exposto por 30 minutos a solamargina, porém em 6 horas ambos os genes foram reprimidos (**Tabela 10**). Houve também modulação das Hps40 e Hsp70 que podem estar relacionadas ao complexo, mas não se sabe em qual dos domínios a ligação do complexo Cdc37/Hsp90 em *T.rubrum* é feita. Em suma, as co-chaperonas e co-fatores permitem que a Hsp90 se associe com diversas proteínas-cliente, que sem a interação com a Hsp90 seriam destruídas.

**Tabela 10:** Modulação de Proteínas de Heat Shock (HSP) do microarray de *T. rubrum* na presença de solamargina

Gene	Accession number	Expression change	
		30min	6h
hsp70 family	TERG_07058	2,34	-
hsp90-like protein	TERG_07237	-	-2,34
hsp90-like protein	TERG_06963	2,32	-2,08
hsp60-like protein	TERG_04141	3,03	-
heat shock protein sti1	TERG_06870	2,40	-
hsp70-like protein	TERG_06505	2,38	-2,09
chaperone heat shock protein	TERG_01122	2,36	-
30 kda heat shock protein	TERG_01659	2,35	-2,16
hsp90 co-chaperone cdc37	TERG_06398	2,32	-2,14
hsp40 co-chaperone	TERG_06719	2,20	-
hsp98-like protein	TERG_12507	2,17	-
hsp88-like protein	TERG_07658	-2,14	-
heat shock protein ssb1	TERG_01883	-	2,05

- não apresentou modulação; 30min=meio mínimo com queratina e elastina na presença de solamargina por 30 minutos; 6h= meio mínimo com queratina e elastina na presença de solarmagina por 6 horas

Leach *et al.*, 2012 observaram que em *C. albicans*, a inibição da proteína Hsp90 também afetou a biogênese da parede celular, através da sua remodelagem por meio de ruptura das vias de sinalização. No presente trabalho, quando *T. rubrum* foi submetido à exposição de solamargina por 30min, foi observada a indução dos genes Hsp90 e Cdc37 cujo complexo pode estar envolvido na ativação de respostas ao estresse causado pela ação da droga.

Jacob *et al.*, 2015 observaram que a inibição da atividade da proteína Hsp90 pelo composto *17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin* (17-AAG) em *T.rubrum*, quando cultivado na presença dos antifúngicos comerciais Itraconazol e Micafungina, interferiu na modulação de expressão de genes que codificam outras hsps e também no gene *pacC*, um gene envolvido com a regulação de pH e também relacionado com virulência. Além disso, a inibição da atividade da Hsp90 diminuiu drasticamente a capacidade de *T.rubrum* em crescer em fragmentos de unha humana.

Nesse trabalho, as Hsp40 e Hsp70 foram moduladas positivamente na presença da solamargina por 30 minutos, fato que sugere que as proteínas codificadas por esses genes possam estar interagindo com o complexo Hsp90. A Hsp70 está relacionada a diversos processos celulares, tais como promover o enovelamento, o transporte e a degradação da proteína de ligação ao substrato. A Hsp70 liga-se com a Hsp40, estimulando a sua atividade ATPásica, pois a Hsp40 é co-chaperona da Hsp70. Além disso, a Hsp70 auxilia a proteína-cliente a se ligar ao complexo da Hsp90 (<http://hsp40.com/>).

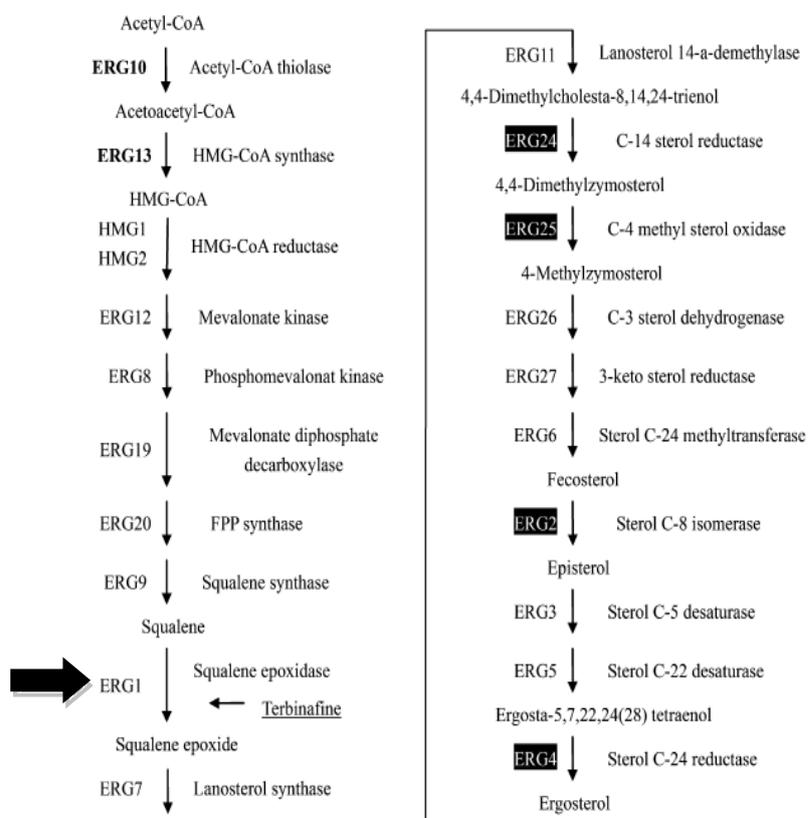
Adicionalmente, o gene que codifica a proteína Hsp60 também foi induzido na presença de solamargina por 30 minutos, provavelmente em resposta ao estresse provocado pela droga. A Hsp60 tem sido associada a uma variedade de funções celulares importantes tais como a apoptose e a resposta imune. Ela funciona principalmente como uma chaperona molecular que auxilia o dobramento correto de proteínas mitocôndriais (Sun *et al.*, 2012). Além disso, essa proteína está envolvida na diferenciação, infecção e colonização, desempenhando um papel importante na patogenicidade de fungos causadores de doenças (Tiwari, Thakur e Shankar, 2015).

Como demonstrado, os genes codificadores das proteínas de Heat Shock foram modulados por *T.rubrum* na presença da droga solamargina em resposta ao estresse, e estão relacionados à transdução de sinais por oferecerem vantagens ao patógeno em condições adversas. A repressão de alguns genes que conferem a ativação da Hsp90 como a co-chaperona Cdc37, são atrativos na busca de novos alvos terapêuticos. No presente

trabalho, ambas chaperona e co-chaperona foram moduladas negativamente na presença do glicoalcaloide solamargina por 6 horas.

Outro dado interessante foi à repressão do gene que codifica a enzima esqualeno epoxidase quando *T. rubrum* foi exposto a solamargina em 30 minutos. Essa enzima está envolvida na biossíntese de ergosterol, que é um componente de membrana celular e é alvo do antifúngico comercial terbinafina. Bitencourt *et al.*, 2013 revelaram que os compostos naturais Transchalcona e Quercetina inibiram a síntese de ergosterol e de ácidos graxos. A inibição da enzima esqualeno epoxidase acarreta um acúmulo de esqualeno e redução do nível de ergosterol em células fúngicas como demonstrado na **figura 9** (RYDER, 1992). Dessa forma, podemos sugerir que a solamargina pode exercer seu efeito antifúngico através da repressão do gene que codifica a esqualeno epoxidase envolvendo a transdução de sinal, interferindo assim na via do ergosterol, componente da membrana plasmática que interfere na integridade da membrana plasmática celular, além de ser alvo exclusivo de célula fúngica.

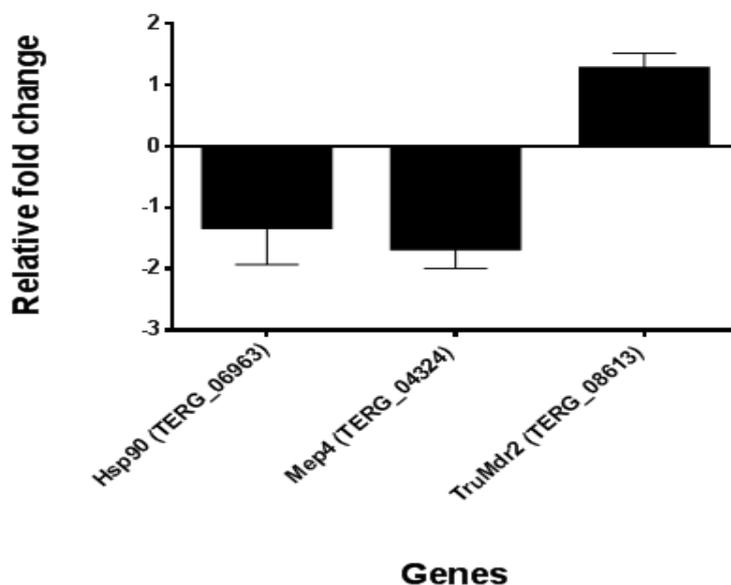
**Figura 9:** Biossíntese do Ergosterol



**Fonte:** (Zhang *et al.*, 2009)

Os genes codificadores de proteases secretadas por dermatófitos apresentam papel importante de degradação de queratina e patogenicidade (Martinez *et al.*, 2012). É provável que as proteases tenham uma ótima atividade, tanto em pH ácido e alcalino pois são fatores importantes que determinam a virulência dos dermatófitos, e a sua regulação são fundamentais na infecção (Tsuboi *et al.*, 1989). No presente trabalho, o gene codificador da endoprotease MEP4 na presença de solamargina por 6 horas foi reprimido (**Figura 10**). Esse gene é um alvo de extrema importância, pois está correlacionado com a quebra de nutrientes dentro da célula fúngica, invasão no hospedeiro e à virulência do dermatófito. Também foi observado que o composto  $\alpha$  – solanina (alcaloide extraído de *Solanum Tuberosum* L –Batata) regulou negativamente o gene que codifica MEP4 (Komoto *et al.*, 2015). Além disso, nosso grupo de pesquisa também observou a indução do gene que codifica a MEP4 em meio de cultura suplementado por queratina quanto por elastina (Bitencourt *et al.*, 2016). Chen *et al.*, 2010 constatou por qPCR que o gene MEP4 em *T.rubrum* foi mais expresso em meio de cultura contendo queratina proveniente de unha humana triturada e esterilizada do que em meio de cultura contendo pele humana, sugerindo que a MEP4 esteja relacionada com a degradação de queratina de unha. Assim, as metaloproteinasas são fatores de virulência importante na invasão de *T. rubrum* ao hospedeiro e especialmente a MEP4 descrita por Zhang *et al.*, 2014 como a mais virulenta, sendo ela reprimida pela presença de solamargina com outro alvo antifúngico.

**Figura 10:** Modulação de genes selecionados a partir da hibridização do *microarray* em Tempo Real de RT-PCR expressos em *Trichophyton rubrum* na presença de solamargina durante 6 horas em comparação com o controle



O estudo envolvendo o transportador *TruMDR2* no transporte de terbinafina, outros compostos como de brometo de etídio e 4NQO, foram demonstrados por Fachin *et al.*, 2006 em ensaios que testaram a susceptibilidade da linhagem mutante H6 (*Trichophyton interdigitale*) que possui um gene transportador ABC rompido  $\Delta$ *TruMDR2* a estes fármacos. Com efeito, Zhang *et al.*, 2009 revelou por ensaio de *microarray* que a terbinafina induziu a transcrição de genes de resistência a múltiplas drogas (MDR), incluindo *TruMDR2*, e *MDR1* de *T. rubrum*. Sugerimos que este gene pode estar relacionado à resposta, pois ele está induzido na presença da droga por 6 horas (**Figura 10**). Uma vez que a inibição do efluxo de fármacos podem prejudicar o desenvolvimento de resistência a esses inibidores em *T. rubrum*, porém drogas multialvos como a solamargina que atua reduzindo o conteúdo de ergosterol, interferindo na permeabilidade da membrana, inibindo a proteases, e genes relacionados à transdução de sinais reduzem a probabilidade do agente patogênico a criar resistência, uma outra alternativa seria a combinação de solamargina com antifúngicos já comercializados para prevenir linhagens resistentes.

## 5. CONCLUSÕES

Avaliação da atividade antifúngica do glicoalcaloides de *S. lycocarpum* solamargina contra *T. rubrum* mostrou que os glicoalcaloides foram efetivos em baixa concentração de 4,49  $\mu$ M. Porém, a citotoxicidade de solamargina para a linhagem de queratinócitos humanos foi moderada com valor de  $IC_{50} = 10,92 \mu$ M.

Foi possível realizar a customização de lâminas do dermatófito *Trichophyton rubrum* de oligonucleotídeos de *microarrays* no formato de 4x 44.000 spots pela empresa Agilent.

O transcriptoma de *T. rubrum* na presença do glicoalcaloide em meio de cultura mínimo com queratina e elastina, a fim de estudar resposta rápida e tardia nos tempos de 30 minutos e 6 horas respectivamente, nos possibilitou observar o comportamento de genes relacionados à defesa do dermatófito.

Através da análise dos dados obtidos no *microarray* por meio de programas de bioinformática, foi possível observar a modulação de genes relacionados a patogenicidade, adaptação e resposta a estresse.

Podemos destacar a modulação do gene *ERG1*, codificador da enzima esqualeno epoxidase (que é alvo do antifúngico comercial terbinafina) e genes de adaptação como as

proteínas de Heat Shock que possibilitam a sobrevivência do fungo em condições de estresse.

As proteínas Hsp90 e principalmente a co-chaperona Cdc37 podem ser importantes alvos a serem explorados no desenvolvimento de novas drogas antifúngicas, devido ao seu envolvimento em situações de estresse.

A validação dos dados de *microarray* por meio do PCR quantitativo mostraram significativa correlação de 72,73%.

### **Conclusão final**

A solamargina é um composto que apresentou pronunciada atividade antifúngica, provavelmente atuando em vários alvos celulares, como a inibição da enzima ERG11, envolvida na biossíntese de ergosterol, a metaloproteinase e a co-chaperona Cdc37 que regula a ativação da Hsp90. Destaca-se a inibição da co-chaperona Cdc37 pela solamargina, pois ela é o componente principal de sinalização do complexo Hsp90. Dessa forma, ela pode ser explorada como um possível novo alvo terapêutico, pois essa chaperona está envolvida na interação de genes relacionados à transdução de sinais. Além disso, a repressão da atividade da Hsp90 pode diminuir a probabilidade do surgimento de linhagens de *T. rubrum* resistentes aos antifúngicos atuais.

### **6. REFERÊNCIAS**

- ABREU MIRANDA, M. *et al.* In vitro leishmanicidal and cytotoxic activities of the glycoalkaloids from *Solanum lycocarpum* (Solanaceae) fruits. **Chemistry & biodiversity**, v. 10, n. 4, p. 642–8, abr. 2013.
- ACHTERMAN, R. R. *et al.* Sequenced dermatophyte strains: Growth rate, conidiation, drug susceptibilities, and virulence in an invertebrate model. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, n. 3, p. 335–341, 2011.
- ALI, M. M. U. *et al.* Crystal structure of an Hsp90-nucleotide-p23/Sba1 closed chaperone complex. **Nature**, v. 440, n. 7087, p. 1013–7, 20 abr. 2006.
- ALMEIDA, L. DE *et al.* Anticretallic and antitumoral activities of gel filtration fractions of aqueous extract from *Tabernaemontana catharinensis* (Apocynaceae). **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 137, n. 1, p. 19–27, 2004.
- ASHBURNER, M. *et al.* Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. **Nature genetics**, v. 25, n. 1, p. 25–9, maio 2000.
- BADDLEY, J. W.; MOSER, S. A. **Emerging fungal resistance Clinics in Laboratory Medicine**, 2004.

BAEZA, L. C. *et al.* cDNA representational difference analysis used in the identification of genes expressed by *Trichophyton rubrum* during contact with keratin. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 12-13, p. 1415–1421, 2007.

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 complementary and alternative medicine**, v. 13, p. 229, jan. 2013.

\_\_\_\_\_. BMC Genomics Transcription profile of *Trichophyton rubrum* conidia grown on keratin reveals the induction of an adhesin-like protein gene with a tandem repeat pattern. 2016.

BLANKEMEYER, J. T. *et al.* Developmental toxicology of solamargine and solasonine glycoalkaloids in frog embryos. **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, n. 5, p. 383–389, 1998.

BORGERS, M.; DEGREEF, H.; CAUWENBERGH, G. Fungal infections of the skin: infection process and antimycotic therapy. **Current drug targets**, v. 6, n. 8, p. 849–862, 2005.

BORGES, J. C.; RAMOS, C. H. I. Protein folding assisted by chaperones. **Protein and peptide letters**, v. 12, n. 3, p. 257–61, abr. 2005.

CAO, Y. *et al.* *Candida albicans* cells lacking CaMCA1-encoded metacaspase show resistance to oxidative stress-induced death and change in energy metabolism. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, n. 2, p. 183–189, 2009.

CHEN, J. *et al.* Substrate adaptation of *Trichophyton rubrum* secreted endoproteases. **Microbial Pathogenesis**, v. 48, n. 2, p. 57–61, 2010.

CIPOLLINI, M. L.; LEVEY, D. J. Why are some fruits toxic? Glycoalkaloids in *Solanum* and fruit choice by vertebrates. **Ecology**, v. 78, n. 3, p. 782–798, 1997.

CLSI. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard** Most, 2002.

CORDEIRO, R. DE A. *et al.* Inhibition of heat-shock protein 90 enhances the susceptibility to antifungals and reduces the virulence of *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* species complex. **Microbiology (Reading, England)**, v. 162, n. 2, p. 309–17, fev. 2016.

COVE, D. J. The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. **Biochimica et biophysica acta**, v. 113, n. 1, p. 51–6, 11 jan. 1966.

DRAKE, L. A. *et al.* **Guidelines of care for superficial mycotic infections of the skin: Tinea corporis, tinea cruris, tinea faciei, tinea manuum, and tinea pedis** *Journal of the American Academy of Dermatology*, 1996.

ECKL, J. M.; RICHTER, K. Functions of the Hsp90 chaperone system: lifting client proteins to new heights. v. 4, n. 4, p. 157–165, 2013.

EISEN, M. B. *et al.* Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 25, p. 14863–14868, 1998.

FACHIN, A. L. *et al.* Role of the ABC transporter TruMDR2 in terbinafine, 4-nitroquinoline N-oxide and ethidium bromide susceptibility in *Trichophyton rubrum*.

**Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. 8, p. 1093–1099, 2006.

FACHIN, A. L.; MAFFEI, C. M.; MARTINEZ-ROSSI, N. M. In vitro susceptibility of *Trichophyton rubrum* isolates to griseofulvin and tioconazole. Induction and isolation of a resistant mutant to both antimycotic drugs. Mutant of *Trichophyton rubrum* resistant to griseofulvin and tioconazole. **Mycopathologia**, v. 135, n. 3, p. 141–3, jan. 1996.

FEWELL, A. M.; RODDICK, J. G.; WEISSENBERGT, M. Solamargine in Relation To Inhibition of Fungal Growth. v. 37, n. 4, 1994.

FINK, A. L. Chaperone-mediated protein folding. **Physiological reviews**, v. 79, n. 2, p. 425–449, 1999.

FRANCISCO, F. DAS *et al.* Glicoalcaloides antifúngicos flavonoides e outros constituintes químicos de. **Quimica Nova**, v. 34, n. 2, p. 284–288, 2011.

GRUMBT, M.; MONOD, M.; STAIB, P. **Genetic advances in dermatophytes** **FEMS Microbiology Letters**, 2011.

HANEKE, E. Fungal infections of the nail. **Seminars in dermatology**, v. 10, n. 1, p. 41–53, mar. 1991.

HILL, S. M. *et al.* Life-span extension by a metacaspase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Science**, v. 344, n. 6190, p. 1389–1392, 2014.

JACOB, T. R. *et al.* Heat shock protein 90 (Hsp90) as a molecular target for the development of novel drugs against the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. NOV, p. 1–10, 2015.

JOUSSON, O. *et al.* Secreted subtilisin gene family in *Trichophyton rubrum*. **Gene**, v. 339, n. 1-2, p. 79–88, 2004.

KANEHISA, M.; GOTO, S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 1, p. 27–30, 1 jan. 2000.

KAUFMAN, G. *et al.* Markers for host-induced gene expression in *Trichophyton dermatophytosis*. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 10, p. 6584–6590, 2005.

KEUKENS, E. A. *et al.* Dual specificity of sterol-mediated glycoalkaloid induced membrane disruption. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1110, n. 2, p. 127–136, 1992.

\_\_\_\_\_. Molecular basis of glycoalkaloid induced membrane disruption. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1240, n. 2, p. 216–228, 1995.

KOMOTO, T. T. *et al.* Gene Expression Response of *Trichophyton rubrum* during Coculture on Keratinocytes Exposed to Antifungal Agents. v. 2015, 2015.

LEACH, M. D. *et al.* Hsp90 Orchestrates Transcriptional Regulation by Hsf1 and Cell Wall Remodelling by MAPK Signalling during Thermal Adaptation in a Pathogenic Yeast. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 12, 2012.

LEPVRIER, E. *et al.* Hsp90 oligomerization process: How can p23 drive the chaperone machineries? **Biochimica et biophysica acta**, v. 1854, n. 10 Pt A, p. 1412–24, out. 2015.

LEWIS, J. *et al.* Disruption of hsp90 function results in degradation of the death domain kinase, receptor-interacting protein (RIP), and blockage of tumor necrosis factor-induced nuclear factor-kappaB activation. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 14, p. 10519–26, 7 abr. 2000.

- LI, J.; SOROKA, J.; BUCHNER, J. The Hsp90 chaperone machinery: Conformational dynamics and regulation by co-chaperones. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1823, n. 3, p. 624–635, 2011.
- LÓPEZ-GARCÍA, B.; LEE, P. H. A; GALLO, R. L. Expression and potential function of cathelicidin antimicrobial peptides in dermatophytosis and tinea versicolor. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 5, p. 877–882, 2006.
- LUDOVICO, P. *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid. **Microbiology (Reading, England)**, v. 147, n. Pt 9, p. 2409–15, set. 2001.
- MARANHÃO, F. C. A. *et al.* Membrane transporter proteins are involved in *Trichophyton rubrum* pathogenesis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 2, p. 163–168, 2009.
- MARANHÃO, F. C. A.; PAIÃO, F. G.; MARTINEZ-ROSSI, N. M. Isolation of transcripts over-expressed in human pathogen *Trichophyton rubrum* during growth in keratin. **Microbial Pathogenesis**, v. 43, n. 4, p. 166–172, 2007.
- MARTINEZ, D. A. *et al.* Comparative genome analysis of *Trichophyton rubrum* and related dermatophytes reveals candidate genes involved in infection. **mBio**, v. 3, n. 5, 2012.
- MUKHERJEE, P. K. *et al.* Clinical *Trichophyton rubrum* strain exhibiting primary resistance to terbinafine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 1, p. 82–86, 2003.
- NATHAN, D. F.; LINDQUIST, S. Mutational analysis of Hsp90 function: interactions with a steroid receptor and a protein kinase. **Molecular and cellular biology**, v. 15, n. 7, p. 3917–25, jul. 1995.
- NI, W.; ODUNUGA, O. O. The Networking of Chaperones by Co-chaperones. **The Networking of Chaperones by Co-chaperones**, v. 78, p. 243–273, 2015.
- OLESEN, S. H. *et al.* Stability of the human Hsp90-p50Cdc37 chaperone complex against nucleotides and Hsp90 inhibitors, and the influence of phosphorylation by casein kinase 2. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 20, n. 1, p. 1643–60, 19 jan. 2015.
- OLIVEIRA, A. C. P. *et al.* The starch from *Solanum lycocarpum* St. Hill. fruit is not a hypoglycemic agent. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 4, p. 525–530, 2003.
- OSBORNE, C. S. *et al.* In Vitro Analysis of the Ability of *Trichophyton rubrum* To Become Resistant to Terbinafine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 11, p. 3634–3636, 2003.
- PARCELLIER, A. *et al.* Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 304, n. 3, p. 505–12, 9 maio 2003.
- PASZKOWSKI, T.; CLARKE, R. N.; HORNSTEIN, M. D. Smoking induces oxidative stress inside the Graafian follicle. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 17, n. 4, p. 921–925, 2002.
- PERES, N. T. A. *et al.* Transcriptional profiling reveals the expression of novel genes in response to various stimuli in the human dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **BMC microbiology**, v. 10, p. 39, 2010.

- PROJAN, S. J.; YOUNGMAN, P. J. Antimicrobials: New solutions badly needed - Editorial overview. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, n. 5, p. 463–465, 2002.
- PUNJABI, S. *et al.* Solasodine glycoalkaloids: A novel topical therapy for basal cell carcinoma. A double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel group, multicenter study. **International Journal of Dermatology**, v. 47, n. 1, p. 78–82, 2008.
- RATZKE, C. *et al.* Dynamics of heat shock protein 90 C-terminal dimerization is an important part of its conformational cycle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 37, p. 16101–6, 2010.
- RÖHL, A.; ROHRBERG, J.; BUCHNER, J. The chaperone Hsp90: changing partners for demanding clients. **Trends in biochemical sciences**, v. 38, n. 5, p. 253–62, maio 2013.
- RYDER, N. S. Terbinafine: Mode of action and properties of the squalene epoxidase inhibition. **British Journal of Dermatology**, v. 126, n. s39, p. 2–7, fev. 1992.
- SATO, S.; FUJITA, N.; TSURUO, T. Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 20, p. 10832–7, 26 set. 2000.
- SCHWARZ, A. *et al.* Rats exposed to Solanum lycocarpum fruit in utero and during lactation: Neurochemical, behavioral and histopathological effects. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 27, n. 6, p. 861–870, 2005.
- SCHWARZ, A. *et al.* Phytochemical study of Solanum lycocarpum (St. Hil) unripe fruit and its effects on rat gestation. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 11, p. 1025–1028, 2007.
- SEEBACHER, C.; BOUCHARA, J.-P.; MIGNON, B. Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. **Mycopathologia**, v. 166, n. 5-6, p. 335–52, jan. 2008.
- SILVEIRA, H. C. S. *et al.* Transcriptional profiling reveals genes in the human pathogen *Trichophyton rubrum* that are expressed in response to pH signaling. **Microbial Pathogenesis**, v. 48, n. 2, p. 91–96, 2010.
- SIQUEIRA, E. R. *et al.* [Occurrence of dermatophyte, in nails, feet and hands of university students]. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 269–71, jan. 2006.
- SOARES-MOTA, M. R. *et al.* Toxicological evaluation of 10% Solanum lycocarpum St. Hill fruit consumption in the diet of growing rats: Hematological, biochemical and histopathological effects. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 62, n. 5, p. 549–553, 2010.
- SUN, W. *et al.* Targeting mitochondrial transcription in fission yeast with ETB , an inhibitor of HSP60 , the chaperone that binds to the mitochondrial transcription factor Mtf1. p. 122–131, 2012.
- TAIPALE, M. *et al.* Quantitative analysis of Hsp90-client interactions reveals principles of substrate recognition. **Cell**, v. 150, n. 5, p. 987–1001, 2012.
- TAIPALE, M.; JAROSZ, D. F.; LINDQUIST, S. HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 7, p. 515–528, 9 jun. 2010.
- TIWARI, S.; THAKUR, R.; SHANKAR, J. Role of Heat-Shock Proteins in Cellular Function and in the Biology of Fungi. **Biotechnology Research International**, v. 2015, p. 11, 2015.

- TSUBOI, R. *et al.* Isolation of a keratinolytic proteinase from Trichophyton mentagrophytes with enzymatic activity at acidic pH. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 11, p. 3479–3483, 1989.
- VÊNCIO, R. Z. N. *et al.* BayGO: Bayesian analysis of ontology term enrichment in microarray data. **BMC bioinformatics**, v. 7, p. 86, jan. 2006.
- VERCAMMEN, D. *et al.* Are metacaspases caspases? **The Journal of cell biology**, v. 179, n. 3, p. 375–80, 5 nov. 2007.
- VISHNU, S. *et al.* Dermatophytes: Diagnosis of dermatophytosis and its treatment. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 19, p. 1286–1293, 2015.
- WANDINGER, S. K.; RICHTER, K.; BUCHNER, J. The Hsp90 chaperone machinery. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 27, p. 18473–18477, 2008.
- WHITE, T. C. *et al.* Generating and testing molecular hypotheses in the dermatophytes. **Eukaryotic Cell**, v. 7, n. 8, p. 1238–1245, 2008.
- XUE-SONG, Z. *et al.* Antifungal activity of five solanaceous glycoalkaloids and their mixtures against phytopathogenic fungi *Cercospora brassicae* and *Alternaria porri* 1. **Natural Products Research and Development**, v. 1, n. 20070200004, p. 36–43, 2009.
- YANG, L. *et al.* Comparison between gene expression of conidia and germinating phase in *Trichophyton rubrum*. **Science in China, Series C: Life Sciences**, v. 50, n. 3, p. 377–384, 2007.
- ZDOBNOV, E. M.; APWEILER, R. InterProScan--an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 17, n. 9, p. 847–8, set. 2001.
- ZHANG, W. *et al.* Transcriptional profiles of response to terbinafine in *Trichophyton rubrum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 6, p. 1123–1130, 2009.
- ZHANG, X. *et al.* Metalloprotease genes of *Trichophyton mentagrophytes* are important for pathogenicity. **Medical mycology**, v. 52, n. 1, p. 36–45, jan. 2014.